UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas

Luciana Ribeiro Jarduli

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Luciana Ribeiro Jarduli

Orientadora: Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias.
Co-Orientadora: Dra. Ana Cristina Silva Pinto.

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 06/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Jarduli, Luciana Ribeiro

Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas. Ribeirão Preto, 2018.

165 p : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Malmegrim, Kelen Cristina Ribeiro

1. Doença Falciforme. 2. Neogênese de células T e B.
3. Repertório de Células T.
4. Transplante de células tronco hematopoéticas. 5. Hidroxiuréia.
6. Transfusão crônica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Ribeiro Jarduli
Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias.
Co-Orientadora: Dra. Ana Cristina Silva Pinto.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Este trabalho foi realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos n°2013/08135-2, n°2014/03866-1 e n°2016/11544-0), da Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Centro de Terapia Celular (INCTC) do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dedico esta Tese aos meus pais, Elias e Irene, que com todo Amor e Sabedoria, me apoiaram incansavelmente em cada minuto da minha trajetória... por todas as orações e palavras de consolo e ânimo... Simplesmente gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria, força e capacidade de realização desta conquista.

Aos meus pais, Elias Jarduli e Irene Ribeiro Jarduli, meu irmão e primeiro Doutor da família, Lucas Ribeiro Jarduli e a minha avó, Maria Farinha Ribeiro cujos valores me inspiram, pelo apoio incondicional, confiança e amor em todos os momentos, minha imensa admiração e gratidão por tudo, com certeza esta conquista é nossa!

Ao meu amor, querido Lucas Maciel, por seu carinho, apoio, paciência e compreensão, pela maravilhosa forma de ser você, me transformando e me fortalecendo sempre...

Agradeço a minha querida amiga Michele Junqueira, um presente maravilhoso que o Doutorado me concedeu! Obrigada pelos almoços, partilhas e infinitos momentos que me apoiou e me ouviu, sua amizade fez toda diferença...

Agradeço a tantos amigos que me acolheram, me ajudaram e incentivaram durante estes anos, especialmente aos amigos/pós-graduandos do hemocentro, pela convivência/almoços/marmitas/cafés e tantos momentos.

À toda equipe do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP, especialmente ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço imensamente a Dra. Flávia Santos e ao Dr. Gil Santis, pelo acolhimento e pelas reuniões e discussões, sempre muito enriquecedoras.

Agradeço aos funcionários do Hemocentro de todos os setores (recepção, copa, limpeza, biblioteca, audiovisual, administrativo, manutenção, almoxarifado, compras, laboratórios de pesquisa, laboratórios de rotina, escriturários, serviço social, enfermeiros e técnicos de enfermagem...e tantos outros). Muito Obrigada pelo apoio direto e indireto que foram essenciais para o desenvolvimento do meu projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP, aos professores e coordenadores, especialmente ao Henrique Theodoro, sempre disposto a me ajudar e esclarecer todas as dúvidas, pela atenção e disponibilidade, e ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, que me acompanhou e me motivou sempre.

À FAPESP, CAPES e ao INCTC/CNPq, pelo suporte financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Behring de Análises Clínicas, especialmente à Taisa Bíscaro e à Daiana Martins de Oliveira Rocha, pela colaboração nas dosagens de Imunoglobulinas, pelo carinho e dedicação em compreender meu projeto e realizar as dosagens com toda qualidade e excelência.

A equipe de estatística do PROESTAT, Mayara e Estela, pela realização das análises estatísticas, esclarecimentos e ajuda no delineamento dos resultados e gráficos, pela competência e prontidão.

Agradeço especialmente a Marjory, Andréa e Sandra, por todo o convívio, ajuda e prontidão sempre que precisei na biblioteca do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP, muito obrigada por contribuírem e ajudarem durante a minha formação.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP, especialmente à Dra. Simone Haddad, Evandra Sandoval e Fernanda Ursoli, por toda ajuda e por poder utilizar todo o suporte do laboratório, que foi imprescindível para as análises moleculares, minha gratidão!

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP, especialmente à Patrícia e a Natália pela ajuda e colaboração nas análises imunofenotípicas e ensaios funcionais realizados ao final do meu Doutorado, por toda força e carinho.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP, pela colaboração, especialmente a Adriana Aparecida Marques, pela paciência, apoio e ajuda extraordinária para as análises do Repertório de Células T. Dri, você foi fundamental para a realização desta conquista, Muito Obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Cultura Celular do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP, especialmente ao Mário Soares Neto e a Giuliana Bertolino, e a todos que contribuíram em vários momentos. Agradeço a ajuda nos experimentos e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em especial à Dra. Belinda Simões e à Dra. Thalita Costa, pelo apoio no acompanhamento dos pacientes, coleta de amostras e ajuda nos dados clínicos. Agradeço a Rita, que sempre nos deu suporte no agendamento dos pacientes, à todas as enfermeiras, pela atenção e dedicação na coleta das amostras dos pacientes.

À toda equipe de Enfermagem e Serviço social do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP: às enfermeiras da sala de transfusão, Salua e Luciana, por toda colaboração e apoio durante a coleta das amostras dos pacientes transfundidos; à enfermeira Marcela Ganzella, por me permitir realizar as coletas das amostras nos dias de ambulatório, pela compreensão e colaboração; às enfermeiras Carol e Polyana, que sempre me ajudaram nas coletas das amostras dos pacientes; a assistente social Inês, pela ajuda em contatar os pacientes, pela alegria e amizade; à toda equipe de enfermagem que me ajudou em algum momento, pela paciência e toda colaboração, vocês foram essenciais para a realização deste trabalho!

Ao meu orientador durante o Estágio de Doutorado Sanduíche/BEPE no Hospital Saint-Louis em Paris, França, Prof. Dr. Antoine Toubert, referência na análise da Função Tímica e neogênese de células T e B, pela oportunidade de colaboração e acolhimento, pelas contribuições grandiosas, sem dúvida um momento incrível de amadurecimento e crescimento profissional. Agradeço a toda equipe do *Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis, INSERM UMR1160*, especialmente ao Dr. Emmanuel Clave, à Corinne Douay e Isabelle Fournier, pela ajuda nos experimentos, pela amizade e apoio durante a minha vida francesa, '*Mille mercis pour tout*!'. Agradeço também aos meus amigos Breno Lima e Itauá Araújo, pela amizade e ajuda durante meu estágio francês!

Aos meus mentores Fareed Mirza e Colin Pillai, durante meu estágio no programa ''*Next Generation Scientist - 2014*'' na Novartis em Basel, Suíça, assim como meu orientador Dr. Andreas Katopodis e ao Daniel Kaiser, pela oportunidade maravilhosa e enriquecedora, que contribuiu de forma ímpar para minha formação científica.

Aos pacientes que participaram deste estudo, verdadeiros guerreiros e batalhadores, aos quais tive oportunidade de conhecer e convidar a participar deste trabalho: vocês me ensinaram muito. Espero que este estudo possa contribuir para o entendimento dos tratamentos e dê suporte aos pacientes falciformes.

À minha co-orientadora Dra. Ana Cristina Silva Pinto, por toda sua ajuda e disponibilidade, especialmente na análise clínica dos pacientes ambulatoriais, pela sua atenção e carinho, sempre disposta a ajudar e discutir os resultados. Foi uma honra ter sua co-orientação, muito obrigada pelos ensinamentos e contribuições.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, por toda orientação e ensinamentos ao longo destes anos, por confiar neste trabalho e na minha capacidade de realizá-lo. Agradeço o apoio e por contribuir na minha formação científica e profissional. Muito Obrigada por tudo que estes anos me permitiram crescer sob sua orientação e por toda sua dedicação para que este trabalho fosse concluído.

"Aí onde estão as nossas aspirações, nosso trabalho, nossos amores - aí está o lugar do nosso encontro cotidiano com Deus."

São Josemaria Escrivá

RESUMO

RIBEIRO JARDULI, LUCIANA. **Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas**. 2018. 166f Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As doenças falciformes (DF) constituem um grupo de doenças hereditárias monogênicas. São doenças extremamente relevantes no contexto de saúde pública no Brasil, portanto diferentes estratégias terapêuticas devem ser avaliadas. As oclusões vasculares afetam praticamente todos os órgãos, inclusive o baço e a medula óssea, porém não existem dados na literatura se estas comprometem também o tecido tímico. Os pacientes apresentam maior suscetibilidade às infecções cujas causas não são ainda totalmente esclarecidas Embora as infecções observadas nos pacientes sejam atribuídas à disfunção esplênica, o quadro inflamatório crônico e possíveis alterações no timo e na medula óssea, também poderiam causar uma disfunção imunológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a neogênese de células T e B e a diversidade do repertório de células T periféricas em pacientes com anemia falciforme (AF) sem tratamento (N = 15), tratados com hidroxiuréia (N = 20) ou transfusão crônica (N = 21) e em pacientes com DF tratados com transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico (N = 29). Pacientes sem tratamento apresentaram menores níveis de sjTREC e β-TREC, e menor taxa de divisão celular intratímica, demonstrando alterações importantes na neogênese das células T. A produção tímica de novas células T *naïve* foi reestabelecida em um ano pós-transplante, com normalização dos níveis de sjTREC e β-TREC. O desenvolvimento de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECHa) e reativação de citomegalovírus comprometeu a timopoiese nos primeiros seis meses pós-transplante, com diminuição significativa dos níveis de sjTRECs e β-TRECs. Análises do repertório da cadeia Vβ dos receptores de células T (TCRs), pelo método *TCRBV CDR3 spectratyping*, indicaram que os pacientes com AF apresentaram um repertório menos diverso, composto predominantemente de famílias Vβ com padrão *skewed* e picos de CDR3 monoclonais, sendo a família Vβ3 mais frequente. A composição do repertório de células T foi alterada após o transplante, adquirindo um perfil mais policlonal dos picos de CDR3 ao longo do tempo. A família Vβ22 foi a mais expressa no período pré-transplante e em todos os seguimentos pós-transplante. Os pacientes com DF apresentaram aumento de linfócitos B *naive*, demonstrado pelos altos níveis de sjKRECs e pela taxa de proliferação homeostática. As análises multivariadas demonstraram que as alterações esplênicas influenciam diretamente os níveis de sjKREC, indicando que a baixa função esplênica leva ao aumento da produção de células B *naive* pela medula óssea, sugerindo um mecanismo compensatório. Os resultados desse trabalho demonstraram a existência de um desequilíbrio na neogênese de células T e B e consequentemente nesses compartimentos celulares periféricos, que pode conferir aos pacientes com DF uma maior susceptibilidade a infecções. Entre as diferentes modalidades terapêuticas, o TCTH alogênico sobressaiu-se em relação aos tratamentos convencionais, melhorando a neogênese de células T e B a longo prazo.

Palavras-chave: Doença Falciforme, Neogênese de célula T e B, Repertório de células T, Transplante de células tronco hematopoéticas, Hidroxiuréia, Transfusão Crônica.

ABSTRACT

RIBEIRO JARDULI, LUCIANA. **Neogenesis of T and B cells in patients with sickle cell disease treated with different therapeutic modalities**. 2018. 166f Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Sickle Cell Disease (SCD) are a group of monogenic hereditary diseases. These are extremely relevant diseases in the context of public health in Brazil, thus, different therapeutic strategies must be studied. Vascular occlusions affect practically all organs, including the spleen and bone marrow. However, there are no literature data about the impact of vaso-occlusions on the thymic tissue. Patients are more susceptible to infections whose causes are not fully elucidated. Although the infections observed in these patients are assigned to splenic dysfunction, the chronic inflammatory state and possible alterations of the thymus and bone marrow could also lead to immune dysfunction. The goal of this work was to evaluate the neogenesis of T and B cells and the diversity of peripheral T cell repertoire in patients with sickle cell anemia (SCA) without treatment (N = 15), treated with hydroxyurea (N = 20) or chronic transfusions (N = 21) and in patients with SCD treated with hematopoietic stem cell transplantation (N = 29) allogeneic. Patients without treatment had lower levels of sjTREC and β-TREC, and lower rate of intrathymic cell division, demonstrating important alterations in the neogenesis of T cells. The thymic production of new *naïve* T cells was reestablished at one-year post transplantation, with normalization of sjTREC and β-TREC levels. The development of graft-versus-host disease (aGVHD) and cytomegalovirus activation compromised thymopoiesis in the first six months post transplantation, with a significant decrease of sjTRECs and β-TRECs levels. Analysis of the TCR Vβ chain repertoire by *TCRBV CDR3 spectratyping* indicate that patients with SCA showed a less diverse repertoire, mainly composed by Vβ families with a skewed pattern and monoclonal CDR3 peaks, being the Vβ3 family the most frequent one. The composition of the T-cell repertoire was altered after transplantation, changing over time to more polyclonal profile of the CDR3 peaks. The Vβ22 family was the more expressed at pre-transplantation and at all follow-up periods. Patients with SCD presented increased numbers of naive B cells, demonstrated by higher levels of sjKRECs and homeostatic proliferation. Multivariate analysis demonstrated that splenic function directly influenced sjKREC levels, indicating that compromised splenic function leads to increase of naive B cell output by the bone marrow, suggesting a compensatory mechanism. The results of this study showed the existence of an imbalanced T and B cell neogenesis and, consequently on these peripheral cell compartments, which may confer to patients with SCD an increased susceptibility to infections. Among different therapeutic modalities, allogeneic HSCT stood out in relation to the conventional treatments, improving long-term T and B cell neogenesis.

Keywords: Sickle Cell Disease, T and B cell neogenesis, T Cell repertoire, Hematopoietic stem cell transplantation, Hydroxyurea, Chronic Transfusion.

RESUMEN

RIBEIRO JARDULI, LUCIANA. **Neogénesis de células T y B en pacientes con enfermedades falciformes tratados con diferentes modalidades terapéuticas**. 2018. 166f Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

La enfermedad falciforme (EF) onstituyen un grupo de enfermedades hereditarias monogénicas. Son enfermedades extremadamente relevantes en el contexto de salud pública en Brasil, por lo tanto diferentes estrategias terapéuticas deben ser estudiadas. Las oclusiones vasculares afectan prácticamente a todos los órganos, incluyendo el bazo y la médula ósea, pero no existen datos en la literatura si éstas comprometen también el tejido tímico. Aunque las infecciones sean atribuidas a la disfunción esplénica, el estado inflamatorio crónico y las posibles disfunciones del timo y de la médula ósea, también podrían llevar a la disfunción inmunológica.El objetivo de este trabajo fue evaluar la neogénesis de células T y B y la diversidad del repertorio de células T periféricas en pacientes con anemia falciforme (AF) sin tratamiento (N = 15), tratados con hidroxiurea (N = 20) o transfusión crónica (N = 21) y en pacientes con EF tratados con trasplante de células madre hematopoyéticas (TCTH) alogénico (N = 29). Los pacientes sin tratamiento presentaron menores niveles de sjTREC y β-TREC, y menor tasa de división celular intratímica, demostrando alteraciones importantes en la neogénesis de las células T. La producción tímica de nuevas células T *naïve* fue restablecida en un año post trasplante, con normalización de los niveles de sjTREC y β-TREC. El desarrollo de enfermedad del injerto contra el huésped (DECHa) y reactivación de citomegalovirus comprometió la timopoyesis en los primeros seis meses post trasplante, con disminución significativa de sjTRECs y β-TRECs. Los análisis del repertorio de la cadena Vβ de los receptores de células T (TCRs), por el método *TCRBV CDR3* spectratyping identificaron que los pacientes con AF presentaron un repertorio menos diverso, compuesto predominantemente de familias con patrón *skewed* y picos monoclonales, siendo la familia Vβ3 el más frecuente. La composición del repertorio de células T se alteró después del trasplante, adquiriendo perfil más policlonal de los picos de CDR3 a lo largo del tiempo, destacando la alta expresión de la familia Vβ22 antes y en todos los períodos post trasplante. Los pacientes con AF y EF presentaron un aumento de linfocitos B *naïve*, demostrado por los altos niveles de sjKRECs y por la tasa de proliferación homeostática. Los análisis multivariados demostraron que las alteraciones esplénicas influenciaron los niveles de sjKREC, indicando que la baja función esplénica lleva al aumento del *output* de células B *naïve* por la médula ósea, sugiriendo un mecanismo compensatorio. Los resultados de este trabajo demostraron la existencia de un desequilibrio en la neogénesis de células T y B y consecuentemente en esos compartimentos celulares en pacientes con EF, que puede contribuir a un aumento en la susceptibilidad a las infecciones. Entre las diferentes modalidades terapéuticas, el TCTH alogénico sobresalió en relación a los tratamientos convencionales, mejorando la neogénesis de células T y B a largo plazo.

Palabras clave: Enfermedad Falciforme, Neogénesis de células T y B, Repertorio de células T, Trasplante de células madre hematopoyéticas, Hidroxiurea, Transfusión Crónica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neogênese de células T nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados.....46

Figura 2. Neogênese de células T nos pacientes com anemia falciforme tratados com transfusão crônica (aloimunizados e não aloimunizados). 47

Figura 3. Neogênese de células T nos pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico.....49

Figura 4. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que apresentaram ou não DECH aguda.....51

Figura 5. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que tiveram ou não reativação de CMV.....52

Figura 6. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que perderam ou não perderam o enxerto. 53

Figura 7. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que apresentaram ou não incompatibilidade ABO.....54

Figura 8. Diversidade do repertório de linfócitos T dos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados. 57

Figura 9. Porcentagem de famílias policlonais, ‘‘*skewed*’’ e monoclonais nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados. 59

Figura 10. Diversidade do repertório dos linfócitos T dos pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico. 61

Figura 11. Porcentagem de famílias policlonais, ‘‘*skewed*’’ e monoclonais nos pacientes com doença falciforme antes e após o TCTH alogênico.....62

Figura 12. Diversidade do repertório de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que tiveram ou não DECH aguda, reativação de CMV, perda do enxerto e incompatibilidade ABO.....64

Figura 13. Neogênese de células B nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados.....69

Figura 14. Neogênese de células B nos pacientes com anemia falciforme tratados com transfusão crônica (aloimunizados e não aloimunizados). 70

Figura 15. Neogênese de células B nos pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico.....72

Figura 16. Comparação da neogênese de células T e B e diversidade do repertório de células T nos pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pacientes com doenças falciformes tratados com TCTH alogênico. 30

Tabela 2. Pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados ou sem tratamento e grupo controle saudável. 32

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados na amplificação das famílias Vβ do TCR. 36

Tabela 4. Tamanho esperado do produto de PCR da amplificação Vβ - Cβ (em pares de bases) para o segmento CDR3 de 10 aminoácidos. 38

Tabela 5. Relação de variáveis (parâmetros clínicos) em relação aos níveis de sjTREC, sjKREC e CS em pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados. 75

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
RESUMEN ..... **iii**
LISTA DE FIGURAS ..... **iv**
LISTA DE TABELAS ..... **v**

1 INTRODUÇÃO **2**
1.1 Doenças Falciformes 2
1.2 Fisiopatologia da Doença Falciforme 4
1.3 Abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento das doenças falciformes 11
1.3.1 Hidroxiuréia 11
1.3.2 Transfusão Sanguínea 13
1.3.3 Transplante de células tronco hematopoéticas 15
1.4 Reconstituição imunológica após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas 18

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE **23**

3 OBJETIVOS **26**
3.1 Objetivo geral 26
3.2 Objetivos específicos 26

4 MATERIAIS E MÉTODOS **28**
4.1 Casuística e delineamento do estudo 28
4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico 32
4.3 Extração de RNA 33
4.3.1 Eletroforese de RNA em gel de agarose 34
4.4 Transcrição reversa e validação 34
4.5 Metodologia do *TCRBV CDR3 Spectratyping* 35
4.5.1 Reação de PCR (Vβ-Cβ) para determinação das famílias Vβ do Receptor de Células T (TCR) 35
4.5.2 Reação de elongação Vβ-Cβ (*Run Off*) 36
4.5.3 Preparo das amostras e aplicação no sequenciador automático 37

4.5.4 Perfil e cálculo do tamanho da região CDR3 do TCR e da frequência das famílias Vβ pelo método de *TCRBV CDR3 Spectratyping* 37

4.6 Quantificação das moléculas *sjTREC*, *beta-TREC*, *coding joint* (*Cj*) e *sjKREC* ..40

4.6.1 Extração de DNA..... 40

4.6.2 Quantificação por PCR em tempo real 41

4.7 Análise Estatística 42

5 RESULTADOS..... 44

5.1 Resultados clínicos 44

5.1.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente 44

5.1.2 Pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas 44

5.2 Avaliação da neogênese de células T pela quantificação de moléculas de sjTREC e β-TREC 45

5.2.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente 45

5.2.2 Pacientes com doença falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas 48

5.3 Avaliação da diversidade do repertório de linfócitos T 55

5.3.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente 56

5.3.2 Pacientes com Doença Falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas 60

5.4 Avaliação da neogênese de células B pela quantificação de moléculas de *coding joint* (*Cj*) e *sjKREC* 68

5.4.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente 68

5.4.2 Pacientes com doença falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas 71

5.5 Análise multivariada 73

5.6 Comparação da neogênese de células T e B e do repertório de células T entre as diferentes modalidades terapêuticas 76

6 RESUMO DOS RESULTADOS 79

6.1 Neogênese de células T e B em pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente 79

6.2 Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas..... 80

6.3 Comparação da neogênese de células T e B e do repertório de células T entre as diferentes modalidades terapêuticas 81

7 DISCUSSÃO 83

7.1 Neogênese de células T e B e diversidade do repertório de células T em pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente 83

7.1.1 Neogênese de células T 83

7.1.2 Diversidade do repertório de células T 85

7.1.3 Neogênese de células B 90

7.2 Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico 92

7.2.1 Neogênese de células T após o TCTH alogênico 92

7.2.2 Diversidade do repertório de células T após o TCTH alogênico 97

7.2.3 Neogênese de células B após o TCTH alogênico 101

7.3 Comparação da neogênese de células T e B e do repertório de células T entre as diferentes modalidades terapêuticas 103

8 CONCLUSÃO 106

REFERÊNCIAS 108

APÊNDICES 129

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Falciformes

Entre as doenças genéticas que mais acometem os humanos estão os distúrbios hereditários das hemoglobinas (também chamados de hemoglobinopatias), atingindo cerca de 7% da população mundial (MCCAVIT, 2012). As doenças falciformes (DF) são causadas pela herança de alelos que possuem uma mutação pontual na posição 6 do gene que codifica a cadeia da β-globina, levando a substituição de adenina por timina (GAG->GTG) nessa posição. Consequentemente, ocorre a codificação de uma valina ao invés de um ácido glutâmico, originando a hemoglobina (Hb) S anormal (HbS), a qual apresenta alterações físico-químicas estruturais em relação a hemoglobina A (HbA) normal (FRENETTE; ATWEH, 2007; MCCAVIT, 2012; WARE, 2013).

A forma mais comum e mais severa de doença falciforme é a forma homozigota (SS) do gene da HbS devido a herança dos alelos de ambos os pais, denominada ‘‘anemia falciforme’’ (AF). Outras combinações heterozigóticas sintomáticas com o gene da HbS também podem ocorrer com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD) e β-talassemia, gerando respectivamente, a hemoglobinopatia SC, a hemoglobinopatia SD e a S/beta-talassemia. Apesar das particularidades que as distinguem e de graus variados de gravidade, todas estas doenças têm um espectro epidemiológico e de manifestações clínicas e hematológicas superponíveis (FRENETTE; ATWEH, 2007; MCCAVIT, 2012; WARE et al., 2017; ZAGO; PINTO, 2007).

Desta forma, uma mutação pontual em um único gene, está relacionada a uma doença complexa, que apresenta uma grande diversidade de fenótipos. Supõe-se que outras alterações genéticas ou epigenéticas, prevalência de doenças infecto-contagiosas, desnutrição, condições socioeconômicas e acesso à assistência médica são fatores que podem contribuir para variabilidade clínica, gravidade, complicações e resposta a tratamento (ADEGOKE et al., 2017; FRENETTE; ATWEH, 2007; KOHNE, 2011; WARE, 2013; WARE et al., 2017).

Em situações de baixa oxigenação sanguínea, as moléculas de hemoglobina anormais (HbS) podem sofrer polimerização, ocasionando o fenômeno de ‘falcização’ que encurta a vida média dos eritrócitos, além de causar vaso-oclusões,

episódios de dor e lesão de múltiplos órgãos. Praticamente todos os órgãos podem ser afetados pelas obstruções microvasculares (vaso-oclusão) causadas pelos eritrócitos falciformes. Os pacientes com DF podem complicações agudas da doença, denominadas crises de falcização (crises vaso-oclusivas, hemolíticas e síndrome de sequestro) (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

A evolução das DF é marcada por um amplo espectro de manifestações clínicas, complexas e extremamente variáveis, que atingem a maioria dos órgãos. Algumas dessas complicações, tais como as úlceras de pernas, retinopatia, necrose óssea (especialmente da cabeça do fêmur) e cálculos de vesícula, não reduzem a expectativa de vida do paciente, entretanto comprometem consideravelmente sua qualidade de vida. Outras alterações, porém, envolvem diretamente a função de órgãos vitais e estão associadas ao risco de morte, destacando-se as infecções, complicações cardiorrespiratórias (especialmente a insuficiência cardíaca congestiva e a síndrome torácica aguda), insuficiência renal e os acidentes vasculares cerebrais (FRENETTE; ATWEH, 2007; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; WARE et al., 2017; ZAGO; PINTO, 2007). Além disso, complicações iatrogênicas e psicológicas contribuem significativamente para a morbidade da doença (ODIÈVRE et al., 2011; STUART; NAGEL, 2004).

A anemia nos pacientes deve-se principalmente devido a menor sobrevida das hemácias. Trata-se de uma anemia hemolítica com elevação dos reticulócitos, aumento de bilirrubina e hiperplasia eritróide da medula óssea. Além da hemólise, outros fatores podem contribuir para a gênese da anemia ou seu agravamento: carência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas e esplenomegalia. Sintomas e consequências da anemia, porém, fazem parte da evolução das DF, em especial da AF: retardo da maturação sexual, sobrecarga cardíaca com insuficiência cardíaca na terceira década de vida e contribuição para a formação de úlceras nas pernas (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A saúde e sobrevivência de crianças com DF melhorou consideravelmente com o advento de programas de triagem neonatal, profilaxia com penicilina, imunização pneumocócica e educação sobre as complicações da doença. Entretanto, a expectativa de vida útil projetada dos adultos afetados não melhorou além da quinta década, embora um uso mais amplo de medicamentos e novas abordagens terapêuticas oferecem esperança de diminuição da mortalidade e

melhoria da qualidade de vida. Apenas em 2006, a AF foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema mundial de saúde pública e, atualmente, maior atenção vem sendo dada a doença, contudo, dados epidemiológicos ainda são escassos. A AF afeta principalmente a população afro-descendete e ainda é negligenciada pelas políticas de saúde em vários países (ODIÈVRE et al., 2011; PIEL et al., 2013; WARE, 2013; WARE et al., 2017).

1.2 Fisiopatologia da Doença Falciforme

O conjunto de alterações clínicas das DF é diretamente relacionado à anormalidade molecular que culmina na produção da HbS pelos progenitores eritroides. A substituição de adenina por timina (GAG->GTG) levando a codificação do aminoácido valina ao invés de ácido glutâmico, na cadeia da β-globina, causa uma modificação estrutural na molécula de hemoglobina, responsável por profundas alterações nas propriedades físico-químicas da molécula no estado desoxigenado. O evento primário da polimerização da HbS desoxigenada culmina na falcização, que é a mudança da forma normal da hemácia para a forma de foice ou “meia lua”, resultando em alterações na reologia dos eritrócitos e na membrana eritrocitária (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A formação de polímeros de HbS dentro das hemácias tem como consequência múltiplas alterações celulares, sendo as mais importantes o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular, a formação de polímeros da Hb com proteínas da membrana (em especial, a banda 3) e a exposição de moléculas da membrana eritrocitária (tais como fosfatidilserina e CD36). Essas modificações podem provocar aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que envolvem granulócitos e plaquetas, enrijecem a membrana eritrocitária, encurtam a sobrevida dos eritrócitos em circulação, provocam lesões microvasculares, causam depleção de óxido nítrico (NO) que contribui para vasoconstrição, amplificação da ativação da inflamação e coagulação e vaso-oclusões na microcirculação (BARRETT-CONNOR, 1971; CHIRICO; PIALOUX, 2012; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; ZAGO; PINTO, 2007).

As vaso-oclusões, por sua vez, causam isquemia, resultando em uma cascata adicional de eventos, que incluem hemólise, disfunção endotelial, inflamação,

hipercoagulabilidade, estresse oxidativo, dano por reperfusão e hipoxemia. Consequentemente, esses processos causam lesões em múltiplos órgãos, resultando em manifestações clínicas agudas, tais como dores, infecções, síndrome torácica aguda (STA) e complicações crônicas tais como falência renal, doença cerebrovascular e hipertensão pulmonar (BARRETT-CONNOR, 1971; CHIRICO; PIALOUX, 2012; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; ZAGO; PINTO, 2007).

A AF caracteriza-se por manifestações inflamatórias crônicas, sendo que grande parte das manifestações clínicas deve-se a três mecanismos fisiopatológicos inter-relacionados: a) adesão de eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas ao endotélio vascular; b) fenômenos inflamatórios crônicos, exacerbados por episódios agudos; c) produção de intermediários inflamatórios, como citocinas e alterações do metabolismo de NO (ODIÈVRE et al., 2011; ZAGO; PINTO, 2007).

O endotélio vascular constitui um fator muito importante nos processos inflamatório e de vaso-oclusão nos pacientes falciformes. As células endoteliais participam na manutenção da hemostasia e produzem NO, substância vasodilatadora que regula o tônus vascular. Quando ocorre lesão do endotélio, há uma exposição de fator tecidual, que desencadeia a cascata da coagulação e libera multímeros de von Willebrand que participam da hemostasia primária. A hemólise crônica de eritrócitos falciformes libera hemoglobina livre e arginase, enzima que degrada o substrato usado para a produção de NO, a arginina plasmática. A depleção de substrato e o sequestro de NO causam redução local desta substância e vasoconstrição. O fenômeno de vasoconstrição, por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo e favorece a falcização das hemácias falciformes. Portanto, tem sido proposto que a deficiência de NO seja a causa principal da vasculopatia e da disfunção endotelial que ocorre na DF (MCCAVIT, 2012; ODIÈVRE et al., 2011; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; ZAGO; PINTO, 2007). Adicionamente, células endoteliais ativadas expressam as moléculas VCAM-1 (*vascular-cell adhesion molecule 1*) e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), que facilitam e aumentam a adesão de células sanguíneas ao endotélio. Muitas dessas alterações na expressão de moléculas de adesão desaparecem ou se reduzem durante o tratamento com hidroxiureia (AKINSHEYE; KLINGS, 2010a; ODIÈVRE et al., 2011; ZAGO; PINTO, 2007).

Concomitante com a produção de NO, as células endoteliais também liberam o peptídeo pró-inflamatório endotelina-1, um potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e veias. Durante quadros inflamatórios agudos, como síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), coagulação intravascular disseminada e

sepse, os níveis plasmáticos de endotelina-1 estão elevados, assim como nos pacientes com DF. A endotelina-1 também aumenta as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis e estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, GC-SF e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos (ODIÈVRE et al., 2011; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; WARE et al., 2017)

Em relação aos eritrócitos falciformes, eles expressam maior número de moléculas de adesão (fosfatidilserina, CD36, CD47, CD49d e BCAM/LU) na superfície externa da membrana celular do que eritrócitos normais. Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, amplificando o processo de vaso-oclusão. As moléculas CD36 e o CD49d estão expressas apenas nos reticulócitos. Como as hemácias jovens são mais aderentes e estão presentes em maior número em pacientes com DF, elas desempenham papel importante no fenômeno de vaso-oclusão. O CD36 é um receptor glicoprotéico que se liga a várias proteínas da matriz extracelular, como a trombospondina (TPS), que intermedeia a ligação da célula com o endotélio. O antígeno de ativação tardia (VLA-4 ou α4β1) é uma integrina que promove a interação entre célula-endotélio via ligação direta com a VCAM-1, expressa no endotélio, ou via fibronectina da matriz extracelular. O marcador CD49d corresponde à cadeia α4 dessa integrina (RAPHAEL; VICHINSKY, 2005; WARE et al., 2017; ZAGO; PINTO, 2007).

Um dos fenômenos de adesão mais bem elucidados na AF é decorrente da interação dos eritrócitos falciformes com a laminina via receptor de BCAM/LU (*basal cell adhesion molecule*). O BCAM/LU é uma proteína produzida pelo gene do grupo sanguíneo Lutheran que promove interações entre célula-célula e célula-matriz extracelular. O CD47 é um glicoproteína transmembrana que em eritrócitos, parece estar associada ao complexo Rh. Ele serve como receptor da trombospondina (TSP) que faz a ligação entre eritrócito e endotélio via receptor da vitronectina (αvβ3), facilitando a quimiotaxia de leucócitos (revisado por ODIÈVRE et al., 2011; REES et al., 2012; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A fosfatidilserina (PS) é uma molécula de adesão presente em maior quantidade na parte interna da membrana celular do que exposta na superfície de eritrócitos normais, mas em uma parcela dos eritrócitos falciformes essa proporção se inverte. Estudos já comprovaram que eritrócitos com maior exposição dessa molécula na superfície celular possuem potencial de adesão celular três vezes maior

que eritrócitos normais. A PS liga-se ao receptor da vitronectina (αvβ3) do endotélio via TSP. Alguns trabalhos correlacionaram exposição de PS nos eritrócitos falciformes à geração de trombina, substância necessária para formação de coágulos de fibrina, confirmando a importância da exposição da PS como um dos principais determinantes de aderência celular e da ativação da cascata da coagulação nas crises vaso-oclusivas (ODIÈVRE et al., 2011; ZAGO; PINTO, 2007).

Os neutrófilos ativados por citocinas inflamatórias são recrutados para o sítio inflamatório, aumentam a produção de peróxidos (que lesa o endotélio vascular) e expressam maior quantidade de moléculas de adesão em sua superfície (CD64, integrinas αLβ2 e αMβ2, receptor da trombospondina ou CD36, moléculas de adesão leucócito-endotélio [L-selectinas], leucócito-plaquetas [ligante da P-selectina - PSGL-1), facilitando a adesão ao endotélio, outros neutrófilos, plaquetas e eritrócitos falciformes, aumentando os fenômenos vaso-oclusivos observados nos pacientes. As plaquetas, estimuladas pela presença de citocinas inflamatórias, liberam multímeros de von Willebrand estocados em seus grânulos-α, os quais favorecem as ligações entre plaquetas e entre células endotelais e eritrócitos falciformes, via receptor da vitronectina e receptor do complexo Gp1b-IX-V. As plaquetas ativadas nos pacientes com DF expressam maior quantidade de P-selectina (CD62p), favorecendo a ligação com o endotélio e com neutrófilos via PSGL-1 e de αvβ3 (CD61), receptor de vitronectina (ODIÈVRE et al., 2011; REES et al., 2012).

Eventos decorrentes da anemia hemolítica nos pacientes com DF podem aumentar os processos inflamatório e oxidativo. A lise dos eritrócitos falciformes nos vasos sanguíneos, leva a liberação de altas quantidades de hemoglobina que, quando não neutralizada rapidamente por proteínas específicas, pode causar danos importantes nos espaços vasculares e perivasculares. Um processo hemolítico intenso pode sobrecarregar os mecanismos de imunidade inata e a hemoglobina livre pode reagir com NO através de diferentes vias, formando hemoglobina férrica ($Hb\text{-}Fe^{3+}$) e nitrato (NO^{3+}) (AKINSHEYE; KLINGS, 2010; MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016; SCHAER et al., 2014).

A Hb-Fe3+ pode acumular-se nos tecidos e na circulação sanguínea levando a liberação de heme, que constitui uma molécula altamente inflamatória e hidrofóbica. Entre os múltiplos efeitos inflamatórios provocados por esta molécula, está a ativação dos leucócitos e sua migração, aumento de moléculas de adesão e

de citocinas, com aumento da peroxidação lipídica e de moléculas oxidantes (BELCHER et al., 2014; DUTRA et al., 2014; SCHAER et al., 2013).

O heme pode atuar como um DAMP (padrões moleculares associados ao a danos), levando a formação de inflamassomas em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS), induzindo a expressão do receptor *toll-like* tipo 4 (TLR-4) e a produção de TNF-α. Os inflamassomas constituem complexos citosólicos compostos por receptores do tipo NOD (NLR), cuja ativação leva a célula sofrer um processo programado de morte celular necrótica e inflamatória, chamado de piroptose, mediado por caspases inflamatórias (BELCHER et al., 2014; DUTRA et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2007).

O tipo de inflamassoma mais estudado atualmente e com implicações em diversas doenças descritas na literatura, é o NLRP3. O inflamassoma NLRP3 e a expressão da citocina pro-IL-1β aumentam nas células do sistema imune inato após ativação de NF-κB por agonistas de TLR e TNF-α (LEEMANS; CASSEL; SUTTERWALA, 2011). Um estudo conduzido por Dutra e colaboradores (2014), demonstrou que o heme é um indutor do processamento de pro-IL-1β através da ativação do inflamassona NLRP3 em macrófagos. O mecanismo molecular ilustra que a ativação de NLRP3 requer fosforilação da enzina tirosina quinase do baço, a Syk (*spleen tyrosine kinase*), que é responsável pela transdução de sinal de imunoreceptores clássicos, espécies reativas de oxigênio (ROS) e efluxo de potássio. Portanto, após hemólise intensa o heme liberado é dectecado por receptores do sistema imune inato ativando a resposta inflamatória em condições estéreis, e infecciosas e levando a secreção de IL-1β (DUTRA et al., 2014).

Outro estudo também avaliou *in vitro* a ativação de NLPR3 em monócitos por eritrócitos falciformes, via estimulação de TLR e NLR, e consequente aumento da secreção de IL-1β e leucotrienos (LTB4). O tratamento com hidroxiuréia não reduziu a produção de mediadores inflamatórios ou evitou a ativação do inflamassoma (PITANGA et al., 2016). Portanto, os efeitos da ativação do NF-κB mediada por LPS e produção de mediadores inflamatórios em macrófagos podem ser potencializados pelo heme, através da geração de ROS mediada pela enzima Syk, demonstrando um papel importante do heme na amplificação da resposta imune inata à moléculas microbianas (FERNANDEZ et al., 2010).

O heme também pode ligar-se a fatores de transcrição, como por exemplo o Bach-1, um regulador transcricional da heme-oxigenase (OH-1), sendo que sua

hidrofobicidade faz com que o heme possa se inserir e danificar as bicamadas lipídicas e organelas, levando a oxidação de proteínas e lipídios e produção de moléculas reativas como as lipoproteínas de baixa densidade extremamente inflamatórias e citotóxicas, que resulta em uma série de reações oxidantes com produção de ROS (JENEY et al., 2002; MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016; WAGENER, 2003).

Em doenças hemolíticas como a DF, o heme liberado no plasma pode interagir e afetar a atividade de diferentes proteínas plasmáticas e homeostáticas (ROUMENINA et al., 2016). Seu potencial pró-oxidativo pode desencadear a ativação excessiva e desregulação do sistema complemento, bem como alterar as especificidades de ligação das imunoglobulinas aos antígenos (DIMITROV et al., 2007; FRIMAT et al., 2013; HADZHIEVA et al., 2015; MCINTYRE; WAGENKNECHT; FAULK, 2006).

O baço é o órgão primariamente afetado na AF e possui um papel singular como causa de morte na AF. A maioria dos pacientes sofrem de asplenia funcional ou ‘autoesplenectomia’, decorrente das crises de sequestro esplênico caracterizadas pela congestão do baço por hemácias falciformes, que evolui para trombose e múltiplos infartos e consequente fibrose e atrofia do órgão. Estas crises podem ocorrer nos primeiros 2-5 anos de vida, precedendo a diminuição e perda da função do baço. O sequestro esplênico é a segunda causa de morte na primeira década de vida e o tratamento deve ser imediato buscando restaurar a volemia através da transfusão de hemácias. A prevenção pode ser feita por meio de transfusões crônicas ou de esplenectomia cirúrgica (BOOTH; INUSA; OBARO, 2010; ODIÈVRE et al., 2011; OWUSU-OFORI; HIRST, 2017; WILLIAM; CORAZZA, 2007).

A principal consequência da asplenia funcional ou esplenectomia cirúrgica é o aumento do risco de infecções graves, especialmente em crianças até quatro anos de idade, destacando-se a meningite bacteriana causada por pneumococos em 78% dos casos. Outros tipos de infecções frequentes são a pneumonia, osteomielite, septicemia e infecção urinária. As bactérias envolvidas são aquelas que caracteristicamente possuem envoltório de polissacarídeos como: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp., Staphylococcus aureus*, além de *Mycoplasma sp.* O avanço na prevenção das infecções por meio de medidas profiláticas com penicilina e vacinas conjugadas diminuiu o risco de morte na primeira infância. Entretanto, os

pacientes com DF ainda possuem risco infeccioso aumentado devido a hipofunção esplênica desde os primeiros meses de vida. Outras possíveis causas da suscetibilidade aumentada as infecções apresentadas pelos pacientes com AF ainda não são totalmente compreendidas (BOOTH; INUSA; OBARO, 2010; ODIÈVRE et al., 2011; OWUSU-OFORI; HIRST, 2002; WILLIAM; CORAZZA, 2007).

A função esplênica gravemente reduzida e prejudicada nos pacientes com DF pode levar a alterações imunológicas importantes pois a zona marginal do baço abriga uma população celular única, as células B de memória IgM^+, que produzem anticorpos naturais envolvidos na opsonização/eliminação de bactérias encapsuladas. O papel importantíssimo do baço no início da resposta imunológica contra bactérias encapsuladas é demonstrado pela redução das células B de memória IgM^+ após sua remoção, especialmente as células $CD27^+IgM^{high}IgD^{low}$ que produzem anticorpos contra antígenos polissacarídeos (CAMERON et al., 2011; KRUETZMANN et al., 2003; WASSERSTROM et al., 2008; WILLIAM; CORAZZA, 2007). Portanto, a baixa função esplênica encontrada nos pacientes falciformes acarreta em um risco aumentado de infecções por bactérias encapsuladas devido a resposta diminuída à vacinas com antígenos sacarídeos, mas não peptídicos (KRUETZMANN et al., 2003).

Embora a esplenectomia tenha sido associada ao decréscimo de células B de memória $CD27^+$, o número total de células B é normal, sendo observado um aumento do número de células B naive em relação a indivíduos saudáveis e uma diminuição de resposta ao estímulo com CpG com consequente incapacidade de formar células produtoras de anticorpos (CAMERON et al., 2011; GIORDANO et al., 2016). Em modelos animais de DF, alterações histológicas e morfológicas esplênicas foram relacionadas a redução de imunoglobulinas da classe IgA, IgM e IgG2b no soro e diminuição de células B circulantes (SZCZEPANEK et al., 2012).

Defeitos funcionais e quantitativos foram observados em células progenitoras hematopoéticas em pacientes com β-talassemia que realizaram transplante de medula óssea. Observou-se nos períodos iniciais um potencial clonogênico alterado de células progenitoras além de sua redução significativa, sugerindo alterações intrínsecas das células progenitoras ou danos secundários ao processo inflamatório dentro do microambiente da medula óssea, que podem influenciar a hematopoiese e a imunidade (ISGRÒ et al., 2010). Supõe-se que esses defeitos também ocorram em paciente com DF.

Atualmente, existem poucos estudos que avaliaram a imunidade adaptativa na DF. Estes trabalhos indicam que a doença em si e os tratamentos utilizados podem induzir anormalidades nas células T e B (revisado por BALANDYA et al., 2016). Distúrbios encontrados, como redução na proporção de células T CD4+ e CD8+ circulantes foram altamente associados à asplenia funcional e esplenectomia em pacientes com AF (KRUETZMANN et al., 2003).

Foram descritas alterações importantes em células T reguladoras (Tregs) em pacientes com DF, tais como maior ativação, maior expressão de CTLA-4 e baixa expressão de HLA-DR em comparação a indivíduos sadios. Além disso, defeitos na migração de Tregs devido a baixa expressão de CCR7 também foram relatados (VINGERT et al., 2014).

De forma geral, o espectro das alterações imunológicas, principalmente da imunidade adaptiva na DF é amplo, envolvendo mecanismos humorais e celulares. Sendo o timo um órgão de extrema importância na prevenção e controle de infecções pela geração de novas células T, ainda não existem dados na literatura como ou se a fisiopatologia da doença afeta sua função. Portanto, são importantes estudos que avaliem mais detalhadamente a funções do timo, da medula e da resposa imune em pacientes com DF.

1.3 Abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento das doenças falciformes

1.3.1 Hidroxiuréia

Entre os tratamentos mais utilizados estão a hidroxiuréia (HU) e a transfusão sanguínea (TF). A introdução da HU no tratamento da AF trouxe uma contribuição significativa, especialmente com relação as crises vaso-oclusivas, com redução significativa na taxa média anual de eventos dolorosos e diminuição de episódios de STA. Sintetizada pela primeira vez na Alemanha em 1869, por Dressler e Sterin, a hidroxiuréia é um análogo da ureia, utilizada inicialmente no controle de doenças mieloproliferativas. Constitui uma droga citotóxica e antineoplásica, com ação anti-metabólica inibidora da síntese de DNA. A HU leva a inibição da ribonucleotídeo redutase (enzima catalizadora da formação de deoxirribonucleotídeos dos ribonucleotídeos), acarretando na supressão da proliferação de precursores eritróides com ciclagem mais rápida, favorecendo a formação dos precursores mais

primitivos de ciclagem mais lenta, que contêm mais hemoglobina fetal (HbF). O aumento dos níveis de HbF nos eritrócitos falciformes está diretamente associado ao melhor prognóstico da doença (CANÇADO et al., 2009; DRESSLER WFC AND STERIN R, 1869; KEIKHAEI; YOUSEFI; BAHADORAM, 2015).

No entanto, além de aumentar os níveis de HbF, a HU leva a redução do número de leucócitos e plaquetas e diminuição da expressão de moléculas de adesão (tal como o VCAM-1) (LAURANCE et al., 2010; STEINBERG et al., 2003). Seu metabolismo resulta na produção de NO, compensando a redução deste no processo de hemólise crônica (PLATT et al., 1984; WONG et al., 2014). Além disso, a medicação também possui efeitos moduladores sobre a doença, envolvendo modificações epigenéticas e participação em vias de sinalização pós-transcricionais, tais como regulação por microRNAs (PULE et al., 2015).

Com relação a alterações imunológicas, um estudo demonstrou que o tratamento prolongado com HU em crianças de até 2 anos de idade levou a diminuição do número absoluto de linfócitos totais, linfócitos T $CD4^+$ e de memória $CD4^+CD45RO^+$ e $CD8^+CD45RO^+$. Porém, a HU levou ao aumento de linfócitos T $CD8^+$ naive em comparação a um grupo tratado com placebo, embora estes valores ainda estejam dentro dos níveis normais. O estudo também avaliou a resposta à vacinação pneumocócica através da quantificação de anticorpos específicos para sarampo, caxumba e rubéola, não encontrando diferenças entre os grupos, indicando que a imunização é efetiva apesar do uso de HU (LEDERMAN et al., 2014). Resultados similares encontrados por Nickel et al. (2015) mostaram que o tratamento com HU aumenta os linfócitos T $CD4^+$, bem como melhora o status imunológico dos pacientes em relação aos pacientes tratados com TF (NICKEL et al., 2015).

Estudos demonstraram que a HU é capaz de reduzir a expressão de TNF-α por linfócitos e a ativação de mastócitos em pacientes com AF. Em indivíduos HIV+, a HU é capaz de reduzir a ativação imunológica e melhorar as respostas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ específicas contra o vírus. Estes achados demonstram que ocorrem alterações importantes na expressão de genes de vários mediadores anti-inflamatórios em pacientes com AF tratados com HU, levando a normalização do status imunológico e diminuição da inflamação nestes pacientes (AFRIN, 2014; CASTILHOS et al., 2015; KEIKHAEI et al., 2013; LANARO et al., 2009; LÓPEZ et al., 2004).

Alguns efeitos adversos do tratamento com HU são comumente relatados, como a mielossupressão, genotoxicidade e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (CANÇADO et al., 2009; LAURANCE et al., 2010; STEINBERG et al., 2003). No Brasil, é preconizado o uso de HU em crianças com idade superior a 3 anos (CANÇADO et al., 2009). Um ensaio clínico americano (BABY HUG), investigou a eficácia da medicação em crianças de 9-18 meses. Apesar da mielosupressão leve esperada, o uso de HU não foi associado ao risco aumentado de infecções graves e os dados forneceram informações importantes de segurança e eficácia para considerar a terapia em crianças em seus primeiros meses de vida (THORNBURG et al., 2012).

De forma geral, estudos clínicos tem demonstrado que o tratamento continuado com HU está relacionado com diminuição dos episódios dolorosos, diminuição do número de hospitalizações e transfusões sanguíneas, e melhora da qualidade de vida e maior sobrevida nestes pacientes (BRANDOW; PANEPINTO, 2010; CANÇADO et al., 2009; CANÇADO; JESUS, 2007; KEIKHAEI; YOUSEFI; BAHADORAM, 2015; MCGANN; WARE, 2015; PULE et al., 2015; SILVA-PINTO et al., 2013).

1.3.2 Transfusão Sanguínea

A terapia com transfusão sanguínea é atualmente a mais utilizada para a maioria das complicações crônicas e agudas em pacientes com DF mais graves. Pacientes com DF necessitam de transfusões principalmente em complicações agudas, como, por exemplo, crise de sequestro esplênico, AVC, crise aplástica, preparação para cirurgias, gravidez e STA (ADAMS; BRAMBILLA, 2005; KELLY et al., 2016). A terapia regular com transfusões diminui significativamente a incidência de complicações cerebrovasculares, lesão neurológica mais comum especialmente em crianças (DEBAUN et al., 2014).

A transfusão pode ser realizada por meio da transfusão simples ou transfusão de troca. Transfusão simples é indicada sempre que houver queda do hematócrito visando restaurar a compensação hemodinâmica produzida pela anemia (ZAGO; PINTO, 2007). Transfusão de troca pode ser feita manualmente, onde há a retirada de sangue do paciente seguida por transfusões simples, ou por meio de eritrocitaférese, realizada em processadores automáticos. A eritrocitaférese tem sido

cada vez mais utilizada e oferece vantagens pois permite o ajuste rápido e simultâneo do hematócrito e do nível de HbS além da capacidade de limitar a sobrecarga de ferro (HILLIARD et al., 1998; QUIROLO et al., 2015). Os pacientes devem ser cuidadosamente monitorados, devidos aos riscos e complicações inerentes às transfusões sanguíneas, tais como a sobrecarga de ferro, reações transfusionais e aloimunização (KELLY et al., 2016).

Aloimunização é uma complicação clinicamente significativa na AF, levando aos desafios na identificação de tipos sanguíneos compatíveis com dos pacientes (NICKEL et al., 2016; TELEN et al., 2015). Aloanticorpos não detectados apresentam um risco caso os pacientes recebam transfusões antígeno-positivas, resultando em reações hemolíticas, e, por outro lado, pacientes com história de um ou mais aloanticorpos possuem risco aumentado de formar novos aloanticorpos com subsequentes exposições transfusionais (HIGGINS; SLOAN, 2008; PETZ et al., 1997; YEE et al., 2017).

É importante salientar que várias alterações na composição da imunidade inata e adaptativa já foram observadas em pacientes com AF tanto aloimunizados quanto não aloimunizados como por exemplo o aumento na proporção de células T $CD4^+$ de memória (VINGERT et al., 2015). A imunomodulação provocada pelas repetidas transfusões parece contribuir para diminuição da capacidade de responder a vacinação pelo vírus H1N1 em crianças com AF, aumentando o risco de infecções (KAPLAN et al., 1984; PAHWA et al., 1985; PUROHIT et al., 2012).

Entre as anormalidades imunológicas mais proeminentes em pacientes com DF aloimunizados, pode-se citar o aumento de células Th2 ($IL\text{-}4^+$) e Th17 ($IL\text{-}17^+$), redução da atividade de Tregs (FRIMAT et al., 2013; REITER et al., 2002; VINGERT et al., 2015), além de um aumento na proporção das células T CD4+ de memória central e efetora (NICKEL et al., 2015). Um perfil mais inflamatório já foi descrito em pacientes com DF aloimunizados em relação a pacientes não aloimunizados, caractetizado por menores níveis da enzima heme oxigenase (HO-1) em monócitos e maior concentração de IL-12 (ZHONG et al., 2014).

Um distúrbio na homeostase de células B foi descrito em pacientes com DF regularmente transfundidos, caracterizado pelo aumento da frequência dos linfócitos B $CD19^+$ e diminuição de células B reguladoras (Bregs) ($CD19+CD24^{high}CD38^{high}$), que são produtoras da citocina aintiinflamatória IL-10, em relação a um grupo de indivíduos afrodescendentes saudáveis. Além disso, as Bregs de pacientes

aloimunizados quando estimuladas, apresentaram menor capacidade funcional de produzir IL-10, indicando uma desregulação imunológcia devida ao estado inflamatório crônico destes pacientes (BAO et al., 2013).

A sobrecarga de ferro decorrente das transfusões crônicas é outra complicação frequente observada nos pacientes com DF. O ferro em excesso pode depositar-se gradativamente em órgãos e tecidos, especialmente no fígado, baço, miocárdio e medula óssea, ocasionando lesões celulares e teciduais. A terapia com quelação de ferro é indispensável para sobrevida dos pacientes, considerando que quanto maior o acúmulo de ferro, maiores os riscos de morbidade e mortalidade. A quelação visa prevenir o acúmulo patológico de ferro no organismo, devendo ser iniciada preferencialmente antes de instalada sobrecarga (CANÇADO, 2007).

Na indicação transfusional na AF, em geral, o objetivo é manter o nível de HbS abaixo de 30%. A melhora clínica em pacientes com hipertensão pulmonar e priaprismo é significativa e imediata logo após uma primeira transfusão, já que parece estar relacionada aos níveis de HbS (TSITSIKAS et al., 2017). Para o controle e a prevenção de eventos neurológicos (acidente vascular isquêmico e alterações de doopler transcerebral), hipertensão pulmonar e síndrome torácica aguda redicivante, o uso de transfusão crônica ainda parece ser o tratamento de escolha (ADAMS et al., 1998; KELLY et al., 2016).

1.3.3 Transplante de células tronco hematopoéticas

Atualmente, o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico é a forma de terapia celular mais estabelecida e reconhecida mundialmente, constitui a única opção curativa em pacientes com hemoglobinopatias, incluindo talassemias e DF, sendo que mais de 250 pacientes já foram transplantados em estudos clínicos. O objetivo destes estudos clínicos iniciais foi definir os riscos e os benefícios da terapia celular e compreender a história natural da doença após o TCTH alogênico. Após uma mediana de cinco anos de seguimento, a sobrevida global e a sobrevida livre de doença foram de aproximadamente 90%-95% e 80%-85%, respectivamente, para pacientes com doador HLA compatível em todos os estudos (AL JEFRI, 2011; BERNAUDIN et al., 2007; FERRANDO-MARTÍNEZ et al., 2010; GAZIEV; LUCARELLI, 2011; HSIEH; FITZHUGH; TISDALE, 2011; KHOURY; ABBOUD, 2011; LUCARELLI et al., 2012; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Recentemente foram publicados os dados de uma pesquisa retrospectiva que avaliou os resultados clínicos de pacientes com DF após TCTH alogênico HLA-idêntico entre irmãos, que mostrou uma sobrevida global de 92,9%. No entanto, vale ressaltar que a sobrevida diminuiu conforme o aumento da idade dos pacientes no momento do transplante (GLUCKMAN et al., 2017).

Embora o TCTH alogênico esteja sendo amplamente utilizado como uma terapia efetiva e curativa para várias doenças hematológicas, este pode apresentar vários efeitos colaterais e complicações graves, tais como a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), que pode ser aguda (DECHa) ou crônica (DECHc). A DECH é uma síndrome complexa em que as células T do doador desenvolvem uma resposta imunológica contra as células do receptor, resultando em dano tecidual, principalmente na pele, fígado e sistema gastrointestinal (GEERMAN; NOLTE, 2017).

O decurso fisiopatológico da DECH ocorre incialmente através da ativação do sistema imunológico, em especial de células apresentadoras de antígenos (APCs); seguido pela ativação, proliferação, diferenciação e migração de células efetoras, culminando na destruição de tecidos alvos. Antes do TCTH, no período de condicionamento (pré-transplante), os quimioterápicos e/ou radiação utilizados podem causar dano tecidual no hospedeiro com consequente liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (denominada *cytokine storm* em inglês) e ativação do sistema imunológico, consistindo na primeira fase da DECH. Já após o TCTH, as células T do doador reconhecem os antígenos apresentados pelas APCs ativadas do receptor, tornando-se também ativadas, resultando no recrutamento de mais células efetoras, como células NK e macrófagos, e no desenvolvimento da resposta imunológica contra células do hospedeiro (BERES; DROBYSKI, 2013; FEDORIW et al., 2012; FERRARA; REDDY, 2006; PACZESNY et al., 2013; SHLOMCHIK, 2007; ZHANG et al., 2016).

Historicamente, DECHa foi definida como uma manifestação de rejeição que ocorria nos primeiros cem dias após o TCTH, enquanto a DECHc ocorria após este período. No entanto, nos últimos anos, houve o reconhecimento de manifestações clínicas de DECH fora de um período delineado, sendo que novos critérios e consensos clínicos têm refinado as definições tanto de DECHa quanto de DECHc, abordando inclusive a sobreposição entre estas duas condições (FILIPOVICH et al., 2005; PAVLETIC; VOGELSANG; LEE, 2015; TOUBAI et al., 2016).

As manifestações clínicas típicas de DECHa incluem erupção cutânea e aumento de bilirrubina com icterícia decorrente dos danos nos ductos biliares levando à náusea, vômitos, diarreia e dores abdominais. O diagnóstico depende da avaliação dos órgãos alvos através de análise clínica, laboratorial e biópsia (ZEISER; BLAZAR, 2017). A pele é o órgão mais frequente e primariamente afetado, seguida pelo trato gastrointestinal e fígado. A gravidade da DECHa é classificada de acordo com a extensão de acometimento dos órgãos-alvo, sendo que o grau I é considerado leve; grau II é considerado moderado; grau III considerado grave e grau IV é considerado o mais grave (HARRIS et al., 2016).

Estudos recentes sobre os mecanismos de lesão teciduais destacam interações complexas entre diferentes tipos de células efetoras com as células alvo nos tecidos do hospedeiro, sugerindo que alterações na homeostase intestinal, a microbiota e o metaboloma podem modular a gravidade da DECHa (TESHIMA; REDDY; ZEISER, 2016). Através de estudos com camundongos, observou-se que em sua fase inicial, o processo inflamatório com liberação de DAMPs pode levar a ativação do inflamassoma NLRP3 com aumento de IL-1β e IL-18 (JANKOVIC et al., 2013). Posteriormente ocorre a ativação e expansão de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ que reconhecem APCs expressando peptídeos MHC e/ou antígenos menores de histocompatibilidade do hospedeiro (ZEISER; BLAZAR, 2017). As células T $CD8^+$ do doador causam danos nas células epiteliais medulares tímicas do hospedeiro, resultando na produção de células T $CD4^+$ autorreativas, aumentando os danos no tecido tímico e as chances de desenvolver DECHc (WU et al., 2013).

Por outro lado, a DECHc pode afetar não apenas nos tecidos epiteliais envolvidos na DECHa, mas também o sistema musculoesquelético, oral, esofágico, articular, ocular, linfohematopoético, dentre outros, tornando o diagnóstico e prognóstico difíceis, devido a heterogeneidade de manifestações clínicas (COOKE et al., 2017). As citocinas IL-6 e IL-1β liberadas devido ao dano tecidual da DECHa induzem a diferenciação de células Th17, contribuindo para o desenvolvimento da DECHc (ZEISER; BLAZAR, 2017). A segunda fase da DECHc é caracterizada por respostas imunes adaptativas, sendo que as células B possuem um papel central na patogênese da DECHc. Desregulação na reconstituição das células B e altos níveis do fator ativador de célula B (B cell-activating fator, BAFF) após o TCTH têm sido encontrados em pacientes com DECHc (ZHANG et al., 2016), além disso, as células B do doador podem aumentar a expansão clonal das células T CD4+ autorreativas

residuais do hospedeiro e direcionar a diferenciação para um perfil Th2 pró-inflamatório (YOUNG et al., 2012).

Com relação à enxertia da medula óssea (MO), ocorreu quimerismo misto estável em aproximadamente 25% das crianças que receberam TCTH de doadores HLA idênticos, sendo que nenhuma destas crianças apresentou eventos dolorosos ou outras complicações relacionadas a doença, sugerindo que um quimerismo total das células do doador pode não ser necessário para o sucesso do transplante (AL JEFRI, 2011; BERNAUDIN et al., 2007; FERRANDO-MARTÍNEZ et al., 2010; GAZIEV; LUCARELLI, 2011; HSIEH; FITZHUGH; TISDALE, 2011; KHOURY; ABBOUD, 2011; LUCARELLI et al., 2012; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

1.4 Reconstituição imunológica após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

As reações imunológicas têm um papel central no TCTH alogênico. A compreensão dos mecanismos envolvidos na enxertia/rejeição, no desenvolvimento da DECH bem como no desenvolvimento da tolerância imunológica e da reconstituição do sistema imune pós-TCTH requer conhecimento dos mecanismos imunológicos e imunogenéticos envolvidos nas respostas imunes geradas pelo TCTH (CHAUDHRY et al., 2017; VOLTARELLI, 2009).

A tolerância imunológica recíproca entre células do doador e do receptor pode ser alcançada depois de poucos meses após o TCTH, sendo que o mecanismo responsável envolve o quimerismo sustentado de células imunocompetentes do doador no organismo do receptor, resultando em reeducação tímica das células alorreativas do doador e do receptor, prevenindo seu envolvimento em respostas imunológicas patogênicas. Ao mesmo tempo, é necessário ocorrer uma reconstituição imunológica (RI) adequada para o reconhecimento e controle de agentes infecciosos e a eliminação de células patogênicas (neoplásicas, autoimunes ou portadoras de distúrbios hereditários) residuais do receptor que resistiram ao condicionamento (VOLTARELLI, 2009).

Uma RI eficiente é essencial para limitar o risco de recaída e número de infecções. A reconstituição de diferentes populações (linfócitos B, T, células NK) e células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos e células dendríticas) deve ser considerada não apenas quantitativamente mas também qualitativamente

em termos de subconjuntos funcionais (TOUBERT et al., 2012). Inicialmente após o TCTH, a diversidade das células T circulantes é limitada, com a predominância de poucos clones. Porém, a diversidade do repertório de células T pode aumentar gradualmente em 2-3 anos devido a reativação e produção tímica de novas células T com diferentes especificidades (SULLIVAN; MURARO; TYNDALL, 2010).

O timo constitui o local anatômico primário para a produção de novas células T, e possui um papel crucial na qualidade da RI e sucesso clínico após o TCTH (TOUBERT et al., 2012). A homeostase do sistema imunológico e a reconstituição de um repertório diversificado de células T periféricas constituem um processo longo e contínuo que depende de um funcional capaz de recuperar a ontogênese completa de células T (BAINS et al., 2009). Através da expressão de marcadores de superfície celular distintos e de rearranjos genéticos, os timócitos são submetidos a diferentes etapas de maturação antes de alcançar a fase final (Dik *et al*., 2005). Ao longo deste processo, é formado um repertório altamente heterogêneo de linfócitos capazes de responderem a uma grande variedade de antígenos (Nossal GV,1994, Fry *et* al., 1989; Hodes et al.,1989).

A reconstituição das células T após o TCTH ocorre por dois mecanismos distintos, um timo-dependente e outro timo-independente, havendo um balanço dinâmico entre esses dois caminhos (WILLIAMS; HAKIM; GRESS, 2007) Pelo mecanismo timo-independente ocorre expansão de células T *naive* e de memória residuais na periferia por proliferação homeostática (PH). Este é o principal mecanismo de reconstituição durante os períodos iniciais (até 1-2 anos) pós TCTH (MURARO; DOUEK, 2006; TCHAO; TURKA, 2012).

No mecanismo timo-dependente ocorre a geração de novas células T *naive* pelo tecido tímico a partir de precursores linfoides T. A avaliação da neogênese de células T pode ser realizada pela quantificação absoluta de TRECs (do inglês, *T cell receptor excision circles*). Os TRECs são moléculas circulares de DNA formadas e excisadas durante a recombinação V(D)J do receptor das células T (TCR). Podem ser do tipo signal joint-TREC (sjTREC) ou β-TRECs (DOUEK et al., 2000). Os TRECs são estáveis localizadas no citoplasma das células T que não são duplicadas durante a divisão celular. Eles são encontrados em alta concentração em células T $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ *naive*, também chamadas de células recém-emigrantes do timo, portanto são ótimos marcadores de células T *naive*. Porém, não são encontrados em células T de memória, células B e em células T γδ (DOUEK et al.,

2000). Adicionalmente, também pode ser feita a quantificação de β-TRECs, que constitui um conjunto de segmentos Dβ-Jβ, resultantes do rearranjo da cadeia β, sendo que a razão entre sjTREC/ β-TREC fornece uma taxa direta da proliferação intratímica, pois a etapa em que ocorre o rearranjo das cadeias α e β não é afetada pela proliferação das células T periféricas, proporcionando assim uma ferramenta eficaz para analisar o *output* do timo (DION et al., 2004).

Outra abordagem utilizada para avaliar se o timo está produzindo novas células T naive é a análise da diversidade do repertório de células T periféricas. O repertório pode ser avaliado antes e após o transplante em vários períodos, e também em diferentes grupos de pacientes/indivíduos. Sua avaliação pode ser feita pelo método *TCRBV CDR3 Spectratyping* ou *Immunoscope*, que consiste em reações de PCR baseada na análise da variação do tamanho da região CDR3 da cadeia β do TCR, seguida da análise dos fragmentos por sequenciamento (PANNETIER et al., 1993; PANNETIER; EVEN; KOURILSKY, 1995). Atualmente, pode ser analisado também pela tecnologia de sequenciamento gênico de nova geração (*next sequencing generation*, NGS). O repertório de células T maduras na periferia é regulado por mecanismos homeostáticos complexos, onde as células T *naïve* são mantidas pela interleucina-7 (IL-7) e pela sinalização resultante da interação do receptor de células T com o complexo principal de histocompatibilidade ("*Major Histocompatibility Complex*" - MHC) apresentando peptídeos próprios, que juntos fornecem estímulos submitogênicos de sobrevivência para as células T (WILLIAMS; HAKIM; GRESS, 2007).

Já o desenvolvimento e reconstituição dos linfócitos B é dividido em duas fases principais: uma fase inicial independente de antígeno, em que as células B precursoras se tornam linfócitos B funcionais na medula óssea, e uma fase dependente de antígeno, em que o compartimento de células B maduras é mantido por processos de reedição e seleção celular (GHIA et al., 1998). Na maturação das células B, os KRECs (do inglês*, K-deleting recombination excision circles*) são os produtos de recombinação eventos que determinam a exclusão do lócus da cadeia kappa das Imunoglobulinas (IGK) (SIMINOVITCH et al., 1985; VAN ZELM et al., 2007, 2011). Eles são gerados pelos linfócitos B que, depois de concluir o rearranjo de genes da cadeia pesada das imunoglobulinas, não conseguiram reorganizar os genes IGK em um ou ambos os alelos (BEISHUIZEN et al., 1997), nestas células, o lócus se torna não funcional. Embora este evento leve a exclusão de quaisquer

rearranjos adicionais no lócus IGK, a articulação da codificação (do inglês, *coding joint*) resultante permanece estável no genoma dos linfócitos B (VAN ZELM; VAN DER BURG; VAN DONGEN, 2007). Da mesma forma que os TRECs, os KRECs não se duplicam durante a divisão celular, permanecendo estável como DNA episssomal, porém o Cj é duplicado durante cada divisão celular. Portanto, a relação entre Cj/KREC reflete diretamente o número de divisões das células B após o evento de recombinação, proporcionando assim uma maneira única de avaliar o histórico replicativo *in vivo* dos linfócitos B maduros (VAN ZELM et al., 2007).

A avaliação da cinética da reconstituição imunológica, que inclui a neogênese de células T e B, é importantíssima para predição da resposta terapêutica e taxa de mortalidade dos transplantes de medula óssea, principalmente nos transplantes alogênicos (BARTELINK et al., 2013; WU et al., 2004). A análise molecular dos níveis de TRECs e KRECs em células mononucleares periféricas e da diversidade do repertório de células T periféricas (pela análise da variação do tamanho da região CDR3 da cadeia β do TCR) confere informações sobre a homeostase dos compartimentos de células T e B, que influencia diretamente o status imunológico dos pacientes com DF tratados por diferentes modalidades terapêuticas. Nesse contexto, não existem trabalhos na literatura acerca da reconstituição imunológica em pacientes com DF tratados após com TCTH alogênico. Recentemente, nosso grupo de pesquisa iniciou trabalhos nessa área com objetivo de esclarecer os os mecanismos e benefícios do TCTH alogênico nas DF.

2. Justificativa e Hipótese

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

No Brasil, a DF é a doença hereditária monogênica mais comum, ocorrendo predominantemente entre afrodescendentes e sendo mais frequente nos estados do Norte e Nordeste. É estimado que cerca de 4% da população geral brasileira e 6% a 10% dos afrodescendentes são portadores do traço falciforme. Com base nos dados fornecidos pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), a cada ano, nasce no Brasil cerca de 3.500 crianças com AF e 200 mil portadoras de traço falciforme (CANÇADO; JESUS, 2007; SIMÕES et al., 2010).

No contexto mundial, dois parâmetros utilizados pela Organização Mundial de Saúde para avaliar o impacto das doenças na população revelam números preocupantes sobre o impacto da DF na população. O YLD (do inglês *years lived with the disability*), que reflete a quantidade de anos que um indivíduo viveu com a DF é de 10,917, uma observação dramática sendo que para as doenças cardiovasculares o YLD é de 21,985, ou seja, apenas duas vezes mais importante do que as DF. Já o DAYL (*disability-adjusted life years*), que demonstra a soma dos potenciais anos de vida perdidos devido a mortalidade prematura, e os anos de vida produtiva perdidos devido a deficiências complicações de uma doença é de 15,640, ou seja, um número alarmante (MURRAY et al., 2012; VOS et al., 2012). As DF são muito relevantes no contexto da saúde pública com grande impacto social, portanto, diferentes estratégias terapêuticas devem que ser consideradas e avaliadas.

O uso crônico de hidroxiuréia, apesar de beneficiar um número importante de pacientes apresenta toxicidade relevante e várias limitações. O tratamento com transfusões crônicas tem que ser realizado em regime ambulatorial e leva à complicações clínicas importantes como a sobrecarga de ferro e aloimunização. O TCTH alogênico, uma forma estabelecida de terapia celular usada para outras doenças hematológicas e que vêm sendo considerada como outra opção terapêutica para DF, é a única curativa, mas que também tem suas indicações, limitações e alta toxicidade.

Dentre as manifestações clínicas das DF destacam-se crises vaso-oclusivas que levam a disfunção de vários órgãos e as infeções recorrentes. Os pacientes com DF possuem alterações imunológicas descritas, historicamente atribuídas a disfunção esplênica e ao estado inflamatório crônico (BARRETT-CONNOR, 1971; HOLTZCLAW et al., 2004; PLATT, 2000).

Vale ressatar que as vaso-oclusões na microcirculação afetam praticamente todos os órgãos dos pacientes com DF, como os rins, cérebro e pulmões, inclusive o baço e a medula óssea. Porém, se os tecidos do timo e dos linfonodos destes pacientes também são afetados pelas vaso-oclusões ainda é uma questão em aberto. Nossa hipótese é que as vaso-oclusões na microcirculação causadas pelas hemácias falciformes levam a microinfartos que podem afetar as funções do timo, linfonodos e medula óssea, órgãos responsáveis pela imunidade. Consequentemente, esses pacientes teriam uma diminuição da produção de novas células T e B, uma desregulação dos compartimentos T e B periféricos e comprometimento da imunidade nesses pacientes.

Outra questão ainda em aberto é se as diferentes modalidades terapêuticas disponíveis para tratamento dos pacientes com DF são capazes de melhorar a disfunção imunológica nesses pacientes e qual seria o melhor tratamento nesse quesito. Diante desse cenário, investigamos o impacto de diferentes modalidades terapêuticas na neogênese de células T e B, bem como avaliamos a composição do repertório de células T periféricas nos pacientes com DF.

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a neogênese de células T e B e a diversidade do repertório de células T periférico em pacientes com doença falciforme sem tratamento ou tratados com hidroxiuréia, transfusão crônica ou transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a neogênese de células T pela quantificação da expressão absoluta de sj-TREC e β-TREC em células mononucleares de sangue periférico;
- Avaliar a neogênese de células B pela quantificação da expressão absoluta de Cj e sjKREC em células mononucleares de sangue periférico;
- Analisar a diversidade do repertório de células T periférico pela amplificação do segmento gênico que contém a região CDR3 do receptor de células T;
- Correlacionar os resultados clínico-laboratoriais dos pacientes com DF sem tratamentos ou tratados pelas diferentes modalidades terapêuticas, com os resultados das avaliações imunológicas;
- Comparar os impactos das diferentes modalidades terapêuticas na neogênese de células T e B e na diversidade do repertório de células T periférico.

4. Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística e delineamento do estudo

Este estudo constituiu-se de duas partes: uma análise prospectiva com o objetivo de estudar a neogênese de células T e B e repertório de células T em pacientes com DF submetidos ao tratamento com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas e uma análise transversal com o objetivo de estudar a neogênese de células T e B e repertório de células T em pacientes com AF submetidos ao tratamento com hidroxiuréia ou transfusão crônica e em pacientes com anemia falciforme sem tratamento. Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Terapia Celular (CEPID-FAPESP) do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP) em colaboração com a Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do HC-FMRP-USP.

Foram incluídos nesse estudo vinte e oito pacientes com DF que foram submetidos ao tratamento com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas na unidade de TMO do Hospital das Clínicas da FMRP-USP de outubro de 2010 a julho de 2016. Todos os pacientes incluídos neste estudo respeitaram os critérios de inclusão e exclusão do protocolo clínico aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (3551/2002: "Transplante de células progenitoras hematopoéticas em hemoglobinopatias") e do projeto de pesquisa: “Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida”, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (n° do parecer: 1.095.730) e pela Comissão deliberativa em viabilização para cessão de amostras biológicas e/ou hemocomponentes para fins de Pesquisa Científica do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os pacientes foram tratados com o seguinte regime de condicionamento: combinação de fludarabina e bussulfan (FluBu), sendo a dose de fludarabina de 120 mg/kg dividida em 4 infusões entre os dias -5 a -2 e a dose de bussulfan de 14 mg/kg (4 mg/kg/dia entre os dias -5 a -3 e de 2 mg/kg no dia -2). Em seguida receberam transplante de medula óssea alogênica total de um doador aparentado HLA-idêntico. As amostras de sangue periférico foram coletadas dos pacientes com DF antes do transplante (Pré-Mob) e em vários períodos após o transplante (pós-TCTH: dias D+30, D+90, D+180, D+360 e anualmente até 5 anos após o transplante).

Também foram incluídos neste estudo pacientes com AF em regime de tratamento com hidroxiuréia (N=20) ou em regime de tratamento com transfusão crônica (N=22) e pacientes com anemia falciforme sem tratamento (N=16) do ambulatório de Hematologia do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HC-FMRP-USP. A coleta de sangue destes grupos de pacientes foi prevista no projeto de pesquisa intitulado "Avaliação dos mecanismos imunológicos, hematológicos e inflamatórios em pacientes com anemia falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas" aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (n° do parecer: 1.011.061) e pela Comissão deliberativa em viabilização para cessão de amostras biológicas e/ou hemocomponentes para fins de Pesquisa Científica do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A seleção dos pacientes convencionalmente tratados obedeceu aos seguintes critérios de inclusão:

- Ser homozigoto para o gene da hemoglobina S (HbSS);
- Grupo em regime de tratamento com hidroxiuréia: em uso crônico da medicação por período mínimo de 6 meses de tratamento, sem histórico de transfusão no último ano (dose média de hidroxiuréia utilizada pelos pacientes: 21,15 mg/kg/dia);
- Grupo em regime de tratamento com transfusão crônica: duas transfusões mensais, por período mínimo de 6 meses, sem histórico de uso de hidroxiuréia no último ano;
- Grupo de pacientes definidos como sem tratamento: foi composto por pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiuréia e transfusões no último ano.

Os pacientes poderiam estar em uso de medicação profilática como uso de injeções de Benzetacil® (penicilina benzatina) e ácido fólico, e para o grupo de pacientes transfundidos, uso do quelante de ferro Desferasirox (Exjade®).

O grupo de indivíduos-controle saudáveis, foi composto por indivíduos afrodescendentes pareados por sexo/idade cujas amostras de sangue periférico foram obtidas de familiares aparentados dos pacientes com anemia falciforme incluídos no estudo e de indivíduos trabalhadores do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do Hospital das Clínicas da FMRP-USP sob consentimento informado.

Os dados clínicos e das principais características dos pacientes sumarizados estão ilustrados nas **Tabelas 1** e **2**.

Tabela 1. Pacientes com doenças falciformes tratados com TCTH alogênico.

PACIENTE	SEXO/IDADE (ANOS)	FENÓTIPO	INDICAÇÃO AO TCTH	REGIME CONDICIONAMENTO	FONTE MO	DECH AGUDA	DECH CRÔNICA	DATA TCTH
1	F/9	HbSS	CVO STA Aloimunização Alteração de doopler transcraniano	BuCy	MO	Grau II	-	04.10.2010
2	M/20	HbSS	CVO	FluBu	MO	Grau II	-	15.10.2010
3	F/27	HbS/β0	CVO STA Úlcera maleolar	FluBu	MO	Grau II	-	19.07.2011
4	F/17	HbSS	AVCi	FluBu	MO	-	-	21.06.2012
5	F/14	HbSS	Vasculopatia cerebral	FluBu	MO	-	Limitada	05.02.2013
6	F/10	HbSS	Vasculopatia cerebral	FluBu	MO	-	-	15.03.2013
7	M/35	HbS/β0	CVO STA Úlcera maleolar	FluBu	MO	-	-	12.04.2013
8	F/31	HbS/β0	CVO	FluBu	MO	-	Limitada	02.07.2013
9	M/24	HbSS	AVCi	FluBu	MO	-	-	06.08.2013
10	M/13	HbS/β0	Vasculopatia cerebral	FluBu	MO	-	-	27.11.13
11	F/30	HbS/β0	CVO Aloimunização	FluBu	SP	-	-	05.02.2014
12	M/25	HbS/β0	CVO Aloimunização Priaprismo	FluBu	MO	Grau II	-	19.03.2014
13	M/18	HbSS	AVCi Priaprismo	FluBu	MO	Grau III	-	10.07.2014
14	M/9	HbS/C	Vasculopatia cerebral	FluBu	MO	Grau II	-	20.07.2014
15	F/13	HbSS	CVO STA	FluBu	MO	Grau I/II	-	03.09.2014

PACIENTE	SEXO/IDADE (ANOS)	FENÓTIPO	INDICAÇÃO AO TCTH	REGIME CONDICIONAMENTO	FONTE MO	DECH AGUDA	DECH CRÔNICA	DATA TCTH
16	F/23	HbSS	CVO STA Hipertensão Pulmonar Aloilumização	FluBu	MO	-	-	24.09.2014
17	M/14	HbSS	AVCi	FluBu	MO	-	Limitada	13.11.2014
18	F/9	HbSS	STA	FluBu	MO	-	-	02.12.2014
19	F/10	HbSS	-	FluBu	MO	Grau I	Limitada	30.01.2015
20	M/11	HbSS	CVO STA AVCi	FluBu	MO	-	-	01.04.2015
21	M/10	HbSS	AVCi	FluBu	MO	-	-	07.07.2015
22	M/26	HbS/C	CVO Hemorragia vítrea	FluBu	MO	-	-	25.11.2015
23	M/16	HbS/β0	CVO Alteração de Doopler transcraniano	FluBu	MO	-	-	05.12.2015
24	M/30	HbSS	CVO Priaprismo Úlcera maleolar	FluBu	MO	Grau I	-	11.12.2015
25	M/12	HbSS	Alteração de Doopler transcraniano	FluBu	MO	-	-	15.03.2016
26	M/20	HbSS	CVO STA	FluBu	MO	-	-	06.04.2016
27	M/7	HbSS	Aloimunização AVCi	FluBu	MO	-	-	06.07.2016
28	F/33	HbSS	CVO STA	FluBu	MO	Grau I	-	13.07.2016

TCTH, Transplante de células tronco hematopoéticas; CVO, Crise vaso-oclusiva; STA, Síndrome torácica aguda; AVCi, Acidente vascular cerebral isquêmico; MO, Medula óssea; SP, Sangue periférico; DECH: Doença do enxerto contra hospedeiro; BuCy, Bussulfano associado a Ciclosporina; FluBu, Fludarabina associada ao Bussulfano.

Tabela 2. Pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados ou sem tratamento e grupo controle saudável.

GRUPOS	HIDROXIURÉIA N = 20	TRANFUSÃO CRÔNICA N = 22	SEM TRATAMENTO N = 16	CONTROLES SAUDÁVEIS N = 16
IDADE (ANOS) (DP)	21,4 (5,24)	19,0 (7,19)	23,6 (6,64)	22,5 (6,43)
SEXO (M/F)	10/10	14/8	8/8	8/8
HbA_2 (%)	4,17	3,19	3,32	-
HbF (%)	16,3	3,35	10,3	-
HbS (%)	71,4	37,5	81,9	-

DP, desvio padrão; M, Masculino; F, Feminino; HbA_2, Hemoglobina A_2; Hb F, Hemoglobina Fetal; HbS, Hemoglobina S.

4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

A coleta das amostras de sangue periférico foi realizada em tubos plásticos contendo o anticoagulante heparina sódica (14 UI/ml), sendo posteriormente separadas por centrifugação em gradiente de densidade. Inicialmente as amostras foram diluídas 1:2 em tampão fosfato salina (PBS), aplicadas cuidadosamente sobre o gradiente de Ficoll Hypaque (d=1,077, Amersham-Bioscience), e centrifugadas a 500g por 30 minutos à temperatura ambiente (TA) para obtenção da camada de células mononucleares. As células mononucleares presentes na interfase plasma-Ficoll Hypaque foram cuidadosamente coletadas e lavadas duas vezes com PBS. As células separadas foram então congeladas em solução de congelamento ($1x10^7$ células por 1,0 ml de solução de congelamento), constituída de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, USA) + 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Steinhein) e armazenadas em N_2 líquido para posterior extração de DNA. Da mesma forma, as células também foram congeladas em solução de Trizol (Trizol LS Reagent® Invitrogen, USA) (1,0 ml de Trizol para cada 1x107 células) em microtubos tratados com DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e armazenadas em freezer -80˚C para posterior extração de RNA.

4.3 Extração de RNA

A extração do RNA total das células mononucleares do sangue periférico foi realizada utilizando-se kit de extração de RNA *Pure Link Mini Kit* (Invitrogen^{TM}) de acordo com as recomendações do fabricante: Inicialmente, o lisado celular com o Trizol foi incubado por 5 minutos a TA. Depois de completamente descongelado, foram adicionados 200µl de clorofórmio para cada 1ml de Trizol e solução de lisado celular/Trizol e clorofórmio foi misturada vagarosamente por 15 segundos. A solução foi incubada por 3 minutos a TA e logo após foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Após esta centrifugação, ocorreu a separação da solução em três fases: fase aquosa, que contém o RNA; a interface, contendo a maior parte do DNA e a fase orgânica, na qual estão as proteínas. A fase aquosa transparente contendo o RNA (aproximadamente 400 µl) foi transferida para um novo microtubo tratado RNase-free. Um volume igual ao da fase aquosa (aproximadamente 400 µl) foi adicionado de etanol 70% e o material foi misturado no vórtex. O material foi transferido (no máximo 700 µl por vez) para uma coluna com tubo coletor (*Spin Cartidge*) e centrifugado 12.000g por 15 segundos a TA. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna inserida no mesmo tubo coletor. Foram adicionados 700µl do *Wash Buffer I* e o material foi centrifugado a 12.000g por 15 segundos a TA. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna inserida em um novo tubo coletor, 500µl *Wash Buffer II* foram adicionados e o material foi centrifugado a 12.000g por 15 segundos a TA. Novamente o conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna inserida no mesmo tubo coletor, 500µl *Wash Buffer II* foram adicionados e o material foi centrifugado a 12.000g por 15 segundos a TA. Posteriormente, o conteúdo do tubo coletor foi descartado, a coluna foi inserida no mesmo novo tubo coletor e o material foi centrifugado a 12.000g por mais 1 minuto a TA para secar a membrana da coluna. A coluna foi inserida dentro de um novo microtubo RNase-free e 30µl de água deionizada e livre de RNAse foram adicionados e material foi incubado por 1 minuto a TA. Por fim, o material foi centrifugado a 12.000g por 2 minutos a TA e o RNA foi obtido e armazenado -80°C para posterior síntese de cDNA. Uma alíquota de 1µl foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA/µl nas amostras utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

4.3.1 Eletroforese de RNA em gel de agarose

O RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, na presença de GelRed™ (Biotium), para determinação de sua qualidade e integridade. A eletroforese em gel de agarose foi realizada com corrente elétrica de 90 volts durante 30 minutos e então as bandas 28S, 18S e 5S do RNA ribossômico foram visualizadas em um transiluminador UV. Após a constatação da integridade e qualidade do RNA, este foi utilizado na síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa.

4.4 Transcrição reversa e validação

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada amostra foi adicionado um volume de 62,3 µL de água DEPC, 10 µL de Buffer RT 10X, 10 µL de *Random primers* 10X, 10,4 µL de dNTP 25X (100 mM), 5,0 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50U/µL), 0,3 µL de inibidor de RNases e 2,0 µg (2 µL) de RNA, totalizando um volume final de 100 µL. Esse volume foi então incubado em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) a 25ºC por 10 minutos, a 37ºC por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e mantido a 4°C até a retirada das amostras. O cDNA sintetizado foi estocado a -80ºC e em seguida utilizado nos ensaios de *TCRBV CDR3 Spectratyping*.

A expressão qualitativa do gene da β-actina foi utilizada como controle da reação da transcrição reversa. Para cada amostra foram utilizados 2 µl do cDNA transcrito, 2,5 µl de tampão para PCR 10X, 0,75 µl de 1,5 mM MgCl2, 3 µl de 10 mM dNTP mix, 2 µl de cada *primer (foward/reverse)* (2,5 mM), 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl) e água DEPC q.s.p. 25µl. As amostras foram homogeneizadas e centrifugados brevemente, sem seguida foram colocadas em termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) pré-aquecido a 94°C seguindo a reação de amplificação: inicialmente um passo de desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de PCR (desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 55°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, completados por uma extensão final de 1 minuto a 72°C). Em seguida, o produto da reação foi mantido a 4°C até o momento da

retirada. O produto foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) a 90 V durante 40 minutos.

4.5 Metodologia do *TCRBV CDR3 Spectratyping*

Esta metodologia permite analisar a diversidade do repertório de linfócitos T e detectar populações celulares em expansões clonais (Pannetier et al. 1993, 1995). A técnica inicia-se pela amplificação por PCR dos segmentos Vβ-Cβ do TCR utilizando *primers* específicos para cada uma das 24 famílias Vβ estudadas. O produto desta reação é submetido a uma segunda amplificação por PCR que inclui um *primer* adicional marcado com fluorocromo. Nesta segunda reação, amplifica-se o segmento gênico que contém a região CDR3 (do inglês *Complementarity-Determining Regions*) do TCR, uma vez que esta região está localizada entre os segmentos V-D-J. Em seguida, estes seguimentos amplificados por PCR são submetidos a separação dos fragmentos em um sequenciador automático e através do software Gene Mapper™ v.4.1 (Applied Biosystem), é possível calcular o tamanho (em pares de bases) dos diferentes fragmentos (picos) de CDR3, o número de picos de CDR3, estimar a frequência de cada família Vβ no repertório do TCR e analisar a clonalidade e distribuição (gaussiana ou não gaussiana) dos picos na região CDR3. Um esquema do método de *TCRBV CDR3 Spectratyping* é mostrado na **Figura A.1 (Apêndice A)**.

4.5.1 Reação de PCR (Vβ-Cβ) para determinação das famílias Vβ do Receptor de Células T (TCR)

Nesta reação ocorre a amplificação do segmento gênico Vβ-Cβ do TCR.. Para um volume final de reação de 25µl, foram utilizados 4% de cDNA transcrito, 2,5µl de tampão 10X (500mM KCl e 100mM Tris-HCl), 1 µl de $MgCl_2$ (50mM), 2 µL de dNTP(2,5mM), 0,63 µL do *primer* Cβ (20 µM) e 2,5 µl do *primer* Vβ específico (5 µM), 0,1µl Taq polimerase (5U/µl) e água q.s.p 25 µl. A reação foi processada em termociclador por 1 minuto e 30 segundos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C, finalizando com uma extensão final de 4 minutos a 72°C. A **Tabela 3** mostra as sequências dos *primers*

que foram utilizados para a amplificação das 24 famílias Vβ e o tamanho esperado do produto de PCR (Pannetier *et al.* 1993, 1995).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados na amplificação das famílias Vβ do TCR.

FAMÍLIA VB E SEQÜÊNCIAS DOS *PRIMERS*	VB-CB (PARES DE BASES)	ESPECIFICIDADES AMPLIFICADAS
VB1 5' CCGCACAACAGTTCCCTGACTTGC 3'	322	VB1S1
VB2 5' GGCCACATACGAGCAAGGCGTCGA 3'	360	VB2S1,S2
VB3 5' CGCTTCTCCCTGGATTCTGGAGTCC 3'	299	VB3S1
VB4 5' TTCCCATCAGCCGCCCAAACCTAA 3'	325	VB4S1
VB5 5' AAGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC 3'	299	VB5S1,S2, S3,S5, S6, S7,S8
VB6 5' CTCTGAAGATCCAGCGCACAGAGC 3'	292	VB6S1, S3, S4, S5, S7, S11,
VB7 5' CCTGAATGCCCCAACAGCTCTCTC 3'	320	S14
VB8 5' CCATGATGCGGGGACTGGAGTTGC 3'	406	VB7S1, S2, S3
VB9 5' TTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC 3'	279	VB8S1, S2, S3
VB10 5' CCACGGAGTCAGGGGACACAGCAC 3'	277	VB9S1, S2
VB11 5' TGCCAGGCCCTCACATACCTCTCA 3'	276	VB10S1
VB12 5' TGTCACCAGACTGGGGAACCACCAC 3'	449	VB11S1
VB13 5' CACTGCGGTGTACCCAGGATATGA 3'	456	VB12S2, S3, S4
VB14 5' GGGCTCGGCTTAAGGCAGACCTAC 3'	398	VB13S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8,
VB15 5' CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG 3'	311	S9
VB16 5' GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG 3'	279	VB14S1
VB17 5' TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA 3'	295	VB15S1
VB18 5' CTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC 3'	322	VB16S1
VB19 5' TCTCAATGCCCCAAGAACGCACCC 3'	320	VB17S1
VB20 5' TGCCCCAGAATCTCTCAGCCTCCA 3'	337	VB18S1
VB21 5' TCCAGCCTGCAAAGCTTGAGGACT 3'	283	VB19S1
VB22 5' GATCCGGTCCACAAAGCTGG 3'	287	VB20S1
VB23 5' TGAACTGAACATGAGCTCCTTGG 3'	295	VB21S1, S3, S4
VB24 5' GACATCCGCTCACCAGGCCTG 3'	288	VB22S1
CB 5' CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG 3'		VB23S1
		VB24S1

VB, Cadeia Vβ do TCR; S, Região S.

4.5.2 Reação de elongação Vβ-Cβ (*Run Off*)

O produto da reação de PCR que amplificou o segmento gênico Vβ-Cβ conforme descrito no protocolo cima, foi submetido à outra amplificação por PCR (também chamada de reação de elongação ou *run-off*) que inclui um *primer* Cβ interno marcado com fluorocromo (FAM) [5' CAC AGC GAC CTC GGG TGG G 3']. Para essa reação foi utilizado 1 µl de tampão para PCR 10X (500mM KCl e 100mM Tris-HCl), 0,6 µL de $MgCl_2$ (50mM), 0,8 µL de dNTP (2,5mM), 0,5 µL de *primer* Cβ marcado (10µM), 0,04 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl) e água q.s.p 8µl, seguido da adição separadamente de 2µl do produto de PCR de cada uma das 24 famílias Vβ. Esta reação foi processada em termociclador por 1 minuto e

30 segundos a 94°C, seguidos de 8 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C, finalizando com uma extensão final de 60 minutos a 72°C.

4.5.3 Preparo das amostras e aplicação no sequenciador automático

Ao final da reação de elongação, os produtos da PCR foram misturados 1µl do produto da reação de PCR, 0,3 µl de marcador de peso molecular (Gene Scan™ - 500 LIZ standard, Applied Biosystems) e 12,7 µl de tampão para carregar amostra (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Esta solução foi colocada em termociclador a 95°C por 2 minutos para completa desnaturação do produto de PCR. As amostras foram mantidas refrigeradas até o momento da aplicação no gel de sequenciamento, no qual as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços, sendo utilizados 14 µl de amostra/poço. Os produtos de PCR da reação de *run-off* foram então submetidos à corrida eletroforética em um sequenciador automático de DNA (ABI 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.5.4 Perfil e cálculo do tamanho da região CDR3 do TCR e da frequência das famílias Vβ pelo método de *TCRBV CDR3 Spectratyping*

A região CDR3 consiste numa sequência única de nucleotídeos que é específica para um tipo particular de célula T, variando de tamanho conforme ocorre a adição ou a remoção de nucleotídeos nas junções V-J (cadeia α) e V-D-J (cadeia β) no final do processo de recombinação (diversidade juncional) (Yassai et al. 2009). Na cadeia variável β do TCR, a região CDR3 está localizada entre os resíduos de aminoácidos 95-106 da cadeia variável β do TCR e, como a posição dos *primers* Vβ e Cβ utilizados é fixa, o tamanho observado para o produto de PCR Vβ-Cβ marcado (região CDR3) depende do tamanho da junção V-D-J de cada TCR específico. O tamanho em pares de bases do segmento CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos para cada Vβ foi estimado previamente (Pannetier et al. 1993, 1995) e está mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Tamanho esperado do produto de PCR da amplificação Vβ - Cβ (em pares de bases) para o segmento CDR3 de 10 aminoácidos.

	TAMANHO DO PRODUTO (PARES DE BASES)	FAMÍLIA Vβ	TAMANHO DO PRODUTO (PARES DE BASES)
VB1	189	VB13	323
VB2	227	VB14	265
VB3	166	VB15	178
VB4	192	VB16	146
VB5	166	VB17	161
VB6	159	VB18	189
VB7	187	VB19	187
VB8	273	VB20	204
VB9	146	VB21	150
VB10	144	VB22	153
VB11	143	VB23	161
VB12	316	VB24	154

Os valores mostrados na **Tabela 4** foram utilizados para a análise dos fragmentos gerados através da eletroforese capilar pelo sequenciador automático. O cálculo de cada segmento CDR3 foi realizado pelo *software Gene Mapper*™ v.4.1. (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sendo utilizado para comparação um marcador de peso molecular conjugado com fluorocromo conhecido, denominado "LIZ" (GeneScan 500 LIZ™ Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que foi aplicado no momento da preparação das amostras para aplicação no sequenciador automático. A discriminação de diferentes tamanhos (em pares de bases) detectados pelo sequenciador automático é possível pois o marcador de peso molecular possui um fluorocromo diferente do utilizado na reação de elongação para os segmentos Vβ-Cβ, possibilitando assim a separação dos fragmentos gerados. Conforme descrito, o pico de CDR3 correspondente a 10 resíduos de aminoácidos é definido por um número de pares de bases geralmente conhecido. Sendo assim, como cada 3 pares de base correspondem a 1 resíduo de aminoácido é possível definir o número de aminoácidos de cada segmento de CDR3 para uma determinada família Vβ. No entanto, a determinação exata do tamanho e sequência dos seguimentos de CDR3 só é possível após o sequenciamento desta região. A distribuição dos segmentos de CDR3 pode apresentar um perfil policlonal normal com distribuição como uma Curva de Gauss, com segmentos variando de 4 a 16 resíduos de aminoácidos, sendo os tamanhos de 8 a 10 resíduos de aminoácidos os mais frequentes. Os seguimentos de CDR3 também

podem apresentar um perfil policlonal anormal, desviando da distribuição de Gauss, podendo chegar a um perfil oligoclonal (com poucos picos) ou monoclonal (pico de CDR3 único correspondente a uma população de células T em expansão clonal), ou ainda uma família Vβ específica pode estar ausente.

Após a corrida eletroforética em sequenciador automático e análise pelo *software Gene Mapper*™ v.4.1. (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram gerados gráficos de distribuição dos segmentos da região CDR3. Os gráficos (ou espectros) representam a intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias de acordo com o tamanho da região CDR3 em pares de bases. As informações geradas a partir da análise incluem o tamanho do pico (expresso em pares de bases), bem como a altura e área de cada pico. Foram considerados positivos os picos com área de intensidade de fluorescência igual ou maior que 500 unidades arbitrárias. Nos gráficos, os picos destacados em azul correspondem ao segmento de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos, conforme exemplificado na **Figura A.1 (Apêndice A)**. A partir desses gráficos, foi calculada a frequência total de cada família Vβ para uma determinada amostra, a partir do valor da área dos picos de fluorescência, segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) X 100. Neste trabalho, também foi avaliada a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR com base no *Complexity Score* (CS) descrito por WU et al., (WU et al., 2000). O CS é um sistema de pontuação que quantifica as mudanças no repertório Vβ do TCR ao longo do tempo. De acordo com este sistema, primeiramente a complexidade dentro de cada família Vβ é determinada pela contagem do número de picos. As famílias são então classificadas com uma pontuação de 0 a 8, baseada no grau de complexidade (ou diversidade). A complexidade normal é caracterizada por uma distribuição gaussiana dos diferentes tamanhos de transcritos para uma determinada família, e pela quantidade de 8-10 picos para cada família Vβ. A pontuação 0 é dada se a família é ausente, a pontuação 1 é atribuída se a família Vβ apresentar somente um único pico monoclonal, a pontuação 2 é dada se a família apresentar um perfil biclonal, a pontuação 3 é dada se a família apresentar 3 picos, e assim por diante. Finalmente, a pontuação 8 é atribuída a um *spectratype* de 8 picos ou mais, com uma aparência diversa, complexa e policlonal. Assim, CS geral é calculado pela soma dos *complexity scores* de cada família Vβ. Considerando que estamos avaliando 24 famílias Vβ, neste trabalho, o *complexity score* máximo pode ser de 192 (8 x 24 famílias Vβ).

4.6 Quantificação das moléculas *sjTREC*, *beta-TREC*, *coding joint* (*Cj*) e *sjKREC*

4.6.1 Extração de DNA

As amostras de sangue periférico coletadas dos indivíduos incluídos no estudo foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade. Inicialmente as amostras foram diluídas 1:2 em tampão fosfato salina (PBS), aplicadas cuidadosamente sobre o gradiente de Ficoll Hypaque (d=1,077, Amersham-Bioscience), e centrifugadas a 500g por 30 minutos à temperatura ambiente (TA) para obtenção da camada de células mononucleares. As células mononucleares presentes na interfase plasma-Ficoll Hypaque foram cuidadosamente coletadas e lavadas duas vezes com PBS. As células separadas foram então congeladas em solução de congelamento ($1x10^7$ células por 1,0 ml de solução de congelamento), constituída de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, USA) + 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Steinhein) e armazenadas em N_2 líquido para posterior extração de DNA. A extração de DNA foi realizada utilizando o kit de extração DNasy Blood & Tissue (Valencia, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, as células mononucleares foram descongeladas em 15 mL do meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Hyclone, Logan, USA), e centrifugadas por 10 minutos a 200g à temperatura ambiente. As células mononucleares foram lavadas em PBS 1X e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. Em seguida, o pellet formado foi ressuspendido em 200 µl PBS 1X para posterior extração de DNA. Foram adicionados 20 µl de proteinase K para degradação de proteínas juntamente com 200µL de Buffer AL. O conteúdo foi misturado em vórtex e incubado a 56°C por 10 minutos. Após este período, 200 µl de etanol (100%) foram adicionados e o conteúdo foi misturado novamente em vórtex. A suspensão celular foi pipetada em uma coluna (*DNeasy Mini spin column*) colocada em um tubo de coleta de 2 ml e centrifugado a 6000g por 1 minuto à temperatura ambiente. O tubo coletor e o conteúdo centrifugado foram descartados e a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2 ml. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 à coluna e o conte do foi centrifugado por 1 minuto a 6000g à TA. Novamente o centrifugado e o tubo coletor foram descartados. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2ml, 500 µl de Buffer AW2 foram adicionados e o

conteúdo foi centrifugado por 3 minutos a 14000 rpm à TA para secar a membrana. A coluna foi transferida para um microtubo limpo (RNA-free) e 30 µl de Buffer AE foram pipetados diretamente na membrana para eluir o DNA. O material foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado por mais 1 minuto a 6000g à TA. Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

4.6.2 Quantificação por PCR em tempo real

Após a extração de DNA, a quantificação de sjTREC e beta-TREC foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR) (ViiA™ 7 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme protocolo descrito previamente por Clave et al., 2013 (CLAVE et al., 2013). Cj e sjKREC foram quantificados por PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR) (ViiATM 7 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme protocolo previamente descrito por van Zelm et al. 2007 (VAN ZELM et al., 2007). Os *primers* e as sondas foram desenvolvidos para amplificar especificamente os rearranjos IRS1-RS e intron RSS-K do coding joint e seu correspondente sjKREC. Uma primeira reação de PCR foi realizada em multiplex com 3 misturas de iniciadores externos diferentes, utilizando 1-5 µg de DNA genômico, 8 µL de dNTP (1,25 nM),5 µL de tampão para PCR 10x, 2,5 µL de MgSO4 (50 mM), 1,25 unidades de Platinum® Taq polymerase (Invitrogen, Cergy -Pontoise, França) e e água q.s.p 40µ (3 min a 95 ° C, depois 18 ciclos de 95 ° C, 15 s, 60 ° C, 30 s e 68 ° C, 2 min). A quantificação final foi realizada em duplicata no equipamento ViiA™ 7 em uma segunda reação multiplex contendo 4µL de diluição 1/400 ou 1/1000 do primeiro produto de PCR, *primers* internos, sondas para sjTREC ou para um dos segmentos de Dβ-Jβ, sondas para o Cj e KREC, iniciadores internos e sondas para o gene da albumina (Alb) em um volume final de 10 µL (5 min a 95 ° C e 40 ciclos de 95° C, 15s e 60 ° C, 1min). Utilizou-se o sistema Takyon™ Low Rox Probe MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Seraing, Bélgica). A soma dos 10 segmentos Dβ-Jβ foi multiplicada por 1,3 para alcançar todos os 13 segmentos Dβ-Jβ existentes. Todos os *primers* e sondas foram obtidos da Eurogentec (Seraing, Bélgica). Os dados foram validados somente quando foram detectadas ao menos 50.000 cópias do gene da albumina. Os resultados foram expressos em número de cópias em 150.000 PBMCs.

4.7 Análise Estatística

A significância estatística das mudanças no repertório de células T bem como dos parâmetros imunológicos na coorte dos pacientes que realizaram transplante alogênico de medula óssea foi avaliada longitudinalmente por modelos de efeitos mistos. Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas (mais de uma medida para um mesmo indivíduo) e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos tem distribuição normal com média 0 e variância σ^2 constante.

Na avaliação da significância estatística das comparações entre os parâmetros imunológicos nos grupos dos pacientes sob diferentes modalidades terapêuticas, foi proposta a análise de covariância (ANCOVA), que permite o ajuste de covariáveis (MONTGOMERY, 2000). Para avaliar mudanças no repertório de células T nestes mesmos grupos, foi proposto o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) com ajuste da variável Idade. Para avaliar a relação de variáveis independentes (parâmetros clínicos) com uma variável dependente (resultados moleculares) foi proposto o modelo de regressão linear múltiplo, controlando pela idade (possível fator de confusão). Nas situações em que o pressuposto de normalidade e homocedasticidade dos resíduos não foi observado, transformações na variável resposta foram utilizadas. Para as comparações foi utilizado o pós-teste por contrastes ortogonais. Todos os modelos foram ajustados pela idade (possível fator de confusão).

Todas as análises foram realizadas através do *software* SAS (SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, EUA) assumindo-se o nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Tabelas com os valores de média, desvio padrão, diferença estimada e intervalo de confiança dos principais resultados, assim como o valor de *p*, encontram-se nos **Apêndices**. **Apêndices B-G:** resultados dos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados e sem tratamento comparados com o grupo controle; **Apêndices H-K:** resultados pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas comparados com o grupo controle).

5. Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Resultados clínicos

5.1.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente

No Período de julho de 2015 a fevereiro de 2016, foram incluídos neste estudo quarenta e dois pacientes com anemia falciforme (HbSS), sendo vinte convencionalmente tratados com hidroxiuréia, vinte e dois tratados com transfusões crônicas e dezesseis pacientes que não estavam em nenhum destes dois tratamentos há pelo menos 1 ano no momento da coleta de sangue periférico (**Tabela 2**).

A porcentagem de HbS foi maior nos pacientes sem tratamento (81,9%) e a porcentagem de HbF foi maior nos pacientes tratados com hidroxiuréia (16,3%). Do total de pacientes convencionalmente tratados, a maioria apresentou autoesplenectomia ao exame de tomografia de rotina (30 pacientes), seguidos por esplenectomia cirúrgica (9 pacientes) e baço com dimensões normais (8 pacientes). Com relação a ocorrência de infecções bacterianas, trinta e um pacientes apresentaram presença de infecções bacterianas no histórico clínico, sendo na maioria pneumonia (24 casos), seguida por osteomielite (4 casos) e infecções do trato urinário (3 casos). Entre os pacientes em regime de tratamento com transfusões crônicas, sete estavam aloimunizados.

Na composição do grupo controle, foram adotados os seguintes critérios: não apresentar história de infecções crônicas, doenças inflamatórias e autoimunes e pertencer ao grupo étnico afrodescendente.

5.1.2 Pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas

No período de outubro de 2010 a julho de 2016 foram acompanhados neste estudo vinte e oito pacientes com doenças falciformes (**Tabela 1**), sendo que dos pacientes transplantados, dezenove possuíam fenótipo HbSS, sete possuíam fenótipo HbSβ0 e dois possuíam o fenótipo HbSC. Apenas um paciente recebeu células progenitoras de sangue periférico (os demais receberam medula óssea) e todos os pacientes receberam regime de condicionamento mieloablativo.

Entre os vinte e oito pacientes transplantados, cinco apresentaram perda do enxerto. Houve um óbito devido aplasia de medula óssea no receptor mesmo com quimera do doador. Com relação a incidência de DECH, ocorreram 9 casos de DECH aguda (grau I e II) e um caso de DECH aguda grau III. Apenas quatro pacientes apresentaram DECH crônica limitada.

Com relação as diferenças entre o grupo sanguíneo ABO, treze pacientes não apresentaram diferenças na compatibilidade ABO (isogrupo), entretanto quatro pacientes apresentaram incompatibilidade ABO maior, sete pacientes apresentaram incompatibilidade ABO menor e três pacientes apresentaram incompatibilidade ABO bidirecional.

Em relação ao estado da função esplênica nos pacientes, treze pacientes não apresentaram exames de imagem no histórico clínico impossibilitando classificação, onze apresentaram autoesplenectomia, três apresentaram esplenectomia cirúrgica e dois apresentaram baço de dimensões normais com áreas de infarto.

5.2 Avaliação da neogênese de células T pela quantificação de moléculas de sjTREC e β-TREC

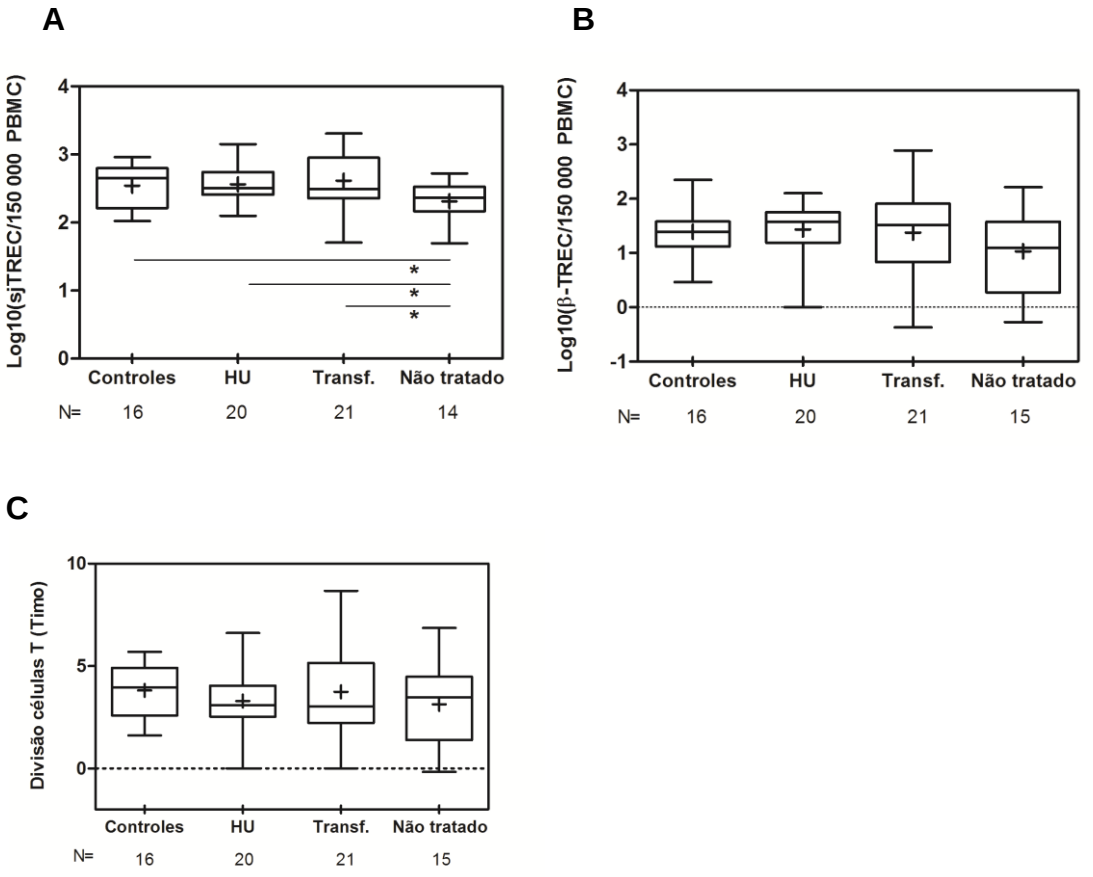
Com o objetivo de investigar se os tratamentos convencionais utilizados no manejo das complicações clínicas das DF podem melhorar ou ter algum impacto na função tímica desses pacientes, nós avaliamos o número de moléculas de sjTREC e β-TREC no grupo de pacientes convencionalmente tratados com HU ou transfusões crônicas, nos pacientes sem tratamento e no grupo controle. Através da relação sjTREC/β-TREC foi possível calcular o *output* tímico, ou seja, esta razão reflete a quantificação direta da proliferação intratímica que ocorre durante o rearranjo das cadeias α e β no timo e não é afetada pela dinâmica das células T periféricas (DION et al., 2004). Esta análise foi realizada em colaboração com o grupo do Prof. Antoine Toubert no Hospital Saint-Louis em Paris.

5.2.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente

De acordo com os resultados encontrados em nosso estudo, a média de moléculas de sjTREC foi significantemente menor no grupo de pacientes sem tratamento em comparação com os pacientes tratados com HU ou transfusão e com o grupo controle (**Figura 1A**, **Tabela B.1**, **Apêndice B**). Interessantemente, os grupos tratados com HU

(média = 2,56) e transfusão crônica (média = 2,61) apresentaram maiores níveis de sjTREC em comparação com o grupo controle (média = 2,54). Embora não houve significância estatística nas comparações entre os níveis de β-TREC, estes também foram menores nos pacientes não tratados (media = 1,03) e maiores no grupo tratado com HU (média = 1,44) (**Figura 1B**, **Tabela B.1**, **Apêndice B**). Em relação a divisão celular intratímica, o grupo de pacientes não tratados apresentou menor taxa de divisões de células T no timo e o grupo controle apresentou uma melhor taxa de divisão das células T no timo, entretanto as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes (**Figura 1C, Tabela B.1, Apêndice B**).

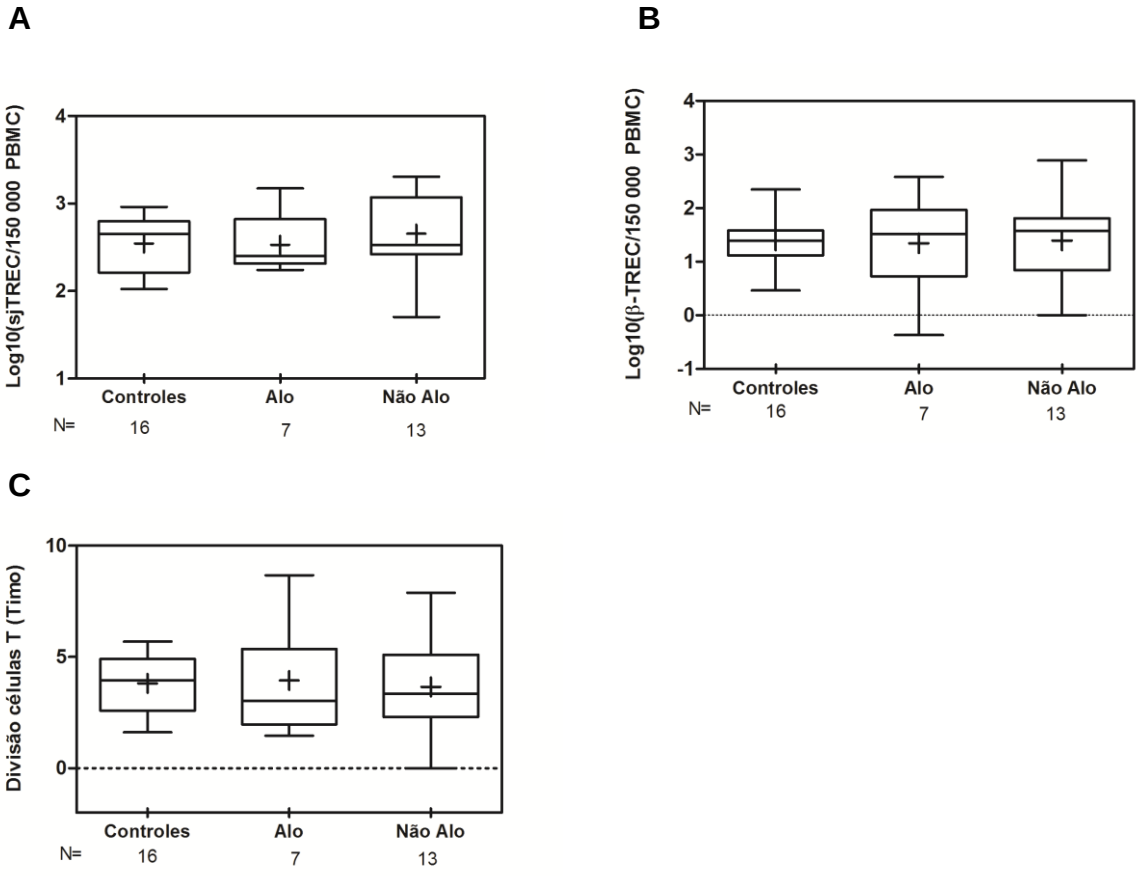
Figura 1. Neogênese de células T nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados.



Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)** e β-TREC/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular intratímica foi calculada utilizando a fórmula: n° sjTREC = 2^n x n° de β-TRECs, ou 2^n = sjTREC/β-TRECs, ou nLog2 = Log(sjTREC/ β-TREC), finalmente, n = Log(sjTREC/β-TREC/Log2) **(C)**. As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, os pontos em forma de cruz dentro das caixas indicam a média, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os asteriscos indicam p<0,05. HU, hidroxiuréia; Transf., transfusão crônica.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Entre os tratamentos convencionais, a terapia transfusional constitui um componente integral no tratamento dos pacientes com AF que apresentam quadros mais graves da doença, entretanto, o risco de aloimunização é clinicamente significativo nestes pacientes (ADAMS; BRAMBILLA, 2005; KELLY et al., 2016). Em nosso estudo, no grupo de pacientes tratados com transfusão crônica, sete pacientes estavam aloimunizados, sendo que quatro apresentaram mais de dois aloanticorpos detectados. A fim de investigar se a ocorrência de aloimunização poderia ter algum impacto na neogênese das células T, nós analisamos separadamente o grupo aloimunizado e o grupo não alomunizado. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo aloimunizado e não aloimunizado, e nem entre esses grupos e o grupo controle (**Figura 2**).

Figura 2. Neogênese de células T nos pacientes com anemia falciforme tratados com transfusão crônica (aloimunizados e não aloimunizados).



Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)** e β-TREC/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular intratímica foi calculada utilizando a fórmula: n° sjTREC = 2^n x n° de β-TRECs, ou 2^n = sjTREC/β-TRECs, ou nLog2 = Log(sjTREC/ β-TREC), finalmente, n = Log(sjTREC/β-TREC/Log2) **(C)**. As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, os pontos em forma de cruz dentro das caixas indicam a média, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os asteriscos indicam $p<0,05$. Alo, aloimunizado; Não Alo, não aloimunizado.

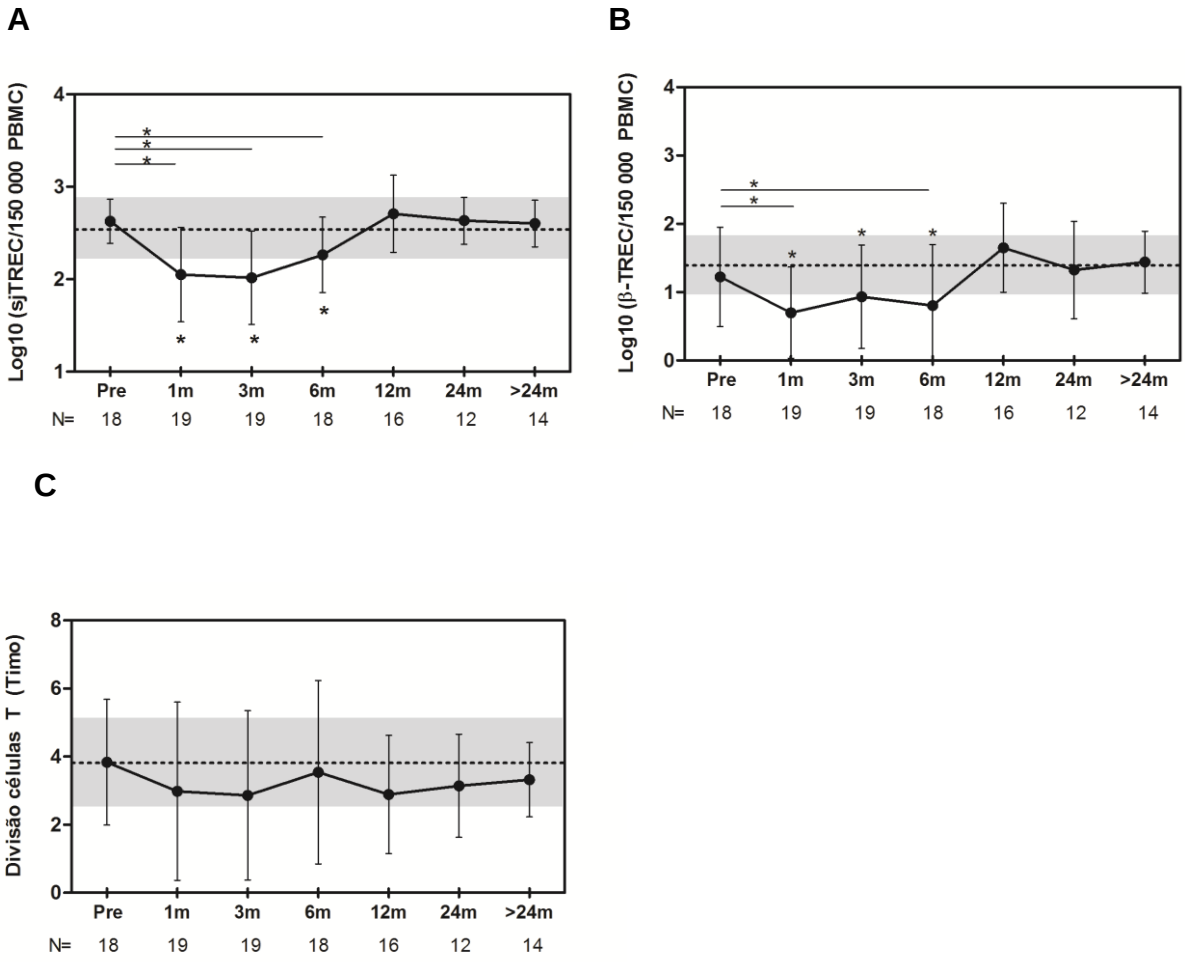
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

5.2.2 Pacientes com doença falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas

Atualmente, o transplante alogênico de células tronco hematopoéticas constitui a única terapia curativa para pacientes com DF, sendo o tipo de terapia celular mais estabelecido e reconhecido mundialmente. Após o TCTH alogênico, a reativação tímica é fundamental para a qualidade da reconstituição imunológica e resultados clínicos pós-TCTH, correlacionando-se com a sobrevida do paciente, ocorrência de infecções graves e evolução clínica (TOUBERT et al., 2012). Portanto, nós avaliamos a função tímica dos pacientes antes do transplante (pré-transplante, antes do período de condicionamento) e sequencialmente após o transplante nos dias pós transplante/ períodos: D+30 (1 mês), D+90 (3 meses), D+180 (6 meses), D+360 (12 meses), D+720 (24 meses), e acima de 24 meses (48, 72 e até 96 meses, correspondendo a 3 anos, 4 anos e até 5 ano, respectivamente). É importante ressaltar, que o seguimento pós-transplante foi diferente entre os pacientes. Alguns pacientes possuem apenas períodos mais tardios pós-transplante e outros possuem os seguimentos iniciais, de forma que o estudo consistiu de diferentes pacientes com diferentes tempos de seguimentos.

Após o transplante, os níveis de sjTREC e β-TREC diminuíram nos primeiros 3 meses, sendo significantemente menor em relação ao período pré-transplante e em relação ao grupo controle saudável (**Figura 3A** e **3B, Tabela G.1** e **G2, Apêndice G**). Interessantemente, nós observamos que entre 3 a 6 meses pós-transplante, a função tímica começou a se recuperar, sendo estabelecida no período de um ano pós-TCTH, onde os valores de sjTREC e β-TREC foram similares aos do período pré-transplante e do grupo controle. Da mesma forma, a divisão de células T no timo, caiu nos primeiros 3 meses, aumentando em 6 meses e mantendo-se estável em um ano ou mais pós-transplante (**Figura 3C, Tabela G.1** e **G2, Apêndice G**).

Figura 3. Neogênese de células T nos pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico.



Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)** e β-TREC/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular intratímica foi calculada utilizando a fórmula: n° sjTREC = 2^n x n° de β-TRECs, ou 2^n = sjTREC/β-TRECs, ou nLog2 = Log(sjTREC/ β-TREC), finalmente, n = Log(sjTREC/β-TREC/Log2) **(C)**. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas indicam os valores da média do grupo controle (n=16). Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

No contexto do TCTH alogênico, as reações alo-imunes possuem um papel central. Desvendar os mecanismos imunológicos e imunogenéticos envolvidos na reconstituição imunológica após o TCTH é de grande relevância, especialmente no contexto da DF que é uma doença multifatorial, e cada paciente possui uma resposta clínica individual após esta terapia. Portanto, a correlação dos resultados moleculares encontrados neste estudo com os resultados clínico-laboratoriais dos pacientes envolvidos neste estudo é extremamente importante. Desta forma, nós avaliamos a neogênese de células T dividindo os pacientes em grupos, em relação

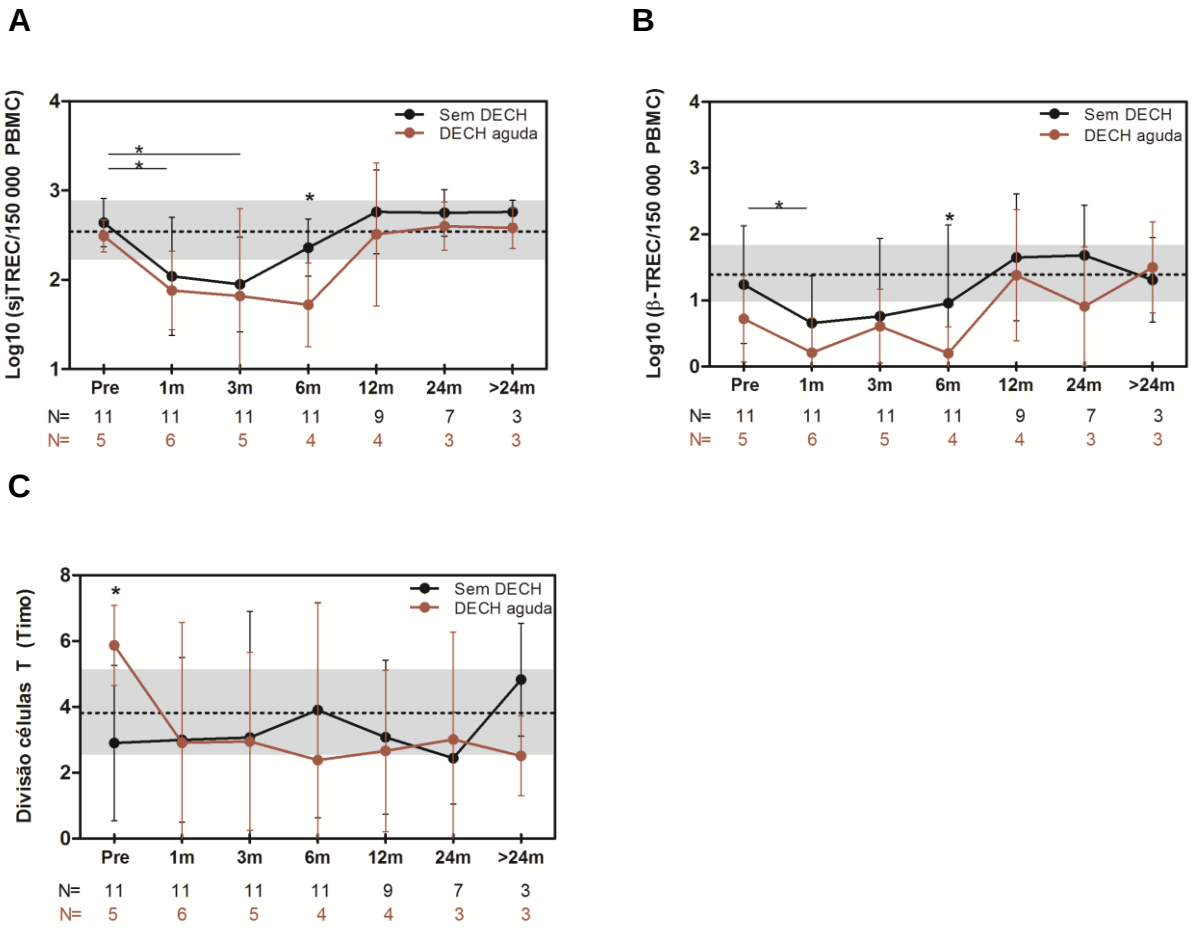
ao desenvolvimento de DECH aguda, a reativação de citomegalovírus (CMV) pós-transplante, a perda do enxerto e a incompatilidade ABO.

Na avaliação da neogênese das células T (função tímica) em relação a incidência de DECH, nós avaliamos apenas o acometimento por DECH aguda. Em nossa coorte, apenas quatro pacientes apresentaram DECH crônica limitada. Além disso, estes pacientes foram a ser incluídos no estudo tardiamente e somente seus períodos mais tardios foram analisados, não sendo possível realizar todas as comparações necessárias.

A **Figura 4** ilustra o impacto da DECH aguda na função tímica após o TCTH alogênico em pacientes com AF. Nos pacientes que não desenvolveram DECH, os níveis de sjTREC diminuíram significantemente apenas nos primeiros três meses ($p<0,01$) e o β-TREC diminuiu significantemente apenas no primeiro mês ($p=0,04$), em relação ao período pré-transplante. Já nos pacientes que desenvolveram DECHa, os níveis de sjTREC diminuíram significantemente em 1 mês, 3 meses e 6 meses pós-transplante ($p<0,01$) e os níveis de β-TREC foram significantemente menores em 6 meses pós-transplante ($p=0,01$) em relação ao período pré-transplante (Figuras **4A** e **4B**). Destacando-se o período de 6 meses pós-transplante, nós observamos diferença estatisticamente significante nos níveis de sjTREC e β-TREC ($p<0,01$) entre o grupo que desenvolveu DECHa e o grupo que não desenvolveu DECH. Houve uma maior divisão das células T no timo dos pacientes com DECHa no período pré-transplante comparando com o grupo sem DECH ($p=0,04$) (**Figura 4C**).

De forma geral, houve menor expressão de moléculas de sjTREC e β-TREC nos pacientes que desenvolveram DECHa em relação aos pacientes que não desenvolveram DECH. Entretanto, um ano pós-transplante observamos que a neogênese das células T recuperou-se nos dois grupos de pacientes, não havendo mais diferença entre eles.

Figura 4. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que apresentaram ou não DECH aguda.

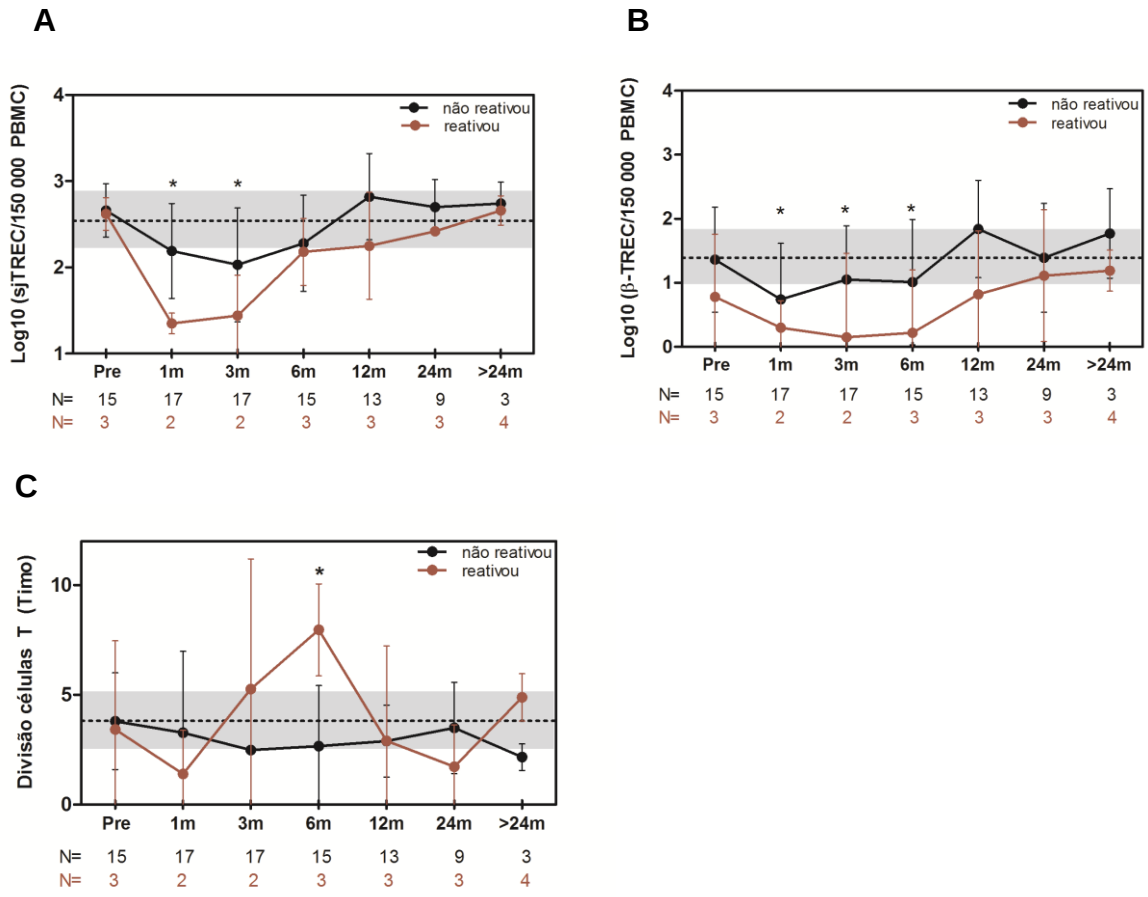


Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)** e β-TREC/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular intratímica foi calculada utilizando a fórmula: n° sjTREC = 2^n x n° de β-TRECs, ou 2^n = sjTREC/β-TRECs, ou nLog2 = Log(sjTREC/ β-TREC), finalmente, n = Log(sjTREC/β-TREC/Log2) **(C)**. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas indicam os valores da média do grupo controle (n=16). Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

O citomegalovírus é um vírus do grupo herpesvírus, que causa latência após a infecção primária e pode reativar sua replicação em situações de imunossupressão, especialmente nos pacientes nos primeiros meses iniciais pós-TCTH (GRANATO, 2001). Em nossa coorte de pacientes transplantados, cinco pacientes apresentaram reativação de CMV nos períodos iniciais pós-transplante (4 a 6 meses) caracterizando uma complicação clínica precoce. O grupo de pacientes com reativação de CMV apresentou menores níveis de sjTREC e β-TREC em todos

os períodos pós-transplante em comparação aos pacientes que não apresentaram reativação do vírus (**Figura 5A** e **5B**), embora essa diferença não foi estatisticamente significante. Em 1 mês, 3 meses e 6 meses pós-transplante, os pacientes com reativação de CMV apresentaram menores níveis de sjTREC e β-TREC em relação ao grupo controle (p<0,01). A divisão das células T no timo foi significantemente maior nos pacientes com reativação de CMV após 6 meses do transplante (p<0,01) em relação aos pacientes sem reativação de CMV e ao grupo controle (**Figura 5C**).

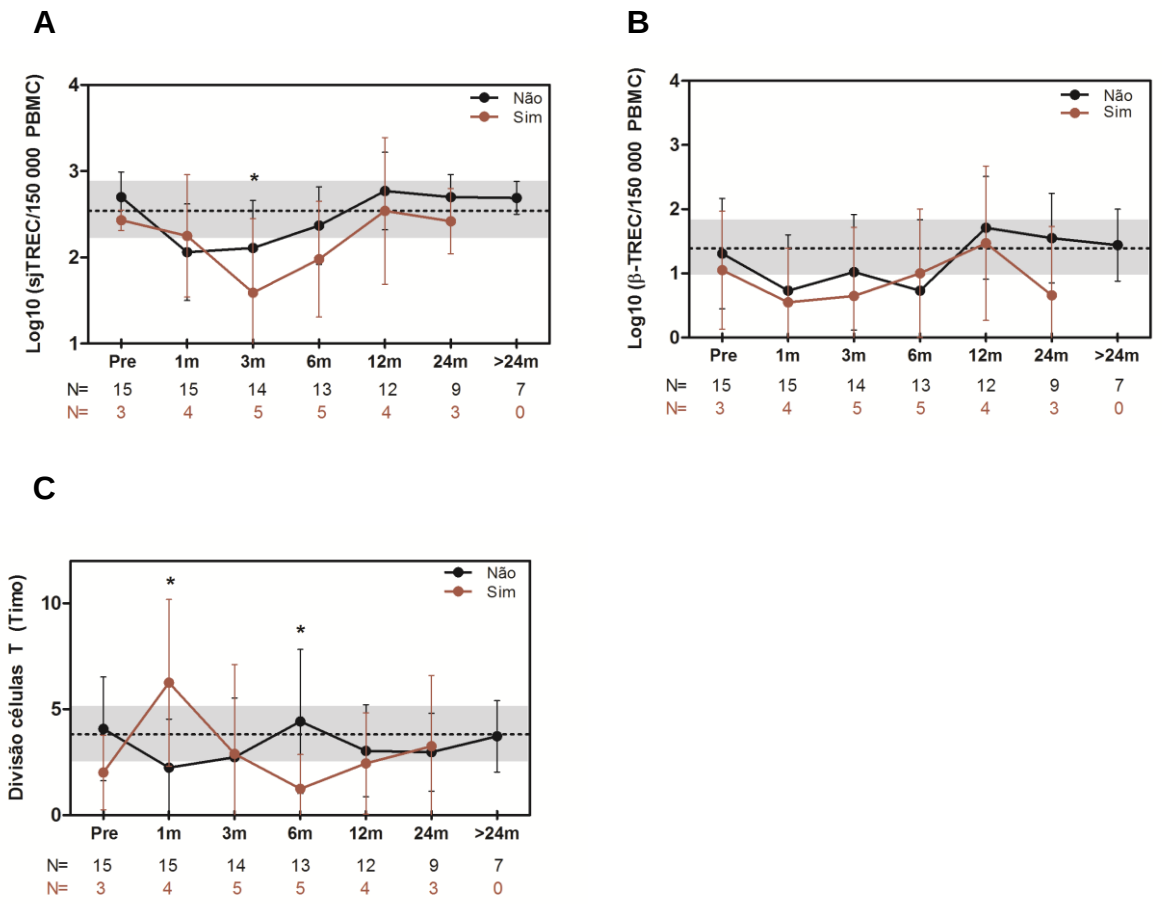
Figura 5. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que tiveram ou não reativação de CMV.



Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)** e β-TREC/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular intratímica foi calculada utilizando a fórmula: n° sjTREC = 2^n x n° de β-TRECs, ou 2^n = sjTREC/β-TRECs, ou nLog2 = Log(sjTREC/ β-TREC), finalmente, n = Log(sjTREC/β-TREC/Log2) **(C)**. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas indicam os valores da média do grupo controle. Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante. Sim, grupo de pacientes que apresentou reativação de CMV; Não, grupo de pacientes que não apresentou reativação de CMV.
Fonte: elaborado pelo autor (2017)

Em nosso estudo, cinco pacientes apresentaram perda do enxerto. Destes, três pacientes apresentaram perda de enxertia depois de 24 meses pós-transplante e outros dois pacientes entre 12 e 18 meses pós-transplante. Quando avaliamos a neogênese de células T observamos menores níveis de sjTREC nos pacientes que perderam o enxerto em comparação com os que não perderam aos 3 meses pós-transplante (p=0,01) (**Figura 6A** e **6B**). A taxa de proliferação intratímica do grupo que perdeu o enxerto aumentou significativamente 1 mês pós-transplante (p<0,01), porém, diminuiu significativamente em 6 meses (p=0,02) em relação aos pacientes que não perderam o enxerto (**Figura 6C**).

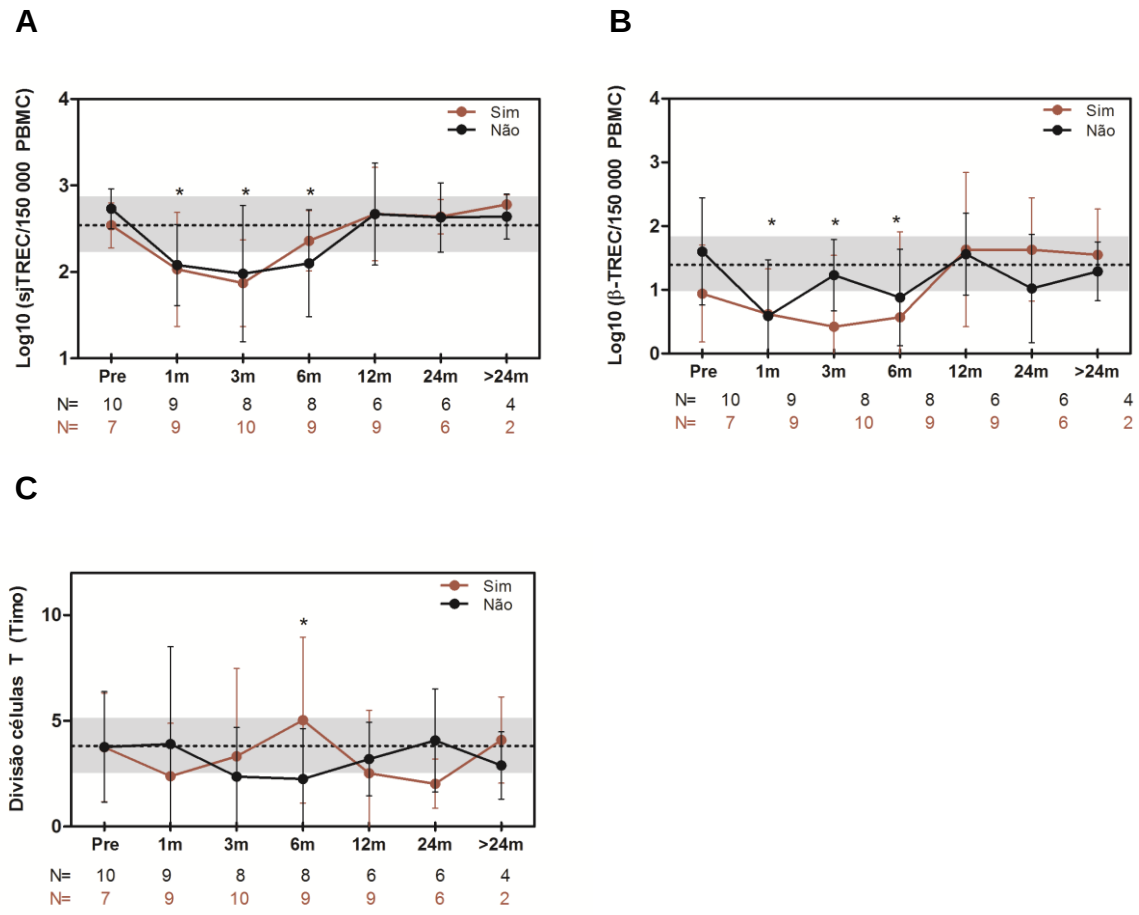
Figura 6. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que perderam ou não perderam o enxerto.



Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)** e β-TREC/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular intratímica foi calculada utilizando a fórmula: n° sjTREC = 2^n x n° de β-TRECs, ou 2^n = sjTREC/β-TRECs, ou nLog2 = Log(sjTREC/ β-TREC), finalmente, n = Log(sjTREC/β-TREC/Log2) **(C)**. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas indicam os valores da média do grupo controle. Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante. Sim, grupo de pacientes que perdeu o enxerto; Não, grupo de pacientes que não perdeu o enxerto.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Finalmente, avaliamos se a incompatibilidade ABO (maior, menor ou bidirecional) entre o paciente que recebeu o a medula e seu doador, poderia ter algum impacto na neogênese de células T e consequentemente na reconstituição imunológica após o TCTH. Os resultados não mostraram diferenças entre os níveis de sjTREC e β-TREC entre os grupos com ou sem, porém foram menores nos meses iniciais após o transplante nos dois grupos em relação ao grupo controle (p<0,01). Os pacientes que apresentaram incompatibilidade ABO com seu doador, apresentaram maior taxa de divisão celular em 6 meses pós-transplante (p=0,04) em relação aos pacientes que não apresentaram incompatibilidade ABO (**Figura 7**).

Figura 7. Neogênese de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que apresentaram ou não incompatibilidade ABO.



Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)** e β-TREC/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular intratímica foi calculada utilizando a fórmula: n° sjTREC = 2^n x n° de β-TRECs, ou 2^n = sjTREC/β-TRECs, ou nLog2 = Log(sjTREC/ β-TREC), finalmente, n = Log(sjTREC/β-TREC/Log2) **(C)**. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas indicam os valores da média do grupo controle. Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante. Sim, grupo de pacientes que apresentou incompatibilidade ABO; Não, grupo de pacientes que não apresentou incompatibilidade ABO.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

5.3 Avaliação da diversidade do repertório de linfócitos T

A função tímica também foi avaliada através do estudo da diversidade do repertório de linfócitos T (diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR) nos pacientes com DF tratados com hidroxiuréia, transfusão crônica ou TCTH alogênico e nos indivíduos saudáveis (grupo controle). O objetivo foi avaliar como os diferentes tratamentos afetam a composição do repertório de células T. Utilizamos a metodologia de *TCRBV CDR3 spectratyping* (PANNETIER et al., 1993) que permite a análise da composição clonal de uma população de células T e de sua diversidade geral baseada na distribuição dos segmentos de CDR3 (do inglês *Complementarity-Determining Regions*) do receptor de células T (TCR).A Figura **A.1** (**Apêndice A**) ilustra a representação esquemática do método *TCRBV CDR3 Spectratyping* e os padrões de distribuição da região CDR3 após a análise no software Gene Mapper™.

Neste estudo, classificamos as famílias Vβ como: **1. famílias policlonais gaussianas**, famílias que apresentaram múltiplos picos (ou segmentos) de CDR3 com uma distribuição gaussiana (ou normal) dos picos. **2. famílias policlonais não-gaussianas**, famílias que apresentaram múltiplos picos de CDR3 com uma distribuição anormal ou não-gaussiana dos picos (distribuição “desviada” ou *skewed*; por vezes apresentando descontinuidade devido à ausência de alguns picos, formando buracos no espectro). **3. famílias monoclonais**, famílias que apresentaram somente um pico de CDR3. Quando ocorreu a ausência de amplificação de determinada família em algum paciente ou entre os períodos do transplante, denominamos **famílias negativas** ou **famílias ausentes**. Consideramos um repertório restrito para uma determinada família Vβ quando foram encontrados ≤6 picos de CDR3, independentemente do perfil de distribuição dos picos, se gaussiano ou não-gaussiano. O repertório foi considerado diverso para uma determinada família Vβ quando ≥6 picos de CDR3 foram observados (WU et al., 2000).

De modo geral, observamos amplificação de todas as famílias Vβ, entretanto as famílias Vβ1, Vβ8, Vβ9, Vβ12 e Vβ19 foram as famílias mais ausentes, que não foram amplificadas em determinados pacientes ou períodos do transplante.

A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR (aumento ou diminuição) foi analisada com base no *complexity score* (CS) calculado para cada amostra (WU et al., 2000) que consiste na soma de todos os picos das 24 famílias Vβ, conforme

detalhado em Material e Métodos. Em indivíduos saudáveis, a maioria das famílias Vβ apresenta perfil policlonal gaussiano e possuem em média oito picos na região CDR3, embora possam ser encontradas famílias Vβ em expansões oligoclonais (FALLEN et al., 2003; WU et al., 2000). Em nosso trabalho, foram avaliados o repertório da cadeia Vβ do TCR de 14 indivíduos saudáveis afrodescendentes e a média dos *complexity scores* foi de 131,29, sendo que a maioria das famílias Vβ apresentou um perfil policlonal.

Em seguida, estão mostrados separadamente os resultados de diversidade do repertório de células T dos pacientes com AF convencionalmente tratados e dos pacientes com DF tratados com TCTH alogênico.

5.3.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente

A **Figura K.1** (**Apêndice K**) ilustra o repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um indivíduo saudável, mostrando o perfil dos espectros de CDR3 dentro de cada uma das 24 famílias Vβ analisadas. Adicionalmente, a **Figura L.1** (**Apêndice L**) mostra o repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com AF em tratamento com Hidroxiuréia; a **Figura M.1** (**Apêndice M**) ilustra o repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com AF em tratamento com transfusão crônica e, por fim, a **Figura N.1** (**Apêndice N**) representa o repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com AF sem tratamento.

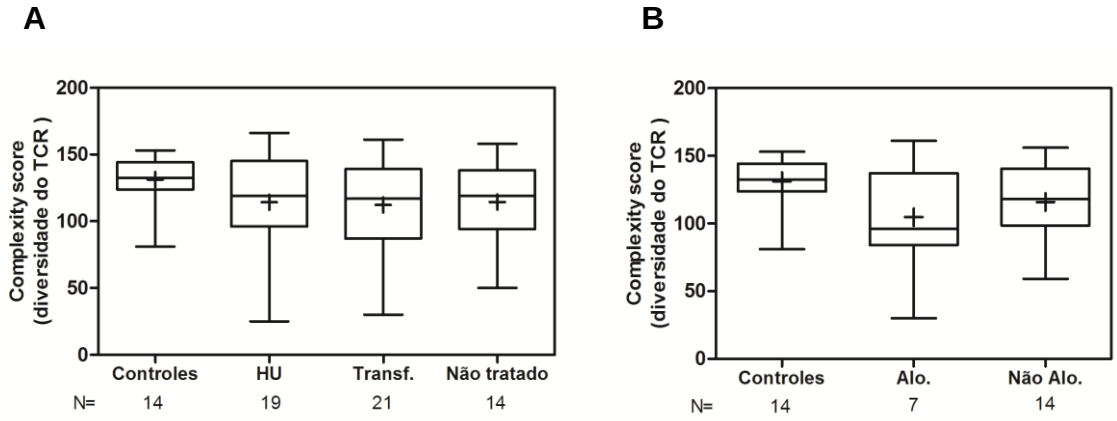
De forma geral, observamos que os pacientes sem tratamento apresentaram um repertório mais perturbado, com distribuição não-gaussiana dos picos de CDR3 entre as famílias.

Como podemos observar na **Figura 8A** abaixo, a diversidade do repertório de linfócitos T (com base na análise do *complexity score*) foi menor nos pacientes com AF em relação ao grupo controle saudável. Em relação aos tratamentos, o CS foi semelhante entre o grupo tratado com HU (média = 114,32) e o grupo sem tratamento (média = 114,36), sendo que o grupo tratado com transfusão crônica apresentou o menor CS (média = 112,19).

Da mesma forma, analisamos a diversidade do repertório de linfócitos T dos pacientes em regime de transfusão crônica que apresentaram ou não aloimunização

(**Figura 8B**). Observamos que os pacientes aloimunizados apresentaram uma dimunição do CS (média = 104,71) em relação ao grupo não aloimunizado (média = 115,93) e em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos, entretanto, estes resultados corroboram os resultados de neogênese das células T e sugerem que o processo de aloimunização tem impacto sobre a diversidade do repertório das células T dos pacientes com AF.

Figura 8. Diversidade do repertório de linfócitos T dos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados.



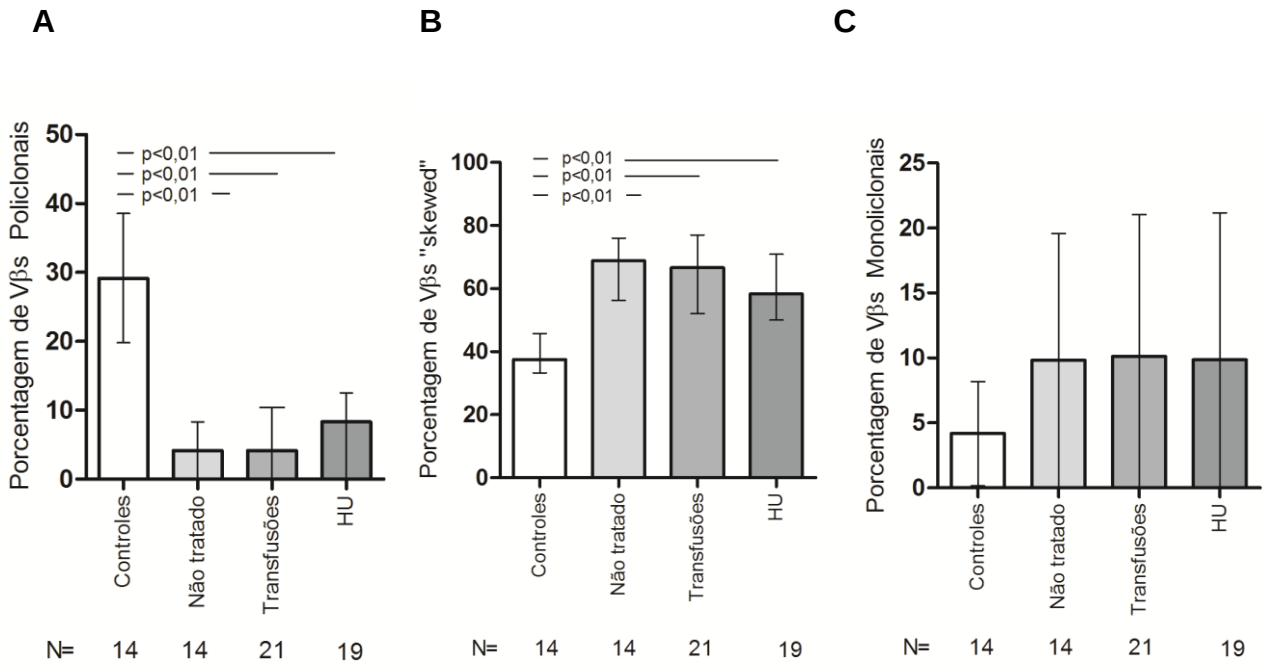
Diversidade do repertório de linfócitos T dos pacientes convencionalmente tratados **(A)** e nos pacientes tratados com transfusão crônica (aloimunizados e não aloimunizados) **(B)**. O repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisado pelo método de *TCRBV spectratyping*. A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada com base no "*complexity score*" e no número total de picos. As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, os pontos em forma de cruz dentro das caixas indicam a média, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os asteriscos indicam $p<0,05$. Alo, aloimunizado; Não Alo, não aloimunizado; HU, hidroxiuréia; Transf., transfusão crônica; TCR, Receptor de células T.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Considerando que a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR analisada com base no CS consiste na soma geral de todos os picos das 24 famílias Vβ, é importante uma análise mais detalhada do perfil de distribuição dos picos dentro de cada família, se possuem distribuição gaussiana ou não-gaussiana, a fim de compreender a composição do repertório do TCR não apenas em relação a quantidade de picos, mas também em relação ao grau de perturbação e composição dos picos de CDR3. Portanto, realizamos uma análise para determinar a porcentagem de cada perfil de distribuição dos picos de CDR3 em cada uma das famílias Vβ avaliadas em nosso estudo (FOZZA et al., 2015), que ocorreu da

seguinte forma: para cada paciente e indivíduo controle, foram analisados os espectros das 24 famílias Vβ do TCR, sendo que para cada família foi atribuído um escore entre quatro categorias: famílias que apresentaram perfil policlonal com distribuição gaussiana (≥ 8 picos); famílias que apresentaram múltiplos picos de CDR3 (2 a 6 picos) com distribuição desviada ou '*skewed*'; famílias que apresentaram apenas um pico de CDR3 (monoclonais) e famílias ausentes. Ao final, cada score foi somado e transformado em porcentagem, considerando que 100% corresponde ao total de 24 famílias Vβ do TCR que foram analisadas. Os resultados desta análise estão demonstrados na **Figura 9**.

Foi possível observar que o grupo controle apresentou porcentagem significativamente maior de famílias policlonais com distribuição gaussiana dos picos em relação aos grupos convencionalmente tratados e sem tratamento (**Figura 9A**). Interessantemente, o grupo tratado com hidroxiuréia apresentou maior porcentagem de famílias policlonais (7,9%) em relação aos grupos de pacientes tratados com transfusão (5,4%) e não tratados (5,1%). Além disso, a porcentagem de famílias Vβ do TCR que apresentaram um perfil perturbado (*skewed*) dos picos de CDR3 com distribuição não-gaussiana foi de 39,8% no grupo controle; 65,9% no grupo de pacientes não tratados; 62,8% no grupo de pacientes tratados com transfusões e 56,3% no grupo de pacientes tratados com HU (**Figura 9B**). A frequência de famílias que apresentaram apenas um pico de CDR3, consideradas famílias monoclonais, foi bastante homogênea entre os pacientes tratados com diferentes modalidades terapêuticas, sem diferença estatística comparando os grupos entre si e com o grupo controle (**Figura 9C**). O grupo controle apresentou menor porcentagem de famílias monoclonais (4,1%) em relação aos grupos de pacientes tratados ou não. A frequência de famílias monoclonais foi a mesma nos grupos de pacientes tratados com HU e não tratados (9,8%), e ligeiramente maior no grupo tratado com transfusões (10,1%). A porcentagem de famílias ausentes foi similar em todos os grupos. Conforme já citamos, as famílias que se apresentaram mais ausentes nos espectros dos pacientes incluídos neste estudo foram as famílias Vβ1, Vβ8, Vβ9, Vβ12 e Vβ19.

Figura 9. Porcentagem de famílias policlonais, ‘‘*skewed*’’ e monoclonais nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados.



Porcentagem das famílias que apresentaram múltiplos picos de CDR3 (≥ 8 picos) com uma distribuição gaussiana **(A)**, porcentagem das famílias que apresentaram picos de CDR3 (2 a 6 picos) com distribuição ‘‘*skewed*’’ ou ‘‘perturbada’’ não-gaussiana (**B)** e porcentagem das famílias que apresentaram somente um pico de CDR3 monoclonal **(C)**. Os valores representam a média (com desvio padrão) da porcentagem calculada entre as 24 famílias analisadas em cada paciente e indivíduo controle.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Utilizando o método de *TCRBV CDR3 spectratyping*, também é possível estimar a frequência de cada família Vβ no repertório de receptores de células T de um paciente analisado. No **Apêndice C**, as **Tabelas C.1** a **C.3**, mostram a frequência total (em %) de cada família Vβ nos linfócitos T periféricos dos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados ou sem tratamento.

Em nosso estudo, destacamos os resultados encontrados para as famílias Vβ3 e Vβ16 entre os pacientes com AF e o grupo controle. A frequência da família Vβ3 foi significantemente menor no grupo controle em relação ao grupo tratado com HU ($p = 0,01$) e ao grupo não tratado ($p<0,01$). Por outro lado, a frequência da família Vβ16 foi estatisticamente maior no grupo controle em relação aos grupos tratados com HU e transfusão crônica ($p = 0,03$ e $p<0,01$, respectivamente) e ao grupo sem tratamento ($p = 0,01$).

Nas **Tabelas C.4 a C.6**, constam as comparações entre as frequências de cada família Vβ entre os grupos de pacientes com AF entre si. Nestas análises, nós

observamos que os grupos apresentaram particularidades na expressão de determinadas famílias Vβ. O grupo tratado com HU apresentou menor frequência da família Vβ2 em relação ao grupo tratado com transfusões crônicas ($p = 0,04$). Porém, a família Vβ18 foi mais expressa em linfócitos de pacientes tratados com HU em relação aos tratados com transfusão crônica ($p = 0,01$). Adicionalmente, a família Vβ10 foi mais frequente no grupo tratado com HU em relação ao grupo sem tratamento ($p = 0,04$). Quando comparamos o grupo de pacientes tratados com transfusões com o grupo não tratado, observamos que a família Vβ3 foi significativamente mais expressa no grupo sem tratamento ($p = 0,01$).

Nós também avaliamos a frequência das famílias Vβ nos TCR dos pacientes tratados com transfusão crônica aloimunizados e não aloimunizados, cujos resultados estão sumarizados no **Apêndice F**. As **Tabelas F.1** e **F.2** mostram a frequência total (em %) de cada família Vβ entre os subgrupos e o grupo controle. A família Vβ16 foi mais frequente no grupo controle em relação aos subgrupos aloimunizados ($p < 0,01$) e não aloimunizados ($p = 0,03$), corroborando os resultados anteriores. O grupo aloimunizado apresentou maior frequência da família Vβ2 ($p = 0,01$) e menor frequência da família Vβ13 ($p = 0,02$) em relação ao grupo controle. Por outro lado, a família Vβ3 foi mais expressa no grupo de pacientes não aloimunizados em relação ao grupo controle ($p = 0,02$). A **Tabela F.3** mostra as diferenças entre as frequências das 24 famílias Vβ entre o grupo de pacientes tratados com transfusão crônica, aloimunizado e não aloimunizado. No grupo de pacientes aloimunizados, a família Vβ2 foi mais importante, sendo a mais frequente ($p = 0,03$) em relação ao grupo não aloimunizado. No entanto, a frequência das famílias Vβ13 ($p < 0,01$) e Vβ14 ($p = 0,01$) foi menor nos pacientes aloimunizados em relação aos não aloimunizados. Interessantemente, os pacientes aloimunizados apresentaram maior porcentagem de famílias monoclonais (11,9%) do que os pacientes não aloimunizados (9,2%), ou seja, um repertório de linfócitos T periéricos mais restrito.

5.3.2 Pacientes com Doença Falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas

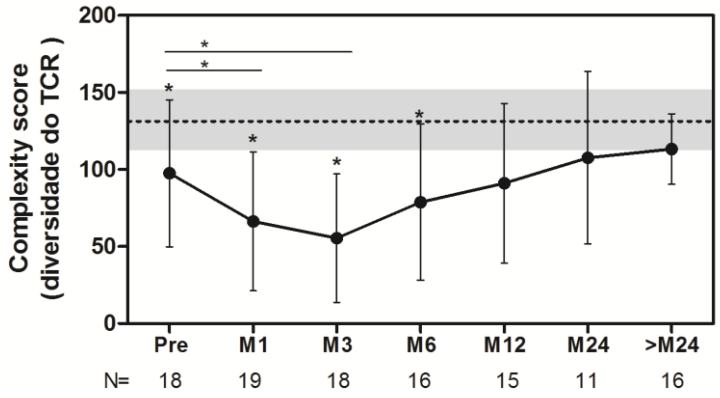
A Figura **O.1** (**Apêndice O**) mostra o repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com anemia falciforme antes (pre-transplante) e sequencialmente após o TCTH alogênico (períodos de 1 mês, 3 meses, 6 meses um ano e dois anos pós-transplante). De forma geral, observamos que houve uma diminuição do número total de picos CDR3 das cadeias Vβ dos TCRs nos primeiros três meses após o transplante em todos os pacientes, ou seja, uma menor

diversidade do repertório de linfócitos T calculada pelo CS (**Figura 10**). O número de picos diminuiu significantemente no período de um mês (p = 0,03) e três meses (p<0,01) em relação ao período pré transplante. Após três meses, observamos que o número total de picos de CDR3 das cadeias Vβ dos TCRs começou a aumentar, com aumento sequencial do CS até dois anos ou mais pós-transplante.

É importante destacar em nossos resultados, que os pacientes apresentaram um repertório mais restrito e com distribuição não gaussiana e *skewed* dos picos de CDR3 das 24 famílias Vβ dos TCRs no período pré-transplante. A média do CS dos pacientes neste período foi de 97,56, significantemente menor em relação ao grupo controle (p = 0,01). Como podemos observar na **Figura 10**, o CS dos pacientes transplantados também foi significantemente menor em relação ao grupo controle nos períodos de seguimento de um mês, três meses e seis meses pós-transplante (p<0,01).

Por outro lado, ressaltamos também o aumento da diversidade (aumento do número de picos de CDR3) após o transplante. O CS aumentou sequencialmente após 6 meses (CS médio = 78,8); 12 meses (CS médio = 91,3); 24 meses (CS médio = 107,6) e acima de 2 anos (CS médio = 113,2), demonstrando a diversificação do repertório de linfócitos T periféricos com a produção tímica *de novo* de células T naive após o TCTH. Esses resultados corroboram o aumento dos níveis de sjTRECs e β-TRECs a partir de 6 meses pós-transplante, conforme já descrito anteriormente.

Figura 10. Diversidade do repertório dos linfócitos T dos pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico.



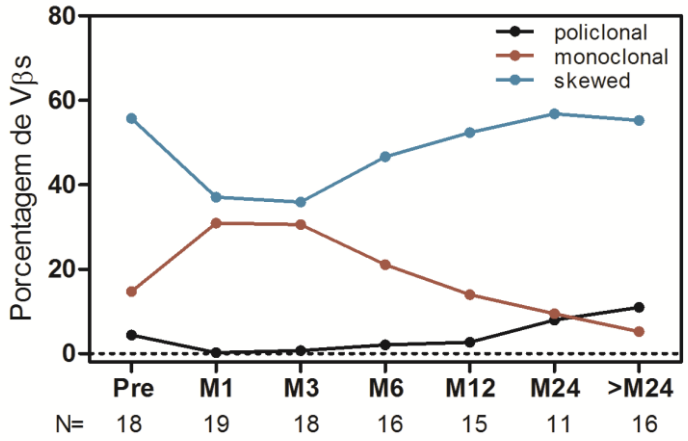
O repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisado pelo método de *TCRBV spectratyping*. A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada com base no "*complexity score*" e no número total de picos. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas

indicam os valores da média do grupo controle (n=14). Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Avaliamos também em todos os pacientes e em todos os períodos pós-transplante o perfil de distribuição dos picos de CDR3 de cada família Vβ, gaussiano ou não gaussiano, cujos dados estão demonstrados na **Figura 11**. Podemos observar que no período pré-transplante, o repertório do TCR é composto majoritariamente por famílias Vβ com padrão de distribuição dos picos de CDR3 "perturbado" ou não gaussiano (55,7%), seguido de famílias ausentes (25,2%) e monoclonais (14,6%) e apenas 4,3% de famílias policlonais. Interessantemente, a porcentagem de famílias monoclonais foi maior em 1 e 3 meses, o que era esperado devido a linfocitopenia e imunossupressão acentuadas nos primeiros meses após o transplante. Porém, a porcentagem de famílias Vβ monoclonais foi diminuindo sequencialmente após o transplante com a reconstituição do repertório por novas células T naive produzidas pelo timo e pela proliferação homeostática de células T residuais.

A **Figura 11** mostra que, após o TCTH, conforme a porcentagem de famílias Vβ monoclonais aumenta, a porcentagem de famílias Vβ *skewed* diminui, ocorrendo uma inversão a partir dos seis meses pós-transplante. Já a porcentagem de famílias Vβ policlonais foi baixa nos primeiros meses, aumentando a partir de um ano pós-transplante. Em conjunto, esses resultados demonstram a recuperação da diversidade do repertório de células T a partir de um ano pós-transplante, destacando-se o aumento da porcentagem de famílias Vβ policlonais nesse período em relação ao pré-transplante (4,3% *vs.* 10,9%).

Figura 11. Porcentagem de famílias policlonais, ''*skewed*'' e monoclonais nos pacientes com doença falciforme antes e após o TCTH alogênico.



Famílias policlonais foram definidas quando apresentaram múltiplos picos de CDR3 (≥ 8 picos) com uma distribuição gaussiana; famílias *skewed* foram definidas quando apresentaram picos de CDR3 (2

a 6 picos) com distribuição com distribuição ‘‘*skewed*’’ ou ‘‘perturbada’’ não-gaussiana, e famílias monoclonais foram definidas quando apresentaram somente um pico de CDR3 monoclonal. Os valores representam a média da porcentagem calculada entre as 24 famílias analisadas em cada paciente e em cada período. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

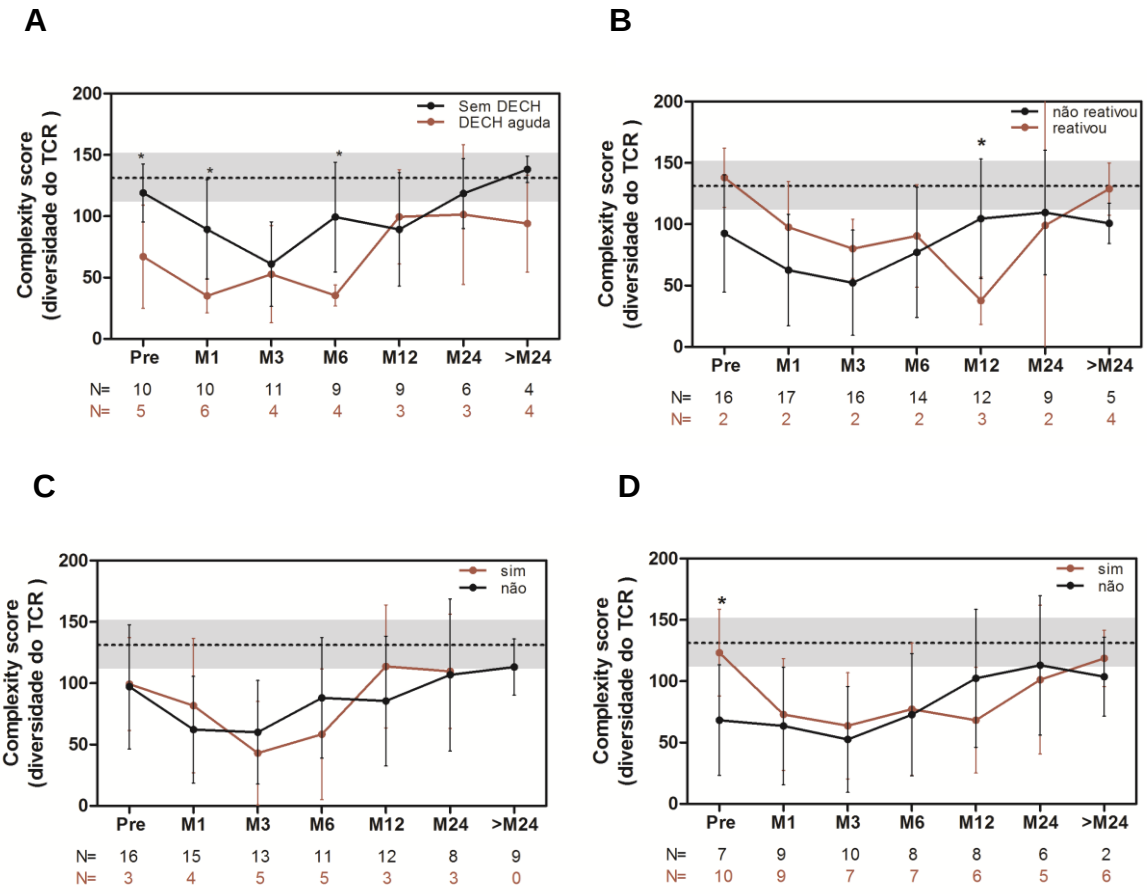
A diversidade do repertório de linfócitos T, com base no *complexity score* calculado, também foi avaliada nos grupos de pacientes que tiverem ou não: desenvolvimento de DECHa, reativação de citomegalovírus (CMV), perda do enxerto e incompatibilidade ABO (**Figura 12**).

Os pacientes com DECHa, apresentaram menor diversidade do repertório de células T em todos os períodos, com exceção do período de 12 meses pós-transplante (**Figura 12A**), em relação aos pacientes que não desenvolveram DECHa. Entretanto, esta diferença foi estatisticamente significativa somente nos períodos pré-transplante ($p = 0,04$), um mês ($p = 0,01$) e seis meses ($p<0,01$) pós-transplante.O CS dos pacientes que apresentaram DECH aguda também foi menor antes no período pré-transplante e até seis meses pós-transplante em relação ao grupo controle ($p<0,01$).

Na **Figura 12B**, podemos observar que os pacientes que tiveram reativação de CMV apresentaram um CS maior, na maioria dos períodos estudados, em relação aos pacientes que não tiveram reativação viral. Porém, no período 12 meses pós-transplante, os pacientes que tiveram reativação de CMV apresentaram uma diminuição significativa da diversidade geral do repertório ($p = 0,02$).

Nas **Figuras 12C** e **12D**, podemos observar a diversidade do repertório de linfócitos T entre os pacientes que apresentaram perda do enxerto e os pacientes que receberam medula óssea de doador ABO incompatível, respectivamente. Não houve diferenças significativas no CS dos pacientes que apresentaram ou não perda do enxerto. Embora, vale ressaltar que esses dois subgrupos apresentaram CS menor do que o grupo controle em todos os períodos ($p<0,01$), com exceção nos períodos acima de 2 anos pós-transplante. Já, os pacientes com incompatibilidade ABO apresentaram maior diversidade do repertório de células T do que pacientes sem incompatibilidade ($p<0,01$) apenas no período pré-transplante, sendo que após o transplante, as diferenças não foram estatisticamente significantes.

Figura 12. Diversidade do repertório de células T em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico que tiveram ou não DECH aguda, reativação de CMV, perda do enxerto e incompatibilidade ABO.



DECH aguda **(A)**, reativação CMV **(B)**, perda do enxerto **(C)** e incompatibilidade ABO **(D)**. O repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisado método de *TCRBV spectratyping*. A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada com base no "*complexity score*" e no número total de picos. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas indicam os valores da média do grupo controle (n=14). Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante. Sim, grupo de pacientes que apresentou perda de enxerto/incompatibilidade ABO; Não, grupo de pacientes que não apresentou perda de enxerto/incompatibilidade ABO.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Finalmente, a frequência de cada família Vβ foi calculada através do método de *TCRBV CDR3 spectratyping* para todos os períodos de seguimento dos pacientes submetidos ao TCTH alogênico. De forma geral, observamos que houve uma diminuição das frequências das famílias nos períodos iniciais (3 a 6 meses) pós-transplante, sendo que o período de um ano foi o mais importante onde ocorreu um aumento nas frequências da maioria das famílias. Os picos de CDR3 analisados, em cada família Vβ, apresentaram diferentes tamanhos, que variaram entre 4 a 16 resíduos de aminoácidos. O padrão de distribuição dos picos entre os pacientes foi

bastante diverso, variando ainda de acordo com o período do seguimento, entretanto podemos destacar o segmento de CDR3 de maior frequência sendo o de 10 resíduos de aminoácidos.

A família Vβ1 apresentou uma diminuição importante de sua frequência após o transplante, passando de 2,5% para 1,49% aos 12 meses pós-transplante e para 0,23 % aos 2 anos pós-transplante. Nos períodos iniciais, entre um a seis meses pós-transplante, as famílias Vβ3, Vβ6, Vβ9, Vβ10, Vβ11, Vβ17, Vβ23 e Vβ24 tiveram um aumento na frequência em relação ao período pré-transplante.

As famílias Vβ3, Vβ5, Vβ10, Vβ17, Vβ21, Vβ23 e Vβ24 também apresentaram diminuição da frequência nos períodos de seguimento mais tardios pós-TCTH. A família Vβ3, recuperou sua frequência inicial em um ano (9,3%), porém diminuiu novamente aos 24 meses (8,6%) ou mais de 24 meses pós-transplante (7,6%). Já a frequência da família Vβ5 diminuiu significativamente em um ano comparando-se com sua frequência antes do transplante (8,29 *vs.* 4,97%, p = 0,02), e mesmo com o aumento da frequência nos períodos mais tardios, ainda continuou menor do que antes do transplante. Analisando as famílias Vβ10, Vβ17, Vβ23 e Vβ24, todas apresentaram frequência aumentada nos períodos iniciais entre um a três meses em relação ao pré-transplante, entretanto esse aumento não se manteve ao longo dos períodos mais tardios, ocorrendo diminuição da frequência dessas famílias após 2 anos. A frequência da família Vβ21, passou de 9,4% para 7,4% aos seis meses pós-transplante, mas recuperou-se aos 12 meses pós-transplante.

Destacamos os resultados encontrados para as famílias Vβ2, Vβ8, Vβ13, Vβ14, Vβ16, Vβ20 e Vβ22. As famílias Vβ2 e Vβ13 foram as famílias que mais apresentaram perfil policlonal e gaussiano dos picos de CDR3 neste estudo. A família Vβ2 teve sua expressão diminuída apenas no primeiro mês pós-transplante, sendo sua frequência posteriormente mantida ao longo do seguimento dos pacientes deste estudo.

Algumas famílias apresentaram expansão muito relevante, dentre as quais destacamos as famílias Vβ8, Vβ13, Vβ14, Vβ16, Vβ20 e Vβ22. A frequência da família Vβ8 foi aumentando sequencialmente após um ano, passando de 1,09% antes do transplante para 2,43% ao final do seguimento (**Tabela H.6**, p = 0,01). O mesmo ocorreu com a família Vβ13, que apresentou aumento significativo da frequência no período >24 meses (**Tabela H.6**, p = 0,04). Embora a expressão da família Vβ14 tenha diminuído de 2,24 para 0,56% aos três meses pós-transplante (**Tabela H.2**, p<0,01), sua expressão aumentou sequencialmente após este período, sendo ainda maior no período >24 meses, em comparação com o período pré-transplante.

Similarmente, a família Vβ20 também foi menos expressa três meses após o TCTH alogênico (0,81%), porém apresentou uma expansão relevante para 3,37% aos seis meses pós-transplante que se manteve até 24 meses de seguimento (**Tabela H.5**, p = 0,01).

As famílias Vβ16 e Vβ22 apresentaram uma expansão relevante neste estudo. Antes do transplante, a frequência média da família Vβ16 foi de 4,44%, sendo sua expressão mantida ao longo dos períodos iniciais, com uma diminuição discreta aos seis meses pós-transplante. Em seguida, sua frequência aumentou significantemente, atingindo 7,95% aos 12 meses (**Tabela H.4**, p = 0,03) e 7,41% aos 24 meses pós-transplante (**Tabela H.6**, p = 0,02). Similarmente, a família Vβ22 também apresentou expressão alta em todos os seguimentos do transplante, sendo necessário ressaltar que foi a família mais frequente nos TCR dos linfócitos dos pacientes incluídos neste estudo, em todos os grupos de pacientes com DF estudados. Sua frequência variou de 17,6% antes do TCTH alogênico, chegando a 20,8% em um ano, mantendo-se ao redor de 19,8%.

As famílias Vβ4, Vβ6, Vβ7, Vβ11, Vβ15 e Vβ18, mantiveram o padrão de expressão antes do transplante e em todos os seguimentos após o transplante; não observamos diferenças importantes na frequência dessas famílias ao longo do tempo. Já as famílias Vβ9, Vβ12 e Vβ19 foram as menos frequentes, sendo que a família Vβ9 apresentou frequentemente um padrão monoclonal, com apenas um pico de CDR3 e sua frequência diminuiu após o transplante.

As frequências de cada família Vβ em cada um dos períodos de seguimento dos pacientes pós-TCTH foram também comparadas com as frequências do grupo controle. Os resultados das comparações entre todos os períodos de seguimento pré- e pós-transplante com o grupo controle encontram-se descritos no **Apêndice I**, nas **Tabelas I.1 a I.7**.

Entre estes resultados destacamos a diferença de expressão da família Vβ2, que foi mais frequente no grupo controle (5,57%) em relação ao pacientes com DF antes do transplante (**Tabela I.1**, p = 0,01) e até um ano pós-transplante (**Tabelas I.2-I5**, p<0,01). Destacamos ainda a família Vβ16 que apresentou uma frequência de 4,44% nos pacientes com DF no período pré-transplante, significantemente menor em relação ao grupo controle (6,95%). Aos 12 meses pós-transplante, a frequência da família Vβ16 aumentou significativamente e manteve-se similar a do grupo controle (**Tabelas I.5-I7**).

Interessantemente, as famílias Vβ23 e Vβ24 apresentaram maior frequência nos períodos um mês, três e seis meses pós-transplante, em relação ao grupo controle, demonstrando que esses clones de linfócitos foram expandidos nessa fase inicial de imunossupressão nos pacientes com DF. Outras famílias como a Vβ13, Vβ14, Vβ18 e Vβ20 apresentam frequência estatisticamente menores em relação ao grupo controle nestes mesmos períodos iniciais pós-TCTH alogênico. Por outro lado, a família Vβ8 que apresentou uma expansão clonal importante nos pacientes após o transplante, apresentou baixa frequência no grupo controle.

Adicionalmente, com base nos resultados encontrados na análise da diversidade do repertório de linfócitos T dos pacientes que desenvolveram ou não DECHa e que tiveram ou não reativação de CMV, a frequência das 24 famílias Vβ também foi avaliada nesses subgrupos de pacientes.

Conforme os resultados da **Figura 12A**, os pacientes com DECHa tiveram diversidade do repertório de linfócitos T significantemente menor no período pré-transplante e nos períodos de um mês e seis meses pós-transplante. A análise da frequência das famílias Vβ nestes períodos revelou diferenças significativas entre algumas famílias específicas, como as famílias Vβ1, Vβ2, Vβ14, Vβ15, Vβ18, Vβ20 e Vβ24.Todas as famílias apresentaram maior frequência nos pacientes sem DECH em relação aos pacientes com DECHa nestes períodos analisados, com exceção da família Vβ24, que apresentou expansão relevante nos pacientes com DECHa nos períodos de um mês ($p<0,01$) e seis meses ($p = 0,01$). Antes do transplante, as frequências das famílias Vβ1 ($p = 0,03$), Vβ15 ($p = 0,03$), Vβ18 ($p = 0,04$), e Vβ20 ($p = 0,04$), foram significantemente menores nos pacientes que desenvolveram DECHa. Após o transplante, as famílias Vβ2, Vβ13, Vβ14 e Vβ20, apresentaram frequências muito baixas nos períodos iniciais de um mês e seis meses nos pacientes com DECHa, comparado com os pacientes que não desenvolveram DECH.

Curiosamente, os pacientes que apresentaram reativação de CMV pós-transplante, tiveram uma diminuição significativa no CS, ou seja, da diversidade do repertório de células T aos 12 meses pós-transplante (**Figura 12B**). Neste período, as famílias Vβ16 e Vβ18 apresentaram frequência significativamente menores em relação aos pacientes sem reativação de CMV. A família Vβ8 estava ausente ($p = 0,02$) e a frequência da família Vβ18 foi de apenas 0,1% ($p<0,01$) nos pacientes que tiveram reativação de CMV. A família Vβ16 apresentou uma frequência de 3,4% nos pacientes que tiveram reativação de CMV e de 9% nos pacientes sem reativação do

vírus (p = 0,04). Quando avaliamos os períodos iniciais (3 meses e 6 meses) pós-transplante onde ocorreu a reativação viral nos pacientes, observamos que as famílias mais frequentes foram as famílias Vβ6, Vβ21 e Vβ22.

5.4 Avaliação da neogênese de células B pela quantificação de moléculas de *coding joint* (*Cj*) e *sjKREC*

Neste trabalho, nós também avaliamos a produção *de novo* de células B naive pela medula óssea dos pacientes com DF incluídos neste estudo. Esta análise foi também realizada em colaboração com o grupo do Prof. Antoine Toubert (Hospital Saint Louis – INSERM 1160 - Paris, França), com o objetivo de avaliar a neogênese das células B nos pacientes com DF não tratados e após tratamento com diferentes modalidades terapêuticas.

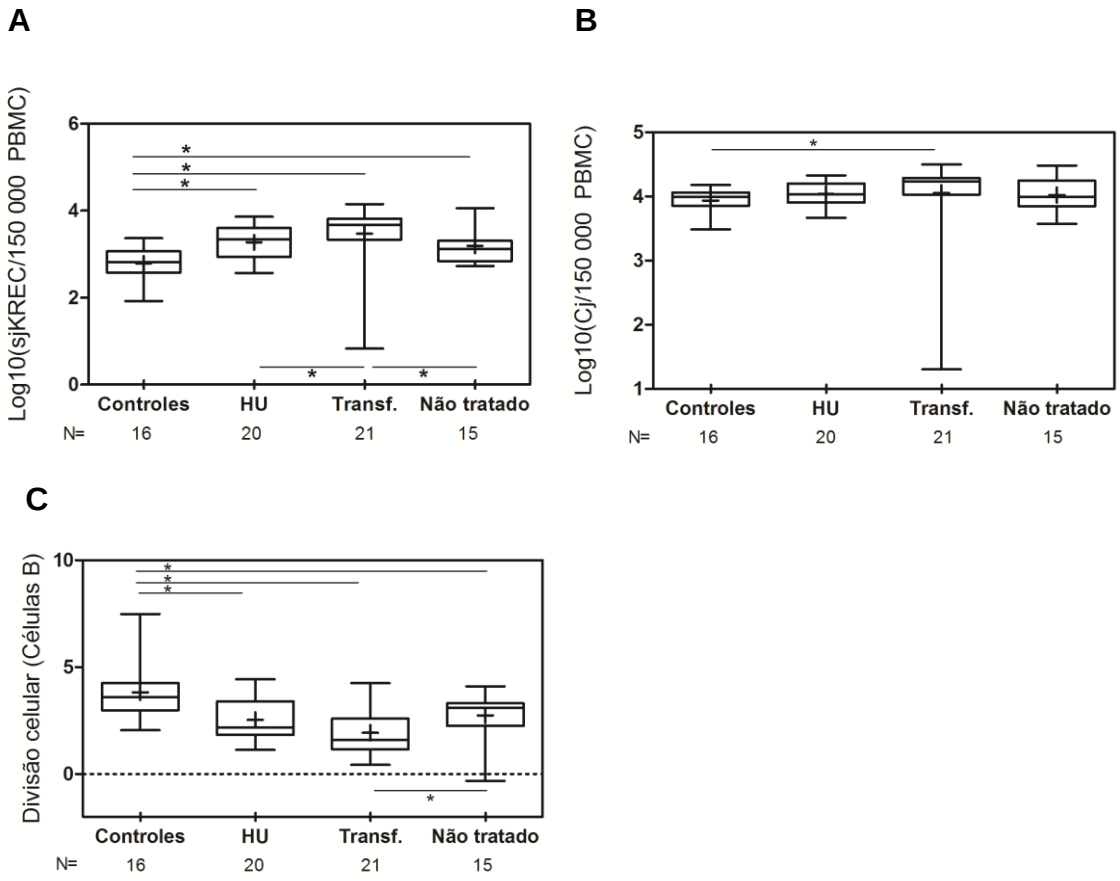
A avaliação da produção e proliferação de células B *naive* é possível através da quantificação de KRECs (do inglês, *Kappa-deleting recombination excision circles*) e do Cj (do inglês, *coding joint*). Os KRECs são gerados na medula óssea durante o desenvolvimento das células B, e da mesma forma que os sjTRECs, os KRECs não se duplicam durante a divisão celular, constituindo um marcador para avaliar a produção de novo de células B *naive* pela medula óssea. A razão entre Cj/KREC reflete a proliferação das células B após saída da medula óssea (VAN ZELM; VAN DER BURG; VAN DONGEN, 2007).

5.4.1 Pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente

Os resultados encontrados nas comparações entre os pacientes com AF convencionalmente tratados entre si e com o grupo controle encontram-se descritos no **Apêndice D** (**Tabela D.1**). Como podemos observar na **Figura 13A**, os pacientes com AF apresentaram aumento significativo dos níveis de sjKREC em relação aos indivíduos sadios (grupo controle), destacando-se principalmente o grupo de pacientes tratados com transfusão crônica (média = 3,47). O grupo sem tratamento apresentou a menores níveis de KRECs (média = 3,19) em relação aos grupos de pacientes tratados com HU ou transfusão. Complementando estes achados, encontramos uma maior expressão de Cj nos pacientes com AF em relação ao grupo controle, sendo significativamente maior no grupo de pacientes tratados com transfusão crônica (p = 0,01) (**Figura 13B**).

Conforme esperado, um aumento na produção de KRECs, resulta na menor taxa de divisão celular periférica das células B, demonstrada pela razão entre Cj/KREC em nosso estudo (**Figura 13C**). O grupo controle apresentou maior taxa de divisão celular periférica das células B em relação aos pacientes com AF. Por outro lado, o grupo de pacientes tratados com transfusão crônica foi o que obteve a menor taxa de divisão celular.

Figura 13. Neogênese de células B nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados.

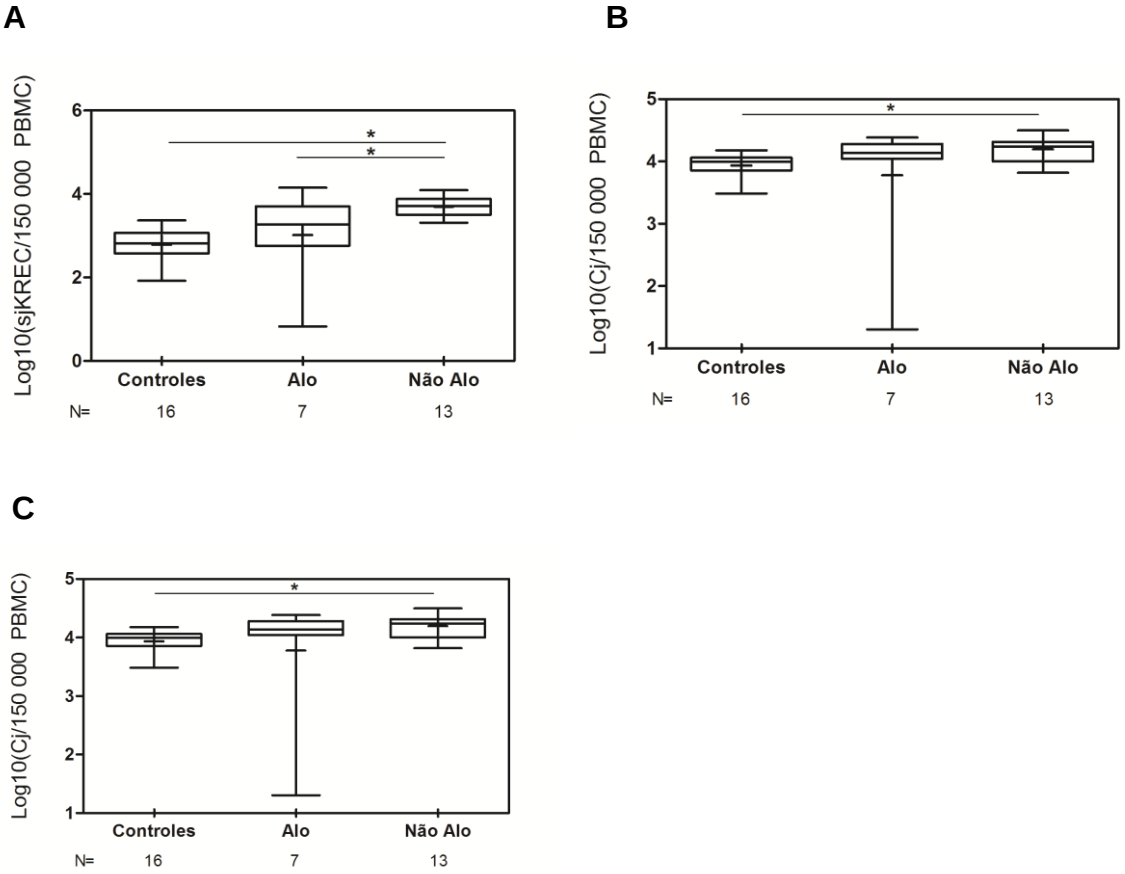


Log10 sjKREC/150000 PBMC **(A)** e Cj/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular das células B no sangue periférico foi calculada utilizando a fórmula: n° Cj = 2^n x n° de sjKRECs, ou 2^n = Cj/sjKRECs ou nLog2 = Log(Cj/sjKREC), finalmente, n = Log(Cj/sjKREC/Log2) **(C)**. As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, os pontos em forma de cruz dentro das caixas indicam a média, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os asteriscos indicam p<0,05. HU, hidroxiuréia; Transf., transfusão crônica.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Uma vez que os pacientes com AF em tratamento com transfusão crônica destacaram-se pela produção expressiva de KRECs e Cj, uma avaliação mais detalhada

entre os pacientes transfundidos aloimunizados e não aloimunizados tornou-se fundamental. Os resultados desta análise foram descritos no **Apêndice E** (**Figura E.1**) e estão representados na **Figura 14**. Interessantemente, os pacientes não aloimunizados apresentaram níveis mais elevados de KREC e Cj em comparação com os pacientes aloimunizados e indivíduos sadios (**Figura 14A** e **Figura 14B**), Estes resultados sugerem que a aloimunização leva a uma maior divisão das células B na periferia, embora os dois subgrupos de pacientes transfundidos apresentem divisão celular periférica das células B significantemente menor em relação aos indivíduos saudáveis (**Figura 14C**).

Figura 14. Neogênese de células B nos pacientes com anemia falciforme tratados com transfusão crônica (aloimunizados e não aloimunizados).



Log10 sjKREC/150000 PBMC **(A)** e Cj/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular das células B no sangue periférico foi calculada utilizando a fórmula: n° Cj = 2^n x n° de sjKRECs, ou 2^n = Cj/sjKRECs ou nLog2 = Log(Cj/sjKREC), finalmente, n = Log(Cj/sjKREC/Log2) **(C)**. As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, os pontos em forma de cruz dentro das caixas indicam a média, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os asteriscos indicam p<0,05. Alo, aloimunizado; Não Alo, não aloimunizado.
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

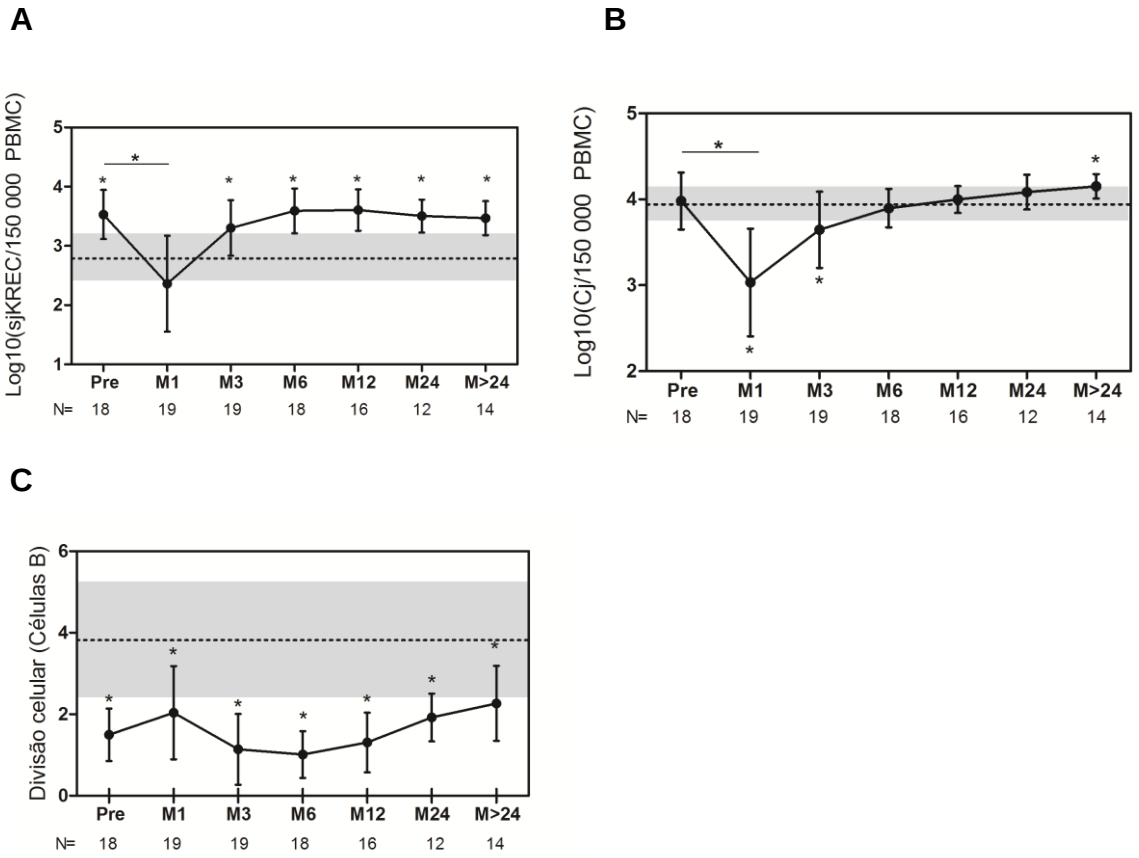
5.4.2 Pacientes com doença falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas

Os resultados mostraram que a produção de novas células B diminuiu drasticamente logo no primeiro mês pós-transplante ($p<0,01$), sendo reestabelecida aos seis meses pós-transplante e o *output* de novas células B mantêm-se elevado por um longo período após o TCTH alogênico (**Figura 15A**). Os resultados das comparações do período pré-transplante com todos os períodos pós-transplante estão descritos no **Apêndice J** (**Tabela J1**). Surpreendentemente, observamos que esta geração *(output)* de novas células B antes do transplante e a partir de seis meses pós-transplante, é significantemente maior nos pacientes com DF em comparação com indivíduos saudáveis (**Tabela J2**).

A quantidade total de células B, pode ser inferida pela quantificação do Cj (*cint*), resultante do rearranjo da cadeia pesada das imunoglobulinas, o qual permanece estável no genoma de todos os linfócitos B. Em nosso estudo, observamos que a cinética dos níveis de Cj foi muito similar à cinética dos sjKRECs (**Figura 15B**). A média de Cj no período pré-transplante foi muito próxima à do grupo controle. No período de um mês pós-transplante houve uma diminuição significativa do total de células B ($p<0,01$), ou sejam dos níveis de Cj. Em seguida, houve um aumento contínuo dos níveis de Cj ao longo dos períodos pós-transplante, sendo significantemente maior do que o grupo controle aos 12 ou mais meses pós-transplante ($p = 0,04$, **Tabela J2**).

O aumento na produção de sjKRECs (**Figura 15A**) após o transplante resultou numa menor taxa de divisão celular periférica das células B (**Figura 15C**). Em comparação com o grupo controle, essa taxa foi menor no período pré-transplante e em todos os períodos de seguimento pós-transplante ($p<0,01$, **Tabela J2**).

Figura 15. Neogênese de células B nos pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico.



Log10 sjKREC/150000 PBMC **(A)** e Cj/150000 PBMC **(B)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina. Divisão celular das células B no sangue periférico foi calculada utilizando a fórmula: n° Cj = 2^n x n° de sjKRECs, ou 2^n = Cj/sjKRECs ou nLog2 = Log(Cj/sjKREC), finalmente, n = Log(Cj/sjKREC/Log2) **(C)**. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Áreas sombreadas indicam os valores do grupo controle saudável e as linhas pontilhadas indicam os valores da média do grupo controle (n=16). Os asteriscos indicam p<0,05. Pre, período pré-condicionamento. 1m, 3m, 6m, 12m, 24m e >24m, meses pós transplante.
Fonte: elaborado pelo autor (2017)

Avaliamos também a neogênese das células B nos pacientes divididos em grupos em relação ao desenvolvimento ou não de DECHa, reativação ou não de CMV, perda ou não do enxerto e presença de incompatibilidade ABO, entretanto, não encontramos nemhuma diferença estatística significativa nas comparações entre esses grupos de pacientes.

5.5 Análise multivariada

Conforme já ressaltamos em vários momentos na descrição de nossos resultados, a correlação dos parâmetros clínico-laboratoriais com os resultados imunológicos avaliados foi uma abordagem muito relevante em nosso estudo. Portanto, nós realizamos uma análise multivariada, seguindo um modelo de regressão linear múltiplo, considerando algumas características clínicas dos pacientes em relação as respostas de sjTREC, sjKREC e diversidade do repertório de células T calculado pelo CS. Na análise transversal dos pacientes convencionalmente tratados, nós consideramos os parâmetros como a idade, níveis de HbS, HbF e HbA_2; estado da função esplênica (baço de dimensões normais, autoesplenectomia e esplenectomia cirúrgica) e finalmente se o paciente apresentou algum tipo de infecção bacteriana no histórico clínico. Os resultados estão mostrados na **Tabela 5**.

Nós encontramos uma correlação negativa entre a idade dos pacientes e os níveis de sjTREC, o que era esperado pois quanto maior a idade, menores os níveis de sjTREC, devido ao decréscimo da função tímica com a idade. Por outro lado, não houve correlação da diversidade do repertório de células T ou CS com parâmetros clínico-laboratoriais.

Resultados importantes foram encontrados na correlação dos níveis de sjKREC com função esplênica e infecções bacterianas (**Tabela 5**). De acordo com a análise multivariada, o estado da função esplênica dos pacientes com AF influenciou diretamente os níveis de sjKREC.

Avaliamos separadamente a correlação dos parâmetros clínicos da função esplênica apresentados pelos pacientes nos exames de imagem (autoesplenectomia, esplenectomia cirurgia e baço de dimensões normais) com os níveis de sjKREC. Os resultados revelaram uma diferença estimada positiva na comparação entre os parâmetros do baço dos pacientes com AF em relação ao estado esplênico do grupo controle, que assumimos ter função esplênica normal. A diferença estimada positiva indica que ter comprometimento da função esplênica leva ao aumento dos níveis de de sjKREC em relação ao grupo controle saudável que não possui comprometimento da função esplênica ($p < 0,01$) (**Tabela 5**).

Nesta mesma análise, a ocorrência de um ou mais episódios de infeções bacterianas no histórico clínico também aumentou em 0,25 os níveis de sjKREC ($p =$

0,04) em relação aos pacientes que não apresentaram infecções bacterianas no histórico clínico. Desta forma, nossos resultados indicam que a função esplênica bem como o acometimento por infecções bacterianas, interferiram na neogênese e/ou no compartimento das células B.

No estudo prospectivo com os pacientes tratados com TCTH alogênico, nós escolhemos o período de um ano pós-transplante e correlacionamos com os níveis de HbS e HbA_2, com o número total de células CD34+ e com o número total de células nucleadas (TCN) infundidas em cada paciente, entretanto, não encontramos nenhuma correlação destes dados clínico-laboratoriais com os resultados de sjTREC/sjKREC/CS.

Tabela 5. Relação de variáveis (parâmetros clínicos) em relação aos níveis de sjTREC, sjKREC e CS em pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados.

	sjTREC			**sjKREC**			**CS**		
	Diferença estimada	IC	P	Diferença estimada	IC	P	Diferença estimada	IC	P
Parâmetros									
Idade	-0,02	(-0,04;0)	**0,02**	0	(-0,02;0,02)	0,72	-0,28	(-2,08;1,51)	0,75
HbS	0,00	(-0,01;0)	0,17	0	(-0,01;0)	0,31	0,21	(-0,32;0,75)	0,42
HbF	0,00	(-0,01;0,02)	0,77	-0,01	(-0,03;0,01)	0,16	1,56	(-0,29;3,42)	0,10
HbA_2	0,02	(-0,04;0,09)	0,45	-0,01	(-0,08;0,07)	0,89	-0,19	(-7,15;6,76)	0,95
Baço (autoesplenectomia *vs.*grupo controle)	0,15	(-0,22;0,53)	0,41	0,49	(0,19;1,11)	**<0,01**	-5,54	(-42,7;31,6)	0,76
Baço (esplenectomia cirúrgica *vs.* grupo controle)	0,06	(-0,35;0,47)	0,76	0,50	(0,20;0,81)	**<0,01**	-11,2	(-53,4;31,0)	0,59
Baço (baço dimensões normais *vs.* grupo controle)	0,09	(-0,23;0,41)	0,57	0,65	(-0,25;0,51)	**<0,01**	5,66	(-27,6;38,9)	0,73
Infecções bacterianas (sim-não)	0,01	(-0,19;0,22)	0,89	0,25	(0;0,49)	**0,04**	6,51	(-15,4;28,4)	0,55

IC, Intervalo de confiança; CS, *Complexity Score*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

5.6 Comparação da neogênese de células T e B e do repertório de células T entre as diferentes modalidades terapêuticas

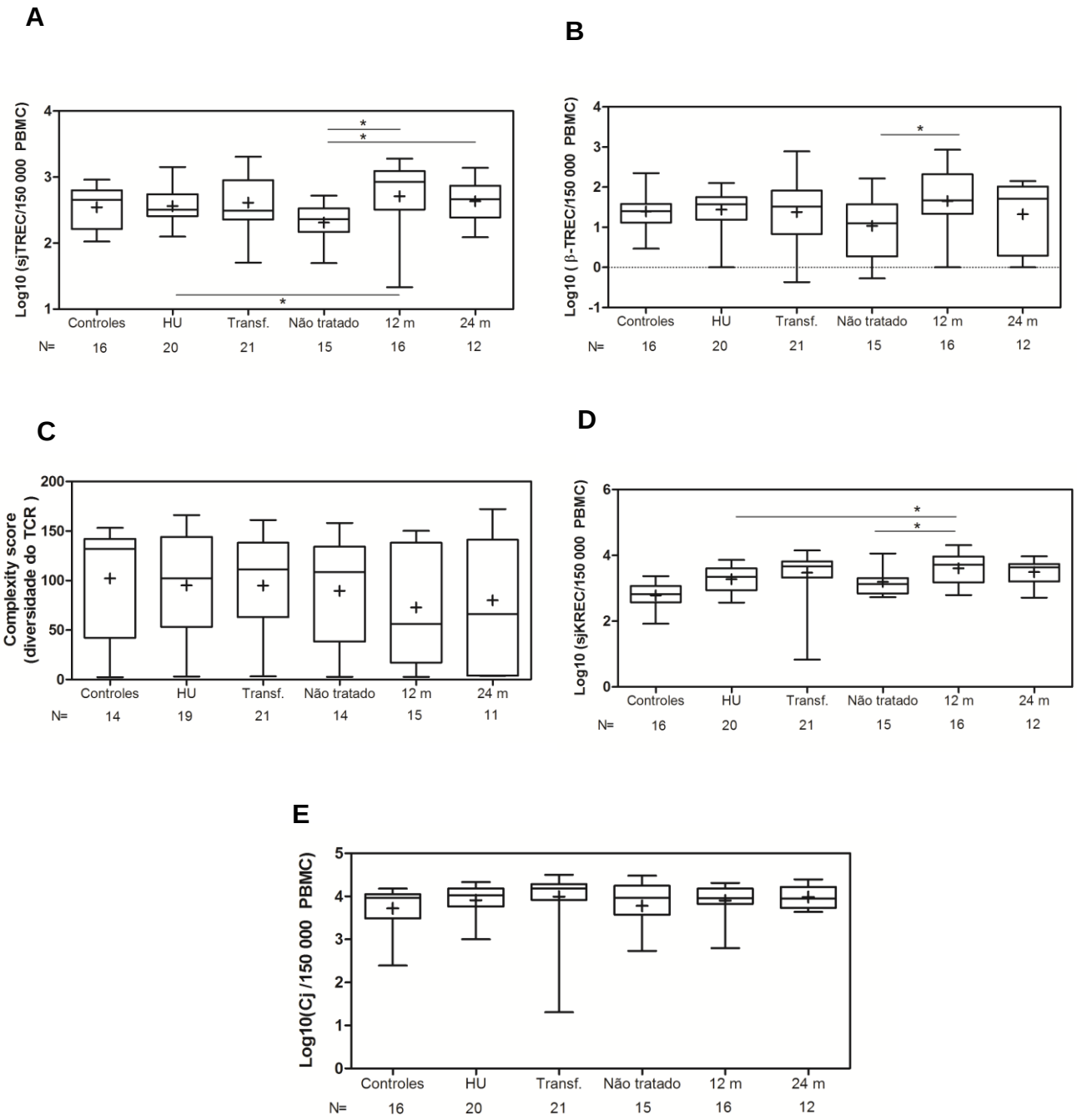
Um dos objetivos de nosso estudo foi avaliar o impacto das três opções terapêuticas utilizadas para pacientes com DF no sistema imune adaptativo dos pacientes, mais especificamente na neogênese de células T e B pelo timo e medula óssea, respectivamente. Para tal, comparamos entre os níveis de sjTREC, β-TREC, Cj, sjKREC e CS em pacientes com DF tratados (com HU, com transfusão crônica ou com o TCTH alogênico), pacientes com DF não tratados e indivíduos sadios (grupo controle).

Em relação à neogênese das células T, observamos que o grupo de pacientes transplantados (12 meses pós-transplante) apresentou maiores níveis de sjTREC e β-TREC, tanto em comparação com o grupo controle quanto em relação aos grupos convencionalmente tratados. Diferenças significativas foram encontradas na comparação dos pacientes transplantados com o grupo de pacientes não tratados, tanto para o sjTREC ($p<0,01$) quanto para o β-TREC ($p = 0,03$) (**Figura 16A** e **16B**).

Maiores níveis de sjTREC foram encontrados nos pacientes transplantados (12 meses pós-transplante) em relação aos pacientes tratados com HU ($p = 0,04$), e nos pacientes transplantados (24 meses pós-transplante) em relação aos pacientes não tratados ($p = 0,01$) (**Figura 16A**). Por outro lado, a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR (CS) foi maior no grupo controle e nos grupos dos pacientes tratados convencionalmente do que nos pacientes transplantados, embora não houve diferença estatística (**Figura 16C**).

Resultados semelhantes foram encontrados na comparação da neogênese das células B, onde os níveis de sjKREC foram maiores nos pacientes transplantados (12 meses pós-transplante) em relação aos pacientes não tratados ($p = 0,02$) e pacientes tratados com HU ($p = 0,03$) (**Figura 16D**). Observamos também que os pacientes transplantados, 12 meses pós-transplante apresentaram maiores níveis de sjKREC em relação a todos os outros grupos, demonstrando uma maior produção de células B naive pela medula óssea de pacientes com DF submetidos ao TCTH alogênico.

Figura 16. Comparação da neogênese de células T e B e diversidade do repertório de células T nos pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas.



Log10 sjTREC/150000 PBMC **(A)**, β-TREC/150000 PBMC **(B)** Log10 sjKREC/150000 PBMC **(D)** e Cj/150000 PBMC **(E)** quantificados por RT-PCR, normalizados para o gene da albumina **(D)**. Diversidade do repertório Vβ do TCR **(C)** analisado pelo método de *TCRBV spectratyping*. A diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi analisada com base no "*complexity score*" e no número total de picos. As extremidades das caixas indicam o 25th e o 75th percentis, as linhas dentro das caixas indicam a mediana, os pontos em forma de cruz dentro das caixas indicam a média, e as barras de erro se estendem do menor ao maior valor. Os asteriscos indicam p<0,05. 12m e 24m, meses pós transplante.

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

6. Resumo dos Resultados

6 RESUMO DOS RESULTADOS

6.1 Neogênese de células T e B em pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente

1. Pacientes com AF sem tratamento apresentaram menores níveis de sjTREC, β-TREC e baixa taxa de divisão celular intratímica;
2. Pacientes tratados com HU ou transfusões apresentaram maior neogênese de células T em relação aos pacientes sem tratamento;
3. Pacientes tratados convencionalmente apresentaram menor diversidade do repertório de linfócitos T em relação aos indivíduos saudáveis;
4. Pacientes tratados com HU apresentaram maior porcentagem de famílias Vβ com perfil policlonal e menor porcentagem de famílias com perfil perturbado (*skewed)* em relação aos pacientes tratados com transfusões ou sem tratamento.
5. Pacientes sem tratamento apresentaram um repertório de células T *skewed*, composto predominantemente por famílias com distribuição não-gaussiana dos picos de CDR3;
6. A família Vβ3 foi a mais frequente nos pacientes com AF, enquanto a família Vβ16 apresentou baixa expressão nos pacientes com AF em relação ao grupo controle;
7. As famílias Vβ10 e Vβ18 foram mais expressas nos pacientes tratados com HU;
8. A família Vβ2 foi mais expressa nos pacientes aloimunizados;
9. Pacientes com AF apresentaram maior produção de células B *naïve* e maior proliferação homeostática em relação ao grupo controle saudável;
10. Pacientes em tratamento com transfusão crônica apresentaram aumento expressivo dos níveis de sjKREC e Cj;
11. O estado da função esplênica e ocorrência de infecções bacterianas correlacionaram positivamente com o aumento dos níveis de sjKREC, ou seja, aumento da neogênese das células B.

6.2 Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com transplante de células tronco hematopoéticas

1. Nos primeiros três meses pós-transplante a neogênese de células T diminuiu consideravelmente, recuperando-se em um ano;
2. O desenvolvimento de DECHa comprometeu a produção células T *naïve* nos primeiros seis meses e os pacientes também apresentaram menor diversidade no repertório de células T;
3. Pacientes que tiveram reativação de CMV após o transplante apresentaram menores níveis de sjTREC e β-TREC nos períodos iniciais pós-transplante;
4. Os pacientes apresentaram repertório pouco diverso no período pré-transplante, porém, houve um aumento da diversidade do repertório de células T aos dois anos pós-transplante, com aumento de famílias policlonais e diminuição das famílias monoclonais;
5. A família Vβ2 apresentou um perfil policlonal e gaussiano dos picos de CDR3 em todos os períodos de seguimento pós-transplante, porém foi menos frequente em todos os períodos em relação ao grupo controle;
6. As famílias Vβ8, Vβ13, Vβ14, Vβ16, Vβ20 e Vβ22 apresentaram expansões relevantes, sendo que a família Vβ22 manteve alta expressão em todos os seguimentos pós-transplante, sendo a família Vβ mais frequente nos TCRs dos linfócitos dos pacientes avaliados neste estudo;
7. A família Vβ24 apresentou alta expressão nos períodos iniciais pós-Tx nos linfócitos dos pacientes que tiveram DECHa;
8. As famílias Vβ16 e Vβ18 foram menos expressas nos pacientes que tiveram reativação de CMV;
9. Houve maior produção de sjKRECs nos pacientes no período pré-transplante e a partir dos seis meses pós-transplante, em relação ao grupo controle;
10. Houve diminuição da produção de sjKREC e Cj no primeiro mês pós-transplante, porém a partir do terceiro mês a produção aumentou e manteve-se em todos os períodos após o transplante.

6.3 Comparação da neogênese de células T e B e do repertório de células T entre as diferentes modalidades terapêuticas

1. Os pacientes tratados com TCTH alogênico apresentaram maior neogênese das células T e B no período de um ano pós-transplante em relação aos pacientes convencionalmente tratados;
2. A diversidade do repertório de células T nos pacientes tratados com TCTH alogênico e nos pacientes convencionalmente tratados foi similar.

7. Discussão

7 DISCUSSÃO

7.1 Neogênese de células T e B e diversidade do repertório de células T em pacientes com anemia falciforme tratados convencionalmente

7.1.1 Neogênese de células T

Componentes do microambiente tímico, como citocinas (IL-7 e IL-22), hormônios (hormônios do crescimento, prolactina, glicocorticoides) e componentes da matriz extracelular são alterados durante condições patológicas como infecção e desnutrição, podendo levar a uma desregulação de moléculas que podem impactar a migração das células T intratímicas e periféricas, incluindo linfócitos imaturos e maduros (LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017; LYRA et al., 1993; MENDES-DA-CRUZ et al., 2006; SAVINO et al., 2015; SAVINO; DARDENNE, 2010). Interessantemente, pacientes com AF são caracterizados pelos níveis aumentados de TNF-α, IL-8, IL-1β e PGE2 (LANARO et al., 2009; QARI; DIER; MOUSA, 2012). Vale ressaltar que altos níveis de TNF-α estão associados ao aumento da apoptose dos timócitos durante a sepse em modelos animais (WANG et al., 1994).

Uma das hipóteses de nosso estudo é que pacientes com DF sem tratamento tem comprometimento da timopoiese decorrente do quadro inflamatório mais acentuado e dos altos níveis de HbS nestes pacientes, que leva a maior falcização das hemácias, causando microinfartos no tecido tímico e piorando o quadro vaso-oclusivo. Até o momento, não existem estudos na literatura sobre a função tímica de pacientes com DF, sendo este, o primeiro trabalho a avaliar a neogênese de células T e o repertório de células T nesses pacientes.

Nossos resultados revelaram alterações importantes na neogênese dos linfócitos T no grupo de pacientes sem tratamento, que apresentaram menores níveis de sjTREC, β-TREC e baixa taxa de divisão celular intratímica, em relação aos pacientes tratados com HU e TF. De fato, um estudo demonstrou que as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ *naive* estavam diminuídas num grupo de pacientes com DF sem tratamento, em relação a pacientes tratados com HU ou TF (NICKEL et al., 2015). Nossos resultados corroboram os achados de Nickel et al., pois os níveis mais baixos de sjTREC refletem uma menor proporção de células T *naive* recém-emigrantes do timo nestes pacientes. Por outro lado, a baixa contagem

de moléculas de β-TREC, reflete um desequilíbrio da geração de novas células T no timo, pois a recombinação da cadeia β do TCR precede a recombinação da cadeia α, quando os timócitos ainda estão no estágio duplo negativo. Estes achados, sugerem que nestes pacientes, pode haver um comprometimento tímico com impacto nos estágios iniciais de diferenciação dos timócitos no timo, resultando em baixa proliferação intratímica.

Por outro lado, nossos resultados mostraram que os tratamentos com transfusão crônica (TF) ou hidroxiuréia (HU) melhoraram a neogênese das células T, comparando aos pacientes com AF sem tratamento.

Nickel e colaboradores (2015) avaliaram a influência dos tratamentos com HU e TF no perfil imunológico de pacientes com DF e observaram que o número absoluto da maioria das populações celulares analisadas (células NK, linfócitos T e B, linfócitos T CD4+ e CD8+ *naïve* e de memória, células Tregs) estava aumentado no grupo tratado com TF em relação ao grupo tratado com HU e ao grupo de indivíduos saudáveis, sendo que o perfil imunológico dos pacientes tratados com HU foi o mais próximo do perfil do grupo dos indivíduos saudáveis (NICKEL et al., 2015). Em nosso estudo, os pacientes com AF tratados com HU também apresentaram melhores níveis de sjTREC e β-TREC, muito próximo dos resultados do grupo controle saudável.

Pacientes com AF em tratamento com HU apresentam menores níveis de TNF-α e maiores níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, sendo que a HbF pode ter um papel no aumento da IL-10 (LANARO et al., 2009). Os pacientes tratados com HU em nosso trabalho, apresentaram maior porcentagem de HbF em relação aos pacientes sem tratamento ou tratados com TF, cujos níveis mais elevados são associados ao melhor prognóstico da doença, levando a diminuição da inflamação, melhora dos parâmetros clínicos e hematológicos bem como redução no número de infecções (CANÇADO et al., 2009; LAURANCE et al., 2010; SILVA-PINTO et al., 2013; STEINBERG et al., 2003; WARE et al., 2017).

Deste modo, é possível que os pacientes com AF tratados com HU apresentam um perfil menos inflamatório, somado ao aumento da HbF, que diminui o processo de falcização das hemácias, diminuindo a incidência de crises vaso-oclusivas. Este cenário pode então ser benéfico para a geração de novas células T no timo dos pacientes com AF tratados com HU, levando a um perfil comparável ao dos indivíduos saudáveis envolvidos neste estudo.

Enquanto o tratamento com HU pode reduzir o número de moléculas inflamatórias de forma mais eficiente, sustentado pela utilização prolongada, a terapia com TF parece não reduzir o número de moléculas inflamatórias no mesmo nível (PENKERT et al., 2017). Embora os pacientes tratados com TF em nosso estudo, tenham apresentado perfil similar de neogênese de células T em relação aos pacientes tratados com HU, constituem um grupo complexo com acometimento mais grave da doença, além de poderem apresentar contraindicações ao uso de HU e ocorrência de aloimunização. Todos os pacientes incluídos neste grupo estavam sob regime de transfusão crônica, realizando em média 2-3 transfusões mensais, sem uso de HU. Outra observação importante é que entre os pacientes, sete apresentaram-se aloimunizados.

Como a aloimunização é uma complicação clinicamente significativa nos pacientes em regime de transfusão crônica, nós analisamos a neogênese das células T comparando o grupo aloimunizado e não aloimunizado, porém, provavelmente devido ao número pequeno de pacientes, não encontramos diferenças significativas nos níveis de sjTREC e β-TREC.

Porém, o grupo de pacientes aloimunizados, tratados com TF, apresentaram menores níveis de sjTREC e β-TREC. Um perfil mais inflamatório já foi descrito em pacientes aloimunizados, demonstrando que o heme (liberado tanto da hemólise das hemácias falciformes quanto no processo de transfusão) tem implicação na polarização das células T em pacientes com DF (ZHONG et al., 2014).

Em conjunto, nossos dados sugerem que a aloimunização possa ter algum efeito sobre a produção de novas células T naive pelo timo em pacientes com AF tratados com TF, que deve ser melhor investigado aumentando o número de pacientes bem como através do estudo detalhado de populações de linfócitos T.

7.1.2 Diversidade do repertório de células T

Adicionalmente ao estudo da neogênese das células T, a função tímica também foi avaliada através do estudo da diversidade do repertório de células T pela amplificação do segmento gênico que contém a região CDR3 do receptor de TCR (PANNETIER et al., 1993). Durante a ontogenia das células T no timo, o rearranjo genético das regiões de diversidade, junção e variável (VDJ) gera a região hipervariável denominada CDR3. A variabilidade desta região aumenta ainda mais

através do processo de adição e remoção de nucleotídeos, expandindo o espectro de reconhecimento do TCR (PANNETIER; EVEN; KOURILSKY, 1995; VAN DEN BEEMD et al., 2000). Portanto, a análise do repertório da cadeia Vβ fornece uma visão global do repertório de células T do sangue periférico dos pacientes com AF sob os diferentes tratamentos.

O pool de células T *naïve* é mantido pela combinação da saída de novas células do timo e da proliferação das células T *naive* circulantes. Em algumas situações há um declínio progressivo na exportação de novas células T naive pelo timo, por exemplo a imunosenescência, podendo comprometer as respostas aos antígenos (STEINMANN; KLAUS; MÜLLER-HERMELINK, 1985; VENTEVOGEL; SEMPOWSKI, 2013). Em nosso trabalho, observamos uma correlação negativa entre a idade e o número de moléculas de sjTREC. Além disso, a perda da diversidade do TCR pode surgir por vários mecanismos, incluindo expansão clonal, desvios com aumento seletivo da população de células T de memória, mudanças na especificidades das células T *naive* (GORONZY; LEE; WEYAND, 2007; NAYLOR et al., 2005), bem como alterações do microambiente tímico que podem afetar as células residentes (CLISE-DWYER et al., 2007).

A avaliação do repertório de células T é de grande relevância e tem sido abordada no estudo de doenças autoimunes, linfoproliferativas, infecciosas (por HIV e CMV por rexemplo), nas quais antígenos específicos direcionam a expansão de clones específicos de células T, resultando em um repertório Vβ perturbardo e oligoclonal (FOZZA et al., 2015, 2017; GORSKI et al., 1994; HODES; SHARROW; SOLOMON, 1989; LUO et al., 2012; MURARO; DOUEK, 2006; OCHSENREITHER et al., 2010; OKAJIMA et al., 2009; PANNETIER; EVEN; KOURILSKY, 1995; WU et al., 2015; XIONG; TAN; SONG, 2014). A identificação de clones específicos bem como mudanças no padrão do repertório de células T também tem sido empregada no estudo de doenças hematológicas e imuno-mediadas (FOZZA; LONGINOTTI, 2013; PLASILOVA; RISITANO; MACIEJEWSKI, 2003).

Nosso estudo é o primeiro a avaliar a diversidade do repertório de células T em pacientes com AF sem tratamento e em diferentes tratamentos. Nós observamos que os pacientes com AF de maneira geral, apresentaram um repertório de linfócitos T menos diverso em comparação com indivíduos saudáveis. Considerando a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR avaliada pelo *complexity score* (CS) (WU et al., 2000), a média dos *complexity scores* que encontramos para os 14

indivíduos saudáveis foi de 131,29, que foi maior do que as médias dos indivíduos com AF entre todos os tratamentos. Vale ressaltar que o grupo controle do nosso estudo foi composto por indivíduos afrodescendentes e alguns com relação familiar com os pacientes falciformes, sendo que seis indivíduos eram traço falciforme.

Ainda que a avaliação do repertório de células T através do cálculo do CS forneça dados importantes em relação a diversidade do TCR, este constitui um apenas um análise quantitativa geral, onde faz-se a soma de todos os picos das 24 famílias Vβ. Portanto, nós realizamos uma análise mais detalhada do perfil de distribuição dos picos de CDR3 dentro de cada uma das 24 famílias Vβ, a fim de elucidar a composição e a qualidade da distribuição dos picos de CDR3 nos pacientes com AF.

A composição do grupo controle revelou um repertório misto com predomínio da distribuição dos picos de CDR3 policlonais com distribuição gaussiana e de famílias que apesar de apresentarem múltiplos picos, tinham uma distribuição que classificamos como “perturbada” (do inglês *skewed*), com menos de 5% da composição correspondendo a picos monoclonais. A validação do grupo controle foi especialmente importante para compararmos com pacientes falciformes, que apresentaram de forma geral um repertório composto predominantemente de famílias com padrão *skewed* e picos monoclonais. Estes resultados indicam que a AF induz mudanças qualitativas e quantitativas na composição do repertório de células T que podem levar à uma disfunção imunológica e consequente aumento da susceptibilidade a infecções nestes pacientes.

É relevante destacar que entre todos os pacientes (tratados ou sem tratamento), trinta e um pacientes apresentaram uma ou mais infecções bacterianas relatadas no histórico clínico, sendo que o tipo de infecção mais frequente foi pneumonia. Alguns pacientes apresentaram até quatro episódios de pneumonia acarretando em hospitalização, e outros apresentaram pneumonia concomitante com osteomielite e infecções do trato urinário. Portanto, mesmo com a introdução do tratamento com penicilina profilática e vacinações, estes pacientes ainda são mais susceptíveis ao acometimento por infecções, indicando que existe um comprometimento imunológico importante na AF.

Outra questão importante é o impacto das alterações fisiopatológicas que ocorrem nos pacientes com DF, como o processo inflamatório crônico, sobre o repertório de células T periférico. Enquanto a produção de células T *naïve* pelo timo

garante diversidade no repertório, a seleção e diferenciação de células T recém-emigrantes do timo continua nos tecidos periféricos (ALLEN et al., 2011; BOURSALIAN et al., 2004).

Perturbações e alterações graves no repertório de células T periférico, tais como expansão oligoclonal de linfócitos T CD8+, já foram descritas em pacientes com polimiosite e dermatomiosite, doenças caracterizadas por infiltrados inflamatórios musculares (BENVENISTE et al., 2001). Similarmente, Chapman et al., (2016) avaliou as populações de células T no sangue periférico e em biópsias de pacientes com doença de Crohn, e encontraram uma diversidade do repertório de células T muito menor nos tecidos da mucosa em relação as células T do sangue periférico, indicando a expansão de células T específicas no tecido intestinal em processo inflamatório (CHAPMAN et al., 2016). Diminuição na diversidade do repertório de células T também foi observada em pacientes durante o choque séptico, sendo restaurada ao longo do tempo (VENET et al., 2013).

Nós encontramos diferenças entre os grupos de pacientes quando comparamos a composição e distribuição dos picos de CDR3 da cadeia Vβ do TCR. Enquanto os pacientes sem tratamento e tratados com TF apresentaram um repertório de células T perturbado, composto predominantemente por famílias com distribuição não gaussiana dos picos, os pacientes tratados com HU apresentaram maior porcentagem de famílias Vβ com perfil policlonal e menor porcentagem de famílias com perfil *skewed.* Estes achados indicam que a fisiopatologia complexa e o estado inflamatório presente nos pacientes com DF interferem no processo de proliferação e diferenciação periférica das células T. O tratamento com HU pode conferir aos pacientes um perfil de repertório de células T mais próximo de indivíduos saudáveis.

Um estudo recente demonstrou que o tratamento com Azacitidina foi capaz de melhorar o repertório de células T em pacientes com síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda, restaurando a diversidade dos picos de CDR3 especialmente no subconjunto de linfócitos T CD4+ (FOZZA et al., 2015). Interessantemente, a Azacitidina também é um medicamento indutor da HbF (FIGUEIREDO, 2007), capaz de influenciar na polarização das células T, especialmente em relação as células Tregs (BONTKES et al., 2012; COSTANTINI et al., 2013). Desta forma, assim como a Azacitidina apresenta efeitos benéficos no sistema imune destes pacientes, a HU também pode atuar positivamente sobre a

desregulação imunológica nos pacientes com AF, especialmente melhorando a composição e diversidade do repertório de células T em relação ao tratamento com TF e pacientes não tratados.

Finalmente, o repertório dos linfócitos T nos pacientes aloimunizados também foi menos diverso e com maior porcentagem de famílias monoclonais, em relação aos pacientes não aloimunizados, demonstrando que além de impactar a neogênese das células T, a aloimunização também pode ter efeito sobre o repertório de células T periférico dos pacientes em regime de transfusão crônica, especialmente devido a desregulação imunológica envolvida no processo de aloimunização, já descrita anteriormente (YAZDANBAKHSH; SHAZ; HILLYER, 2017).

Através do método da avaliação do repertório dos linfócitos T, chamado de *TCRBV CDR3 spectratyping*, também é possível estimar a frequência de cada família Vβ nos repertórios analisados. Este é o primeiro trabalho que avaliou as frequências de famílias Vβ do TCR em pacientes com doença falciforme. De forma geral, nós identificamos tanto o aumento da frequência de famílias específicas, como a família Vβ3 e das famílias Vβ10 e Vβ18 no grupo dos pacientes tratados com HU, quanto a diminuição da frequência da família Vβ16 em relação aos indivíduos controles saudáveis. Além disso, interessantemente a família Vβ2 foi mais frequente nos indivíduos aloimunizados.

Com relação a expressão de cadeias Vβ específicas, alguns trabalhos encontraram alta frequência da cadeia Vβ3 como em células de infiltrado do músculo cardíaco em pacientes com cardiomiopatia (LUPPI et al., 1998), em células T periféricas de lavado bronco-alveolar de pacientes com asma (WAHLSTRÖM et al., 2001) e em expansão clonal em pacientes com esclerose múltipla (MURARO et al., 2002). A expressão da família Vβ3 também foi encontrada em expansão oligoclonal em populações de células T CD8+ em pacientes com artrite reumatoide (HINGORANI et al., 1996). A diminuição da frequência da família Vβ16 também foi observada em linfócitos T periféricos de pacientes asmáticos em relação a indivíduos sadio (WAHLSTRÖM et al., 2001).

Nosso estudo demonstra que pacientes com AF possuem particularidades na expressão de determinadas famílias Vβ tanto em relação a indivíduos sadios quanto entre os pacientes sob diferentes tratamentos ou pacientes não tratados, indicando que as diferentes modalidades terapêuticas induzem mudanças qualitativas e

quantitativas no repertório de células T, as quais podem ser avalidadas mais detalhadamente por sequenciamento de nova geração.

7.1.3 Neogênese de células B

Na avaliação da neogênese das células B, observamos um aumento de células B *naive* e da taxa de proliferação homeostática nos pacientes com AF. Em relação aos tratamentos, pacientes em TF apresentaram níveis mais elevados de sjKREC.

Os altos níveis de sjKREC e Cj encontrados nos pacientes com AF corroboram os achados de Nickel e colaboradores (2015) que encontraram aumento significativo de linfócitos B totais e linfócitos B *naïve* em pacientes com DF em relação a indivíduos saudáveis. Em contrapartida, a avaliação da influência dos tratamentos no perfil de linfócitos B contrastou com nossos resultados, visto que eles encontraram aumento de células B totais nos grupos sem tratamento e tratado com TF em relação ao grupo tratado com HU, e, em nosso trabalho, a média de moléculas de Cj (que reflete o total de linfócitos B) foi bastante similar entre os grupos de pacientes convencionalmente tratados com HU ou TF e sem tratamento. Da mesma forma, um maior número de linfócitos B *naïve* foi encontrado nos pacientes sem tratamento (Nickel et al., 2015), enquanto em nosso trabalho, foi encontrado nos pacientes em tratamento com TF.

Corroborando os nossos achados, ao avaliar o compartimento de células B em pacientes com DF tratados com transfusões, Bao et al. (2013) observaram que a frequência de linfócitos B CD19+ foi maior nos pacientes transfundidos em relação a pacientes com DF sem tratamento e a um grupo controle saudável. Ainda neste trabalho, eles verificaram que não houve diferença no compartimento das células B entre os pacientes aloimunizados e não aloimunizados, em contraste, nós encontramos maior expressão sjKRECs e Cj no grupo dos pacientes não aloimunizados (Bao et al., 2013).

Na AF, o baço é o órgão primariamente afetado e logo nos primeiros anos de vida, os pacientes apresentam diminuição do órgão e perda da função esplênica devido a sua atrofia e fibrose. Diversos trabalhos mostraram que o comprometimento da função esplênica e a esplenectomia cirúrgica tanto em humanos quanto em modelos animais da DF, leva a diminuição de células B de memória IgM+,

especialmente a subpopulação $CD19^{+}CD27^{+}IgM^{high}IgD^{low}$ produtoras de anticorpos contra antígenos polissacarídeos, com a contagem de linfócitos B totais normais ou aumentada (CAMERON et al., 2011; GIORDANO et al., 2016; MILIĆEVIĆ et al., 2001; SZCZEPANEK et al., 2012; WALUSIMBI et al., 2012; WILLIAM; CORAZZA, 2007). Em crianças com β-talassemia, a esplenectomia resultou num aumento significativo do número de linfócitos B periféricos (DWYER et al., 1987; PATTANAPANYASAT et al., 2000).

No trabalho de Nickel et al., (2015), uma análise de regressão multivariada foi realizada a fim de investigar a relação entre a função esplênica com o número de diversas populações celulares. Os resultados revelaram que o estado de esplenectomia cirúrgica foi significantemente associado ao aumento da população total de células B em relação aos pacientes não esplenectomizados. Mesmo quando os pacientes esplenectomizados foram retirados da análise, os pacientes apresentaram aumento significativo da contagem de células B em relação ao grupo controle saudável. Os resultados da análise multivariada realizada em nosso estudo, estão em concordância com o trabalho de Nickel et al., (2015), pois demonstrou que as disfunções esplênicas encontradas nos pacientes com AF influenciaram diretamente os níveis de sjKREC, ou seja, levaram ao aumento de células B *naive* em relação ao grupo de indivíduos sadios. Adicionalmente, a análise multivariada também demonstrou que a presença infecções bacterianas no histórico clínico levou ao aumento no número de moléculas de sjKREC em relação aos pacientes que não apresentaram infecções bacterianas.

O tratamento com HU, apesar dos inúmeros benefícios clínicos já relatados, não é capaz de prevenir os danos na função esplênica relacionados a doença. Um estudo clínico randomizado realizado em crianças com AF ou Sβ-talassemia que utilizaram HU ou placebo por dois anos, demonstrou que a HU não diminuiu a proporção de crianças com diminuição da função esplênica (WANG et al., 2011). Outro estudo que avaliou a função esplênica em crianças com DF tratadas com HU com a dose máxima tolerada por três anos, demonstrou que o medicamento preservou a função esplênica apenas em algumas crianças, sendo que a maioria continuou com evidências de baço não funcionante (NOTTAGE et al., 2014).

Com base nos resultados do nosso estudo, é possível que a disfunção esplênica leve ao aumento da geração de células B *naive* pela medula óssea,

consistindo em um mecanismo compensatório, devido a diminuição das células B de memória na circulação.

Em resumo, observamos que existe uma desregulação na homeostase das células B nos pacientes com AF. Entretanto, estudos complementares como a análise da frequência de subpopulações de células B (naive, memória e Bregs) são necessários para compreender a influênica dos diferentes tratamentos e demonstrar se existe uma diminuição de células B $CD19^{+}27^{+}IgM^{high}IgD^{low}$ de memória que possa influenciar na susceptibilidade a infecções bacterianas nestes pacientes.

7.2 Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com TCTH alogênico

7.2.1 Neogênese de células T após o TCTH alogênico

Atualmente, o TCTH alogênico constitui a única opção curativa aos pacientes com DF e várias outras doenças hematológicas, sendo a forma de terapia celular mais estabelecida e reconhecida mundialmente. O timo desempenha um papel crucial na qualidade da reconstituição imunológica após o TCTH alogênico, portanto a avaliação da função tímica é de fundamental importância (CHAUDHRY et al., 2017; TOUBERT et al., 2012).

Em nosso estudo, a produção tímica de novas células T *naïve* avaliada pela quantificação absoluta dos níveis de sjTREC e β-TREC, diminuiu consideravelmente nos primeiros meses após o TCTH alogênico, sendo reestabelecida um ano pós-transplante. Nos primeiros meses após o TCTH alogênico, os pacientes apresentam uma intensa imunoablação decorrente do regime de condicionamento, com expansão periférica de células T e diminuição da função tímica (CHAUDHRY et al., 2017; TOUBERT et al., 2012). Entre três meses e um ano pós-transplante, houve um aumento progressivo do número de moléculas de sjTREC e entre seis meses a um ano pós-transplante ocorreu um aumento do número de moléculas de β-TREC, levando a normalização do *output* tímico, o qual persistiu por longo prazo após o transplante. É interessante observar que os níveis de sjTREC e β-TREC nos pacientes antes do transplante estavam dentro da faixa dos valores de indivíduos sadios. Além disso, o *output* tímico foi restabelecido aos níveis basais anteriores aos 12 meses pós-transplante.

Alguns fatores podem contribuir com desfecho favorável da recuperação da timopoiese após o transplante, como por exemplo a idade, pois já foi demonstrado que pacientes com <25 anos recuperam completamente a função tímica em até um ano (CLAVE et al., 2009), e a média de idade da coorte dos pacientes do nosso estudo ao realizarem o TCTH alogênico foi de 18,4 anos. Adicionalmente, com exceção de um paciente, todos receberam medula óssea HLA-idêntica de irmãos como fonte de células progenitoras.

A capacidade funcional de regeneração do timo foi demonstrada em crianças e adolescentes submetidos a timectomia neonatal, pela restauração da produção tímica de células T CD4+ funcionais (VAN DEN BROEK et al., 2016). Embora a involução tímica seja correlacionada ao aumento da idade, os mecanismos homeostáticos que garantem a diversidade do compartimento das células T indicam a ocorrência de um processo contínuo de atividade tímica e renovação de células T periféricas ao longo da vida (DOUEK et al., 1998; HAYNES et al., 2000; JAMIESON et al., 1999; POULIN et al., 1999). Ademais, mesmo com o declínio progressivo da função tímica com a idade, nossos dados corroboram estudos que demonstram que sua atividade não é totalmente eliminada (CLAVE et al., 2009, 2013; DOUEK et al., 2000; TOUBERT et al., 2012).

A detecção de células T recém-emigrantes do timo baseada na quantificação de moléculas de sjTRECs é amplamente utilizada para avaliar imunodeficiências primárias de células T e outras condições patológicas nas quais o processo de geração de células T seja interrompido, como no caso de infecção por HIV, envelhecimento e TCTH alogênico (DOUEK et al., 1998; HAYNES et al., 2000; SOMECH, 2011; TOUBERT et al., 2012). Ao avaliarem amostras de tecido tímico e sangue periférico em adultos que realizaram cirurgias cardíacas, Arellano e colaboradores (2006) demonstraram que os níveis de sjTREC no timo correlacionaram-se diretamente e significativamente com os níveis de sjTREC no sangue periférico demonstrando que de fato, os níveis periféricos de moléculas de sjTREC refletem bem a função tímica (ARELLANO et al., 2006).

A avaliação do *output* tímico tornou-se mais completa com introdução da quantificação do β-TREC. A avaliação conjunta dos níveis de sjTREC e β-TREC, fornece resultados mais informativos, diminuindo os efeitos da expansão periférica das células T, visto que os níveis do *output* tímico são primariamente definidos pela proliferação intratímica das células T. Portanto, ao avaliarmos todos os seguimentos

Dβ-Jβ do rearranjo da cadeia β, a razão entre sjTREC/ β-TREC fornece uma análise direta da proliferação intratímica das células T (DION et al., 2004). Deste então, a razão entre sjTREC/β-TREC tem sido especialmente utilizada para quantificar a função tímica e a proliferação de células T CD4+ durante a infecção por HIV e consequentemente avaliar o tratamento com terapia antirretroviral (DELOBEL et al., 2006; DION et al., 2007; GAUTIER et al., 2007). Porém, existem poucos estudos que avaliaram os níveis de β-TREC e a razão sjTREC/β-TREC no contexto do TCTH alogênico.

Nossos resultados corroboram um estudo conduzido por Clave et al. (2009) que avaliou a neogênese de células T após o transplante alogênico de 96 pacientes que receberam células progenitoras hematopoéticas de irmãos HLA-idênticos, sendo que 56 receberam medula óssea total e 37 receberam células tronco mobilizadas do sangue periférico. Neste estudo eles observaram que após uma queda dos níveis de sjTRECs e β-TRECs nos primeiros seis meses pós transplante, houve recuperação da neogênese das células T em um ano (CLAVE et al., 2009).

Neste mesmo contexto, Ringhofer et al., (2013) avaliaram a neogênese das células T em 66 pacientes que receberam transplante alogênico para várias doenças hematológicas (38% dos pacientes receberam medula óssea com depleção de células T e dois terços dos pacientes receberam regime de condicionamento mieloablativo). Em contraste, os autores observaram forma geral que a recuperação pós-transplante foi lenta, sendo necessários mais de dois anos para que os níveis de sjTRECs e β-TRECs atingissem os valores pré transplante (RINGHOFFER et al., 2013). Ainda neste trabalho, eles observaram que idade média de 44 anos da coorte dos pacientes teve impacto negativo sobre a recuperação da neogênese das células T e sobre a taxa de proliferação intratímica (sjTREC/β-TREC).

Outro aspecto importante observado em nosso estudo foi o comprometimento da neogênese das células T pelo desenvolvimento de DECH aguda em nove pacientes após o TCTH alogênico.

No período inicial pós-transplante, a expansão periférica das células T ocorre predominantemente por células T CD8+ de memória, que em comparação com as células T *naïve*, que são mais responsivas as citocinas como IL-2, IL-15 e IL-7, possuem contato prévio com agentes patogênicos (como vírus reativados) e são menos dependentes do reconhecimento de antígenos via MHC para sobrevivência (TOUBERT et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado em um modelo experimental, que a DECH levou a depleção de células tímicas resultando na diminuição da produção de IL-22 no microambiente tímico, inibindo assim a proteção das células epiteliais tímicas mediada pela IL-22, prejudicando dessa forma a recuperação da timopoiese (DUDAKOV et al., 2017).

É importante destacar que mesmo em transplantes alogênicos entre irmãos HLA-idênticos, a DECHa continua a ser uma complicação importante pós transplante. A alta ocorrência de DECHa deve-se em grande parte, devido a diferenças nos antígenos de histocompatibilidade menores e a variações polimórficas nos genes que codificam proteínas HLA não clássicas (como HLA-E, HLA-G e MICA/B) entre doador e receptor (revisado de BOGUNIA-KUBIK; ŁACINA, 2017).

Em nosso estudo, observamos que a DECHa comprometeu a geração de células T naive pelo tímo no período inicial de seis meses, com diminuição significativa dos níveis de sjTRECs e β-TRECs em relação ao grupo de pacientes que não desenvolveram DECH. Nossos achados corroboram o estudo de Clave et al. (2009) que encontraram níveis de sjTREC e β-TREC significantemente menores também no período de seis meses pós-transplante alogênico, além da reconstituição de células naive $CD4^{+}CD45RA^{+}CD62L$, que foi significantemente mais lenta nos pacientes com DECHa. Quando a análise foi realizada apenas nos pacientes com DECHa que receberam apenas regime de condicionamento mieloablativo, eles ainda encontraram níveis significativamente ainda mais baixos de sjTRECs no período de seis meses.

Conforme já discutimos anteriormente, neste mesmo estudo de Clave et al. (2009), a neogênese de células T recuperou-se em um ano pós-transplante, e o mesmo foi observado para o grupo que teve DECHa, embora os pacientes com mais de 25 anos apresentaram uma recuperação mínima da função tímica, revelada pelos baixos níveis de sjTREC na presença ou ausência de DECHa, demonstrando que a recuperação dos níveis de sjTREC é muito mais eficiente em indivíduos jovens. Em relação aos níveis de β-TREC, nossos resultados também corroboram os resultados de Clave et al. (2009), com recuperação dos níveis de β-TREC aos 12 meses pós-transplante.

No estudo de Ringhofer et al., (2013), eles observaram que a DECHa e o regime de condicionamento de intensidade reduzida teve impacto significativo na

recuperação dos níveis de β-TREC. Em um outro estudo realizado por Weinberg e colaboradores (2001), os níveis de sjTREC foram menores nos pacientes com histórico de DECH aguda e crônica, além de baixa contagem de células T CD4+, entretanto neste estudo, a DECH crônica teve maior impacto na neogênese das células T (WEINBERG et al., 2001).

O decréscimo de sjTRECs e β-TRECs em seis meses, refletem respectivamente a redução do número de linfócitos que já tiveram sua cadeia α e β rearranjada, sugerindo que o atraso na recuperação da função tímica na presença DECHa aos seis meses pós-transplante, pode ocorrer principalmente nos estágios de diferenciação dos timócitos mais imaturos, antes da recombinação do TCR. Análises histológicas e estudos funcionais, já demonstraram que as células epiteliais tímicas e os timócitos são alvos da DECHa em ratos (LAPP et al., 1985), e em humanos (BESCHORNER et al., 1978; MÜLLER-HERMELINK et al., 1987), resultando em importantes modificações na estrutura tímica. De fato, as células epiteliais tímicas são biologicamente similares a outras células epiteliais alvos na DECH, tais como as células epiteliais da pele (PATEL et al., 1995).

Finalmente, nós observamos que em nosso estudo, os pacientes que apresentavam reativação por CMV pós transplante, apresentaram uma piora na neogênese de células T, observada pelos baixos níveis de sjTREC e β-TREC em relação aos pacientes que não apresentavam reativação por CMV, especialmente nos primeiros meses após TCTH alogênico. Interessantemente, foi demonstrado em um modelo animal de imunodeficiência combinada grave, que as células epiteliais tímicas constituem alvos importantes do vírus CMV, o qual promoveu mudanças na arquitetura e no microambiente tímico (MOCARSKI et al., 1993).

No cenário do TCTH, quando a reativação por CMV ocorre nos estágios iniciais, leva a expansão de células T CD8+ de memória (LUGTHART et al., 2014; MEYER, 2015), diminuição da contagem de células T CD4+ e CD8+ *naive* e uma diminuição progressiva da população de células T $CD4^{+}CD31^{+}$ recém-imigrantes do timo (SUESSMUTH et al., 2015). O perfil imunológico nestes pacientes pode permanecer alterado mesmo anos após o transplante, e é independente do estado sorológico e da replicação viral (ITZYKSON et al., 2015).

Oukinoura e colaboradores (2011) observaram que a ocorrência precoce de reativações/infecções pelos vírus de CMV, Epstein-Barr e adenovírus pós-transplante, foi associada ao processo prejudicado de recuperação de células T

naïve, com baixos níveis de sjTREC. Nesse trabalho, a contagem absoluta de células T *naïve*, atingiu valores dentro da faixa de indivíduos saudáveis na maioria dos pacientes aos 12 meses pós-transplante (OLKINUORA et al., 2011), corroborando nossos resultados, pois observamos a recuperação dos níveis de sjTREC em um ano dentro da faixa dos valores para o grupo de indivíduos sadios.

Jímenez et al., (2006) relataram numa coorte de 155 pacientes que receberam transplante não mieloablativo, a ocorrência de infecção por CMV foi associada a diminuição da contagem de $CD3^+$ e $CD8^+$ durante o primeiro ano pós-transplante. Além disso, baixos níveis de sjTREC ainda foram encontrados em períodos mais tardios em pacientes com histórico de reativação por CMV (JIMÉNEZ et al., 2006).

Portanto, nosso trabalho demonstrou que o desenvolvimento de DECHa e reativação por CMV, teve um impacto negativo na neogênese das células T nos pacientes com DF submetidos ao TCTH alogênico, ocorrendo especialmente nos primeiros meses. Nossos resultados indicam que a timopoiese pode ser comprometida logo nos estágios iniciais de maturação dos timócitos pelo quadro inflamatório crônico, microinfartos, presença de DECHa ou reativação viral, com base nos baixos níveis de β-TREC encontrados. Entretanto, a geração de novas células T naive aumentou a partir de um ano, mantendo-se constante por anos após o TCTH.

7.2.2 Diversidade do repertório de células T após o TCTH alogênico

A análise da diversidade do repertório de células T no contexto do transplante tem sido amplamente utilizada, uma vez que a diversidade do repertório de células T periféricas é um componente chave da resposta imune adaptativa e respostas a infecções. Por outro lado, um repertório comprometido, caracterizado como perturbado e/ou monoclonal, implica em limitações das respostas imunológicas (SUESSMUTH et al., 2015).

Como já foi discutido anteriormente, a diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR foi avaliada pelo *complexity score* (CS) (WU et al., 2000), mensurado através da soma dos picos das 24 famílias Vβ. Em nosso estudo, observamos que antes de realizarem o transplante, o CS do repertório dos pacientes foi mais restrito, com predomínio de famílias com padrão *skewed*. Entretanto, após a queda

acentuada da diversidade nos primeiros seis meses pós-transplante com predomínio de famílias monoclonais, houve aumento do CS e da porcentagem de famílias com padrão policlonal e gaussiano a partir de 12 meses pós-transplante. Em relação ao tratamento prévio dos pacientes antes de serem submetidos ao transplante, a maioria estava em regime de transfusão crônica ou associada a terapia medicamentosa com HU. Alguns pacientes estavam em tratamento apenas com HU e somente um paciente estava sem tratamento (sem HU e TF).

É importante ressaltar que ao avaliarmos a diversidade e composição do repertório da cadeia Vβ do TCR nos pacientes com DF no período pré-transplante, é possível fazer um paralelo com o perfil do repertório de células T dos pacientes convencionalmente tratados. Conforme discutido no item 8.1.2, observamos que os pacientes com AF de maneira geral, apresentaram um repertório de linfócitos T menos diverso em relação aos indivíduos saudáveis. Entretanto, a diversidade geral do repertório baseada no CS foi maior nos pacientes com AF tratados convencionalmente em relação ao CS dos pacientes candidatos ao TCTH alogênico (dados do período pré-transplante).

Em um estudo que avaliou a reconstituição das células T em pacientes pediátricos após o TCTH alogênico, foi encontrada uma relação positiva entre os níveis de sjTRECs antes do transplante alogênico e rápida reconstituição de células T. Pacientes com maiores níveis de sjTREC antes do transplante apresentaram um repertório mais diverso e policlonal da cadeia Vβ do TCR após o transplante, sugerindo que o status da função tímica antes do transplante pode ajudar a prever a cinética da reconstituição após o transplante (CHEN, 2005).

Corroborando nossos resultados, Wu et al., (2000) encontraram restrição do repertório da cadeia Vβ do TCR (diminuição do CS) no período pré-transplante em uma coorte de 11 pacientes submetidos ao TCTH alogênico em comparação com CS de indivíduos saudáveis (WU et al., 2000). Neste estudo, todos os pacientes apresentaram predomínio de famílias monoclonais e ausência de famílias Vβ nos períodos iniciais pós-transplante, contudo, a diversidade da cadeia Vβ avaliada pelo CS aumentou aos 12 meses pós-transplante nesta coorte de pacientes, mantendo-se após este período.

Em um estudo realizado em pacientes chineses com leucemia mielóide e leucemia linfoide aguda submetidos ao TCTH alogênico, foi observada uma diminuição da frequência das famílias Vβ2, 3, 7, 9, 12, 17, 22 e 23 entre quatro a oito

meses após o transplante (TALVENSAARI et al., 2002). Em nosso estudo, a família Vβ2 também foi menos expressa em todos os seguimentos até um ano pós-transplante e seu perfil foi predominantemente policlonal e gaussiano.

Diversas famílias Vβ apresentaram frequências diferentes antes e após o transplante, aumentadas ou diminuídas em relação ao grupo controle ou aos períodos de seguimento. Além disso, a composição do repertório de células T também alterou-se após o transplante, com mudanças qualitativas nos seguimentos de CDR3, com disposição mais policlonal e menos oligoclonal dos picos de CDR3 ao longo do tempo após o transplante. Em nosso estudo, as famílias Vβ8, Vβ13, Vβ14, Vβ16, Vβ20 e Vβ22 apresentaram expansões relevantes, sendo que a família Vβ22 foi a mais expressa nos TCRs dos linfócitos nos pacientes com DF antes do transplante em todos os períodos pós-transplante. Estes resultados indicam que o TCTH alogênico levou a mudanças profundas, qualitativas e quantitativas na composição do repertório de células T dos pacientes com DF após o transplante, que pode estar associado ao melhor prognóstico bem como ao desenvolvimento de complicações clínicas importantes como a DECH e reativação do vírus CMV.

Embora o método *TCRBV CDR3 spetratyping* permita a detecção de mudanças na composição e no perfil do repertório de células T, uma limitação desta metodologia no contexto do TCTH alogênico é que ele não permite discernir a origem das células T avaliadas (se do receptor ou do doador), sendo necessário para tal a avaliação do quimerismo após o transplante. O CS da cadeia Vβ do TCR já foi associado com o *status* quimérico após o transplante (WU et al., 2000), embora na DF, o quimerismo misto não levou a complicações clínicas após o transplante, sugerindo que um quimerismo total das células do doador pode não ser necessário para o sucesso do transplante (AL JEFRI, 2011; BERNAUDIN et al., 2007; FERRANDO-MARTÍNEZ et al., 2010; GAZIEV; LUCARELLI, 2011; HSIEH; FITZHUGH; TISDALE, 2011; KHOURY; ABBOUD, 2011; LUCARELLI et al., 2012; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Em relação ao desenvolvimento de DECHa, concomitantemente à queda nos níveis de sjTREC e β-TREC nos primeiros seis meses pós-transplante, observada nos pacientes com DECHa, houve também uma dimunição da diversidade no repertório de células T neste período. De fato, o impacto do desenvolvimento de DECHa na diversidade do repertório após o transplante, já foi associado a uma

transição lenta do perfil perturbado ou *skewed* para um perfil policlonal e gaussiano (CLAVE et al., 2009).

Em um estudo longitudinal que avaliou o repertório da cadeia Vβ do TCR após o transplante alogênico, foi demonstrado que a maioria das famílias Vβ nos pacientes que desenvolveram DECHa apresentaram apenas de 1 a 4 picos, sendo que algumas famílias não apresentaram perfil policlonal mesmo após dois anos (LIU et al., 2006). Ainda neste estudo, a família Vβ24 não foi expressa em todos os períodos até um ano pós-transplante, com baixa expressão apenas no período de dois anos. Vale ressaltar que, em nosso estudo, a família Vβ24 apresentou alta expressão nos períodos iniciais pós-transplante nos linfócitos dos pacientes que tiveram DECHa.

Através do sequenciamento da região CDR3 da cadeia Vβ do TCR, Meyer et al., identificaram clones dominantes de células T no trato gastrointestinal de pacientes que desenvolveram DECHa (MEYER et al., 2013). Portanto, pacientes que desenvolvem DECH tem um repertório mais restrito devido a expansão de clones de células T aloreativas.

Os pacientes que tiveram reativação do vírus CMV em nosso estudo também apresentaram diferenças na composição das famílias Vβ após o transplante em relação aos pacientes que não tiveram reativação viral. A reativação por CMV nos períodos iniciais pós-transplante leva a expansão oligiclonais de células T CD8+ de memória (LUGTHART et al., 2014; MEYER, 2015), e estas alterações imunológicas podem persistir anos após o transplante (ITZYKSON et al., 2015).

Através de analises de sequenciamento da cadeia Vβ do TCR, foi demonstrado que uma maior diversidade das células T CD4+ do doador foi associada a menor reativação por CMV e vírus Epstein-Barr após o transplante, demonstrando a importância do compartimento de células T do doador no controle de vírus latente após o TCTH alogênico (RITTER et al., 2015). Em um outro estudo clínico prospectivo que avaliou a reativação de CMV em dezessete pacientes após o TCTH alogênico, o sequenciamento da cadeia Vβ do TCR revelou uma contração da diversidade da cadeia Vβ de células T $CD8^+$ devido a expansões clonais especificas nos pacientes que tiveram reativação por CMV, demonstrando que além de direcionar a expansão de clones específicos a reativação por CMV teve impacto na composição geral do repertório Vβ do TCR (SUESSMUTH et al., 2015).

Yang e colaboradores (2018) demonstraram que pacientes que tinham baixos níveis de sjTREC no período pré-transplante apresentaram alto risco de replicação viral pós-TCTH alogênico. Além disso, a baixa contagem de células $CD4^{+}CD31^{+}$ foi correlacionada com maior viremia por CMV após o transplante (YANG et al., 2018) .

Em conjunto, nosso estudo demonstrou que apesar da baixa diversidade do repertório da cadeia Vβ do TCR nos pacientes com DF no período pré-transplante (basal), a reativação tímica foi eficiente sendo capaz de gerar um repertório de células T mais diverso a partir de 12 meses pós-transplante. Entretanto, a ocorrência de DECHa e reativação por CMV tiveram impacto negativo na geração da diversidade do repertório de células T após o transplante, levando a expansão e/ou diminuição de famílias Vβ específicas.

7.2.3 Neogênese de células B após o TCTH alogênico

O aumento expressivo de células B *naïve* demonstrado pelos elevados níveis de moléculas de sjKREC nos pacientes com AF convencionalmente tratados, também foi encontrado nos pacientes com DF no período pré-transplante. Surpreendentemente, a produção *de novo* de novas células B *naive* pela medula óssea foi reestabelecida em seis meses pós-transplante, concomitante com diminuição da razão Cj/sjKREC.

A reconstituição das células B constitui um processo dinâmico, iniciado pelo aumento relativo de células B *naïve*, e recuperação mais tardia das células B de memória. A fonte de células progenitoras hematopoéticas e sua composição, bem como desenvolvimento de DECH, podem impactar a reconstituição imunológica. Ademais, a linfopoiese das células B é altamente dependente do microambiente da MO (ABRAHAMSEN et al., 2005; STOREK et al., 2001).

Nos últimos anos, estudos tem demonstrado que as células B além da importância na apresentação de antígenos e produção de citocinas, podem desempenhar funções regulatórias através das células B reguladoras (Bregs) (LEBIEN; TEDDER, 2008; MAURI; BOSMA, 2012). As Bregs exercem efeitos imunomoduladores através da produção da citocina anti-inflamatória IL-10, modulando negativamente a resposta imune celular. A ausência ou disfunção das Bregs podem contribuir para o agravamento de quadros inflamatórios e autoimunes (YANABA et al., 2009; YOSHIZAKI et al., 2012).

Nosso estudo demonstrou um aumento importante de células B *naïve*, demonstrado pelos níveis elevados de sjKREC, persistindo por longos períodos após o TCTH alogênico nos pacientes com DF. Estes achados indicam que a MO está sendo direcionada para uma maior atividade, resultando em maior geração de células B *naïve*. Uma de nossas hipóteses é que o comprometimento da função esplênica esteja relacionado ao aumento da produção de células B *naive* e Bregs pela medula óssea.

Recentemente, o TCTH alogênico foi relacionado ao aumento e recuperação da função esplênica em um estudo realizado em uma grande coorte de pacientes com DF (NICKEL et al., 2016). Este estudo demonstrou que o transplante pode prevenir danos futuros no baço e melhorar a função esplênica, embora esta melhora foi encontrada apenas em crianças, sendo que o aumento da idade no momento do transplante e o desenvolvimento de DECH crônica foi associado a piora da função esplênica. De fato, Glauzy et al., (2014) demonstrou que a DECH tem impacto na geração e replicação das células B, sendo que a DECHa levou a uma reconstituição tardia de células B $CD27^+$ no período de seis meses e um ano após o TCTH alogênico (GLAUZY et al., 2014). Em nosso estudo, a idade média dos pacientes no transplante foi de 18 anos e não observamos impacto da DECHa nos níveis de Cj e sjKREC, portanto é possível que ainda exista comprometimento esplênico nos pacientes após o transplante.

Diante desse contexto, o comprometimento da função esplênica pode justificar a elevada função medular e geração de novas células B *naive* nos pacientes após transplante, que também pode ser reflexa a baixa contagem de células B de memória. Apesar de observarmos um aumento da exportação de células B *naïve*, observada pelos altos níveis de sjKREC, seria importante compreender se essas células B podem sofrer maturação normal e serem mais funcionais após o transplante.

Alguns resultados adicionais indicam que o TCTH alogênico na DF pode levar a normalização e/ou melhora da homeostase das células B nos pacientes com DF. Nós observamos que houve aumento dos níveis de imunoglobulinas da classe IgM e principalmente da classe IgG em dois anos pós-transplante em relação ao período pré-transplante (dados não mostrados). Além disso, realizamos um ensaio funcional piloto de produção de IL-10 em células B ativadas, no qual detectamos um aumento de células B de memória e aumento da produção de IL-10 por células B de um

paciente com DF um ano pós-transplante, em níveis comparáveis a um indivíduo sadio (dados não mostrados). Portanto, nossos resultados mostraram que mesmo com altos níveis de sjKREC após o transplante, as células B produzidas *de novo* são mais funcionais, com aumento da produção de anticorpos IgM e IgG. Interessantemente, entre os vinte e oito pacientes transplantados, apenas três apresentaram infecções pós-transplante, sendo duas pneumonias, e uma infecção bacteriana relacionada ao cateter.

Em relação ao microambiente da MO nos pacientes com DF, defeitos funcionais nas células progenitoras hematopoéticas foram observados nos períodos iniciais após o transplante em pacientes com β-talassemia, indicados pela diminuição e alteração do potencial clonogênico de células progenitoras da MO. Estas anormalidades podem representar um defeito intrínseco nas células progenitoras ou extrínsecos decorrentes do processo inflamatório no microambiente medular (ISGRÒ et al., 2010).

Um estudo recente avaliou as caraterísticas histológicas de biópsias de MO de vinte e seis pacientes com AF antes e após TCTH alogênico (MAURIELLO et al., 2017). Os autores observaram que as MO dos pacientes com AF apresentaram celularidade normal ou ligeiramente aumentada, sendo que a hiperplasia eritróide foi uma característica comum em todas as biópsias analisadas. A biópsia dos pacientes com AF demonstrou vários agregados de eritrócitos falciformes nos vasos sanguíneos e no interstício. A análise das biópsias após o transplante revelou resultados interessantes, demonstrando que houve normalização da hematopoese medular, especialmente quando o doador não era traço falciforme.

Em conjunto, nossos resultados corroboram indiretamente os estudos citados, demonstrando que o TCTH alogênico pode levar a normalização e/ou melhora da homeostase das células B em pacientes com DF.

7.3 Comparação da neogênese de células T e B e do repertório de células T entre as diferentes modalidades terapêuticas

Por fim, nós observamos que entre os diferentes tratamentos avaliados, o TCTH alogênico, tipo mais consolidado de terapia celular existente, foi o que apresentou os melhores resultados sobre a neogênese de células T e B a longo prazo. Houve aumento significativo dos níveis de sjTRECs sjKRECs um ano pós-

transplante, em relação aos tratamentos convencionais com HU e TF. Embora a diversidade geral do repertório de células T periféricas tenha sido maior nos pacientes convencionalmente tratados (embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa), é importante destacar que o aumento do número de picos CDR3 não refletiu um repertório policlonal e gaussiano, pois conforme já discutido anteriormente, os pacientes convencionalmente tratados de modo geral, apresentaram um repertório desviado, composto predominantemente de famílias com perfil *skewed*. Já o TCTH alogênico, levou ao aumento de famílias com perfil policlonal e gaussiano após dois anos em relação ao período pré-transplante.

Portanto, nosso estudo demonstrou que o TCTH alogênico foi capaz de recapitular a homeostase dos compartimentos de células T e B a longo prazo. O produção *de novo* de células T e B *naive* deve contribuir decisivamente para a melhorar a disfunção imunológica dos pacientes com DF.

De fato, o TCTH alogênico para DF entre irmãos HLA idênticos na DF demonstrou uma excelente sobrevida de cinco anos, confirmando que este é um tratamento curativo, já usado mundialmente para pacientes com manifestações clínicas mais graves (GLUCKMAN et al., 2017).

Neste contexto, nosso estudo contribuiu para um melhor entendimento dos mecanismos de disfunção imunológica nos pacientes com DF e demonstrou os benefícios imunológicos do TCTH alogênico em relação aos tratamentos convencionais.

8. Conclusão

8 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que pacientes com DF apresentam um desequilíbrio na neogênese de células T pelo timo e alterações da diversidade do repertório de células T periférico, que podem conferir maior susceptibilidade a infecções. Nossos resultados também indicam que existe disfunção esplênica nos pacientes com DF está relacionada ao aumento da produção de células B *naive* pela medula óssea, sugerindo um mecanismo compensatório. Entre as diferentes modalidades terapêuticas, a HU foi capaz de melhorar a diversidade do repertório de células T e o TCTH alogênico foi capaz de melhorar a neogênese de células T e B a longo prazo nos pacientes com DF.

Referências

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, I. W. et al. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. **Haematologica**, v. 90, n. 1, p. 86–93, jan. 2005.

ADAMS, R. J. et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **The New England journal of medicine**, v. 339, n. 1, p. 5–11, 1998.

ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 26, p. 2769–2778, 2005.

ADEGOKE, S. A. et al. Comparative study of the growth and nutritional status of Brazilian and Nigerian school-aged children with sickle cell disease. **International Health**, p. 1–8, 28 set. 2017.

AFRIN, L. B. Mast cell activation syndrome as a significant comorbidity in sickle cell disease. **The American journal of the medical sciences**, v. 348, n. 6, p. 460–4, dez. 2014.

AKINSHEYE, I.; KLINGS, E. S. Sickle cell anemia and vascular dysfunction: The nitric oxide connection. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. May, p. 620–625, 2010

AKINSHEYE, I.; KLINGS, E. S. Sickle cell anemia and vascular dysfunction: The nitric oxide connection. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 3, p. 620–625, set. 2010.

AL JEFRI, A. H. Advances in allogeneic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. **Hemoglobin**, v. 35, n. 5–6, p. 469–75, 2011.

ALLEN, S. et al. Shaping the T-cell repertoire in the periphery. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 1, p. 60–69, jan. 2011.

ARELLANO, M. V. et al. Thymic function-related markers within the thymus and peripheral blood: Are they comparable? **Journal of clinical immunology**, v. 26, n. 1, p. 96–100, jan. 2006.

BAINS, I. et al. Quantifying the development of the peripheral naive CD4+ T-cell pool in humans. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5480–5487, 28 maio 2009.

BALANDYA, E. et al. Alteration of lymphocyte phenotype and function in sickle cell anemia: Implications for vaccine responses. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 9, p. 938–946, set. 2016.

BAO, W. et al. Regulatory B-cell compartment in transfused alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 9, p. 736–740, set. 2013.

BARRETT-CONNOR, E. Bacterial infection and sickle cell anemia. An analysis of 250 infections in 166 patients and a review of the literature. **Medicine**, v. 50, n. 2, p. 97–112, 1971.

BARTELINK, I. H. et al. Immune reconstitution kinetics as an early predictor for mortality using various hematopoietic stem cell sources in children. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 19, n. 2, p. 305–13, fev. 2013.

BEISHUIZEN, A et al. Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias: a new molecular target for detection of minimal residual disease. **Leukemia**, v. 11, n. September, p. 2200–2207, 1997.

BELCHER, J. D. et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 3, p. 377–390, 16 jan. 2014.

BENVENISTE, O. et al. Severe Perturbations of the Blood T Cell Repertoire in Polymyositis, But Not Dermatomyositis Patients. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3521–3529, 15 set. 2001.

BERES, A. J.; DROBYSKI, W. R. The Role of Regulatory T Cells in the Biology of Graft Versus Host Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

BERNAUDIN, F. et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2749–56, 1 out. 2007.

BESCHORNER, W. E. et al. The thymus in patients with allogeneic bone marrow transplants. **The American journal of pathology**, v. 92, n. 1, p. 173–86, jul. 1978.

BOGUNIA-KUBIK, K.; ŁACINA, P. From genetic single candidate gene studies to complex genomics of GvHD. **British journal of haematology**, v. 178, n. 5, p. 661–675, set. 2017.

BONTKES, H. J. et al. Azacitidine differentially affects CD4(pos) T-cell polarization in vitro and in vivo in high risk myelodysplastic syndromes. **Leukemia research**, v. 36, n. 7, p. 921–30, jul. 2012.

BOOTH, C.; INUSA, B.; OBARO, S. K. Infection in sickle cell disease: A review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. e2–e12, jan. 2010.

BOURSALIAN, T. E. et al. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. **Nature immunology**, v. 5, n. 4, p. 418–25, abr. 2004.

BRANDOW, A. M.; PANEPINTO, J. A. Hydroxyurea use in sickle cell disease: the battle with low prescription rates, poor patient compliance and fears of toxicities. **Expert review of hematology**, v. 3, p. 255–260, 2010.

CAMERON, P. U. et al. Splenectomy Associated Changes in IgM Memory B Cells in an Adult Spleen Registry Cohort. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23164, 4 ago. 2011.

CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007.

CANÇADO, R. D. et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 361–366, 2009.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007.

CASTILHOS, L. G. et al. Sickle cell anemia induces changes in peripheral lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in patients under treatment. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 73, p. 102–8, jul. 2015.

CHAPMAN, C. G. et al. Characterization of T-cell Receptor Repertoire in Inflamed Tissues of Patients with Crohn's Disease Through Deep Sequencing. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 6, p. 1275–1285, jun. 2016.

CHAUDHRY, M. S. et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Time To T Up the Thymus. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 1, p. 40–46, 1 jan. 2017.

CHEN, X. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 886–893, 15 jan. 2005.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. January, p. 72–80, 2012.

CLAVE, E. et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6477–6484, 18 jun. 2009.

CLAVE, E. et al. Thymic function recovery after unrelated donor cord blood or T-cell depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation correlates with leukemia relapse. **Frontiers in Immunology**, v.4, n. 54, mar. 2013.

CLISE-DWYER, K. et al. Environmental and intrinsic factors lead to antigen unresponsiveness in CD4(+) recent thymic emigrants from aged mice. **Journal of immunology**, v. 178, n. 3, p. 1321–31, 1 fev. 2007.

COOKE, K. R. et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 23, n. 2, p. 211–234, fev. 2017.

COSTANTINI, B. et al. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 98, n. 8, p. 1196–205, ago. 2013.

DEBAUN, M. R. et al. Controlled Trial of Transfusions for Silent Cerebral Infarcts in Sickle Cell Anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 8, p. 699–710, 21 ago. 2014.

DELOBEL, P. et al. Naive T-Cell Depletion Related to Infection by X4 Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Poor Immunological Responders to Highly Active Antiretroviral Therapy. **Journal of Virology**, v. 80, n. 20, p. 10229–10236, 15 out. 2006.

DIK, W. A et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 11, p. 1715–1723, 2005.

DIMITROV, J. D. et al. Antibodies Use Heme as a Cofactor to Extend Their Pathogen Elimination Activity and to Acquire New Effector Functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 26696–26706, 14 set. 2007.

DION, M.-L. et al. Slow disease progression and robust therapy-mediated CD4+ T-cell recovery are associated with efficient thymopoiesis during HIV-1 infection. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2912–20, 1 abr. 2007.

DION, M. L. et al. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. **Immunity**, v. 21, n. 6, p. 757–768, 2004.

DOUEK, D. C. et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 690–5, 17 dez. 1998.

DOUEK, D. C. et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. **Lancet (London, England)**, v. 355, n. 9218, p. 1875–81, 27 maio 2000.

DRESSLER WFC AND STERIN R. Uber den Hydroxylharnstoff. **Justus Liebigs Annals of Chemical Pharmacology**, v. 150, p. 242–252, 1869.

DUDAKOV, J. A. et al. Loss of thymic innate lymphoid cells leads to impaired thymopoiesis in experimental graft-versus-host disease. **Blood**, v. 130, n. 7, p. 933–942, 2017.

DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 39, p. E4110–E4118, 30 set. 2014.

DWYER, J. et al. Abnormalities in the immune system of children with beta-thalassaemia major. **Clinical and experimental immunology**, v. 68, n. 3, p. 621–9, jun. 1987.

FALLEN, P. R. et al. Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 32, n. 10, p. 1001–1014, 3 nov. 2003.

FEDORIW, Y. et al. Bone Marrow B cell Precursor Number after Allogeneic Stem Cell Transplantation and GVHD Development. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 18, n. 6, p. 968–973, jun. 2012.

FERNANDEZ, P. L. et al. Heme Amplifies the Innate Immune Response to Microbial Molecules through Spleen Tyrosine Kinase (Syk)-dependent Reactive Oxygen Species Generation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 43, p. 32844–32851, 22 out. 2010.

FERRANDO-MARTÍNEZ, S. et al. A reliable and simplified sj/beta-TREC ratio quantification method for human thymic output measurement. **Journal of immunological methods**, v. 352, n. 1–2, p. 111–7, 31 jan. 2010.

FERRARA, J. L. M.; REDDY, P. Pathophysiology of Graft-Versus-Host Disease. **Seminars in Hematology**, v. 43, n. 1, p. 3–10, jan. 2006.

FIGUEIREDO, M. S. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007.

FIGUEIREDO, R. T. et al. Characterization of Heme as Activator of Toll-like Receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20221–20229, 13 jul. 2007.

FILIPOVICH, A. H. et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 11, n. 12, p. 945–56, dez. 2005.

FOZZA, C. et al. Azacitidine improves the T-cell repertoire in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia. **Leukemia Research**, v. 39, n. 9, p. 957–963, 2015.

FOZZA, C. et al. Study of the T-cell receptor repertoire by CDR3 spectratyping. **Journal of Immunological Methods**, v. 440, p. 1–11, jan. 2017.

FOZZA, C.; LONGINOTTI, M. T-cell receptor repertoire usage in hematologic malignancies. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 86, n. 3, p. 201–11, jun. 2013.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850–858, 2 abr. 2007.

FRIMAT, M. et al. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. **Blood**, v. 122, n. 2, p. 282–292, 11 jul. 2013.

FRY, A. M. et al. Thymic requirement for clonal deletion during T cell development. **Science**, v. 246, n. 4933, p. 1044–6., 1989.

GAUTIER, D. et al. Efficient Thymopoiesis Contributes to the Maintenance of Peripheral CD4 T Cells during Chronic Human Immunodeficiency Virus Type 2 Infection. **Journal of Virology**, v. 81, n. 22, p. 12685–12688, 15 nov. 2007.

GAZIEV, J.; LUCARELLI, G. Hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. **Current stem cell research & therapy**, v. 6, n. 2, p. 162–9, jun. 2011.

GEERMAN, S.; NOLTE, M. A. Impact of T cells on hematopoietic stem and progenitor cell function: Good guys or bad guys? **World Journal of Stem Cells**, v. 9, n. 2, p. 37, 2017.

GHIA, P. et al. B-cell development: a comparison between mouse and man. **Immunology today**, v. 19, n. 10, p. 480–485, 1998.

GIORDANO, P. et al. B-cell hyperfunction in children with immune thrombocytopenic purpura persists after splenectomy. **Pediatric Research**, v. 79, n. 2, p. 262–270, 22 fev. 2016.

GLAUZY, S. et al. Impact of acute and chronic graft-versus-host disease on human B-cell generation and replication. **Blood**, v. 124, n. 15, p. 2459–62, 9 out. 2014.

GLUCKMAN, E. et al. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 129, n. 11, p. 1548–1556, 2017.

GORONZY, J. J.; LEE, W.-W.; WEYAND, C. M. Aging and T-cell diversity. **Experimental gerontology**, v. 42, n. 5, p. 400–6, maio 2007.

GORSKI, J. et al. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 10, p. 5109–19, 1994.

GRANATO, C. A problemática da infecção pelo citomegalovírus em pacientes imunodeprimidos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, n. 3, set. 2001.

HADZHIEVA, M. et al. Mechanism and Functional Implications of the Heme-Induced Binding Promiscuity of IgE. **Biochemistry**, v. 54, n. 11, p. 2061–2072, 24 mar. 2015.

HARRIS, A. C. et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 22, n. 1, p. 4–10, jan. 2016.

HAYNES, B. F. et al. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. **Annual review of immunology**, v. 18, p. 529–60, 2000.

HIGGINS, J. M.; SLOAN, S. R. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2546–2553, 15 set. 2008.

HILLIARD, L. M. et al. Erythrocytapheresis limits iron accumulation in chronically transfused sickle cell patients. **American journal of hematology**, v. 59, n. 1, p. 28–35, set. 1998.

HINGORANI, R. et al. Oligoclonality of V beta 3 TCR chains in the CD8+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 156, n. 2, p. 852–8, 15 jan. 1996.

HODES, R. J.; SHARROW, S. O.; SOLOMON, A. Failure of T cell receptor V beta negative selection in an athymic environment. **Science**, v. 246, n. 4933, p. 1041–4., 1989.

HOLTZCLAW, J. D. et al. Enhanced pulmonary and systemic response to endotoxin in transgenic sickle mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 169, n. 6, p. 687–95, 2004.

HSIEH, M. M.; FITZHUGH, C. D.; TISDALE, J. F. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: the time is now. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1197–207, 4 ago. 2011.

ISGRÒ, A. et al. Immunohematologic Reconstitution in Pediatric Patients after T Cell-Depleted HLA-Haploidentical Stem Cell Transplantation for Thalassemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 16, n. 11, p. 1557–1566, nov. 2010.

ITZYKSON, R. et al. Cytomegalovirus shapes long-term immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. **Haematologica**, v. 100, n. 1, p. 114–23, jan. 2015.

JAMIESON, B. D. et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. **Immunity**, v. 10, n. 5, p. 569–75, maio 1999.

JANKOVIC, D. et al. The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 10, p. 1899–910, 23 set. 2013.

JENEY, V. et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 879–87, 1 ago. 2002.

JIMÉNEZ, M. et al. Clinical factors influencing T-cell receptor excision circle (TRECs) counts following allogeneic stem cell transplantation in adults. **Transplant immunology**, v. 16, n. 1, p. 52–9, jun. 2006.

KAPLAN, J. et al. Diminished helper/suppressor lymphocyte ratios and natural killer activity in recipients of repeated blood transfusions. **Blood**, v. 64, n. 1, p. 308–10, jul. 1984.

KEIKHAEI, B. et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European cytokine network**, v. 24, n. 1, p. 45–52, mar. 2013.

KEIKHAEI, B.; YOUSEFI, H.; BAHADORAM, M. Hydroxyurea: Clinical and Hematological Effects in Patients With Sickle Cell Anemia. **Global journal of health science**, v. 8, n. 3, p. 47935, 2015.

KELLY, S. et al. Erythrocytapheresis for chronic transfusion therapy in sickle cell disease: survey of current practices and review of the literature. **Transfusion**, v. 56, n. 11, p. 2877–2888, nov. 2016.

KHOURY, R.; ABBOUD, M. R. Stem-cell transplantation in children and adults with sickle cell disease: an update. **Expert review of hematology**, v. 4, n. 3, p. 343–51, jun. 2011.

KOHNE, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Deutsches Arzteblatt international**, v. 108, n. 31–32, p. 532–40, ago. 2011.

KRUETZMANN, S. et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 7, p. 939–45, 7 abr. 2003.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of leukocyte biology**, v. 85, n. 2, p. 235–42, fev. 2009.

LAPP, W. S. et al. The functional and histological basis for graft-versus-host-induced immunosuppression. **Immunological reviews**, v. 88, p. 107–33, dez. 1985.

LAURANCE, S. et al. Hydroxycarbamide stimulates the production of proinflammatory cytokines by endothelial cells: relevance to sickle cell disease. **Pharmacogenetics and Genomics**, p. 1, mar. 2010.

LEDERMAN, H. M. et al. Immunologic Effects of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **PEDIATRICS**, v. 134, n. 4, p. 686–695, 1 out. 2014.

LEEMANS, J. C.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. **Immunological reviews**, v. 243, n. 1, p. 152–62, set. 2011.

LIU, C. et al. Longitudinal Analysis of T-Cell Receptor Variable β Chain Repertoire in Patients with Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, n. 3, p. 335–345, mar. 2006.

LÓPEZ, M. et al. Enhanced HIV-specific immune responses in chronically HIV-infected patients receiving didanosine plus hydroxyurea. **AIDS (London, England)**, v. 18, n. 9, p. 1251–61, 18 jun. 2004.

LOSADA-BARRAGÁN, M. et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with Leishmania infantum. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45991, 11 abr. 2017.

LUCARELLI, G. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 5, p. 1–11, 2012.

LUGTHART, G. et al. Early cytomegalovirus reactivation leaves a specific and dynamic imprint on the reconstituting T cell compartment long-term after hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of blood and marrow transplantation** , v. 20, n. 5, p. 655–61, maio 2014.

LUO, W. et al. Limited T Cell Receptor Repertoire Diversity in Tuberculosis Patients Correlates with Clinical Severity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e48117, 26 out. 2012.

LUPPI, P. et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen-driven autoimmune disease. **Circulation**, v. 98, n. 8, p. 777–85, 25 ago. 1998.

LYRA, J. S. et al. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. **The Journal of pathology**, v. 171, n. 3, p. 231–6, nov. 1993.

MAURIELLO, A. et al. Histological features of bone marrow in paediatric patients during the asymptomatic phase of early-stage Black African sickle cell anaemia. **Pathology**, v. 49, n. 3, p. 297–303, abr. 2017.

MCCAVIT, T. L. Sickle Cell Disease. **Pediatrics in Review**, v. 33, n. 5, p. 195–206, 1 maio 2012.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2 nov. 2015.

MCINTYRE, J. A.; WAGENKNECHT, D. R.; FAULK, W. P. Redox-reactive autoantibodies: Detection and physiological relevance. **Autoimmunity Reviews**, v. 5, n. 1, p. 76–83, jan. 2006.

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Altered thymocyte migration during experimental acuteTrypanosoma cruzi infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 6, p. 1486–1493, jun. 2006.

MENDONÇA, R.; SILVEIRA, A. A. A.; CONRAN, N. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation Research**, v. 65, n. 9, p. 665–678, 1 set. 2016.

MEYER, E. CMV after transplant: T-cell repertoire crooks. **Blood**, v. 125, n. 25, p. 3827–8, 18 jun. 2015.

MEYER, E. H. et al. A distinct evolution of the T-cell repertoire categorizes treatment refractory gastrointestinal acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 121, n. 24, p. 4955–62, 13 jun. 2013.

MILIĆEVIĆ, N. M. et al. Splenectomy of rats selectively reduces lymphocyte function-associated antigen 1 and intercellular adhesion molecule 1 expression on B-cell subsets in blood and lymph nodes. **Blood**, v. 98, n. 10, p. 3035–41, 15 nov. 2001.

MOCARSKI, E. S. et al. Human cytomegalovirus in a SCID-hu mouse: thymic epithelial cells are prominent targets of viral replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 1, p. 104–8, 1 jan. 1993.

MONTGOMERY, D. The present state of industrial statistics. **Quality and Reliability Engineering International**, v. 16, n. 4, p. 253–254, jul. 2000.

MÜLLER-HERMELINK, H. K. et al. Pathology of the thymus after allogeneic bone marrow transplantation in man. A histologic immunohistochemical study of 36 patients. **The American journal of pathology**, v. 129, n. 2, p. 242–56, nov. 1987.

MURARO, P. A. et al. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. **Journal of neuroimmunology**, v. 127, n. 1–2, p. 149–59, jun. 2002.

MURARO, P. A.; DOUEK, D. C. **Renewing the T cell repertoire to arrest autoimmune aggressionTrends in Immunology**, 2006.

MURRAY, C. J. L. et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2197–2223, 2012.

NAYLOR, K. et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 11, p. 7446–52, 1 jun. 2005.

NICKEL, R. S. et al. Immune parameter analysis of children with sickle cell disease on hydroxycarbamide or chronic transfusion therapy. **British Journal of Haematology**, v. 169, n. 4, p. 574–583, maio 2015.

NICKEL, R. S. et al. Impact of red blood cell alloimmunization on sickle cell disease mortality: a case series. **Transfusion**, v. 56, n. 1, p. 107–114, jan. 2016.

NICKEL, R. S. et al. Improved Splenic Function After Hematopoietic Stem Cell Transplant for Sickle Cell Disease. **Pediatric blood & cancer**, v. 63, n. 5, p. 908–13, maio 2016.

NOSSAL, G. J. V. Negative selection of lymphocytes. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 229-39, jan 1994.

NOTTAGE, K. A. et al. Predictors of splenic function preservation in children with sickle cell anemia treated with hydroxyurea. **European journal of haematology**, v. 93, n. 5, p. 377–83, nov. 2014.

OCHSENREITHER, S. et al. Comparison of T-cell receptor repertoire restriction in blood and tumor tissue of colorectal cancer patients. **Journal of translational medicine**, v. 8, p. 35, 2010.

ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. October, p. 532–537, 2011.

OKAJIMA, M. et al. Analysis of T cell receptor Vβ diversity in peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 155, n. 2, p. 166–172, 2009.

OLKINUORA, H. et al. The impact of early viral infections and graft-versus-host disease on immune reconstitution following paediatric stem cell transplantation. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 6, p. 586–93, jun. 2011.

OWUSU-OFORI, S.; HIRST, C. Splenectomy versus conservative management for acute sequestration crises in people with sickle cell disease. In: OWUSU-OFORI, S. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, nov. 2017.

PACZESNY, S. et al. Graft-versus-host disease biomarkers: omics and personalized medicine. **International Journal of Hematology**, v. 98, n. 3, p. 275–292, 20 set. 2013.

PAHWA, S. et al. T lymphocyte subpopulations in high-risk infants: influence of age and blood transfusions. **Pediatrics**, v. 76, n. 6, p. 914–7, dez. 1985.

PANNETIER, C. et al. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 9, p. 4319–23, 1993.

PANNETIER, C.; EVEN, J.; KOURILSKY, P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. **Immunology Today**, v. 16, n. 4, p. 176–181, 1995.

PATEL, D. D. et al. Characterization of human thymic epithelial cell surface antigens: phenotypic similarity of thymic epithelial cells to epidermal keratinocytes. **Journal of clinical immunology**, v. 15, n. 2, p. 80–92, mar. 1995.

PATTANAPANYASAT, K. et al. Lymphocyte subsets and specific T-cell immune response in thalassemia. **Cytometry**, v. 42, n. 1, p. 11–7, 15 fev. 2000.

PAVLETIC, S. Z.; VOGELSANG, G. B.; LEE, S. J. 2014 National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: preface to the series. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 387–8, mar. 2015.

PENKERT, R. R. et al. Inflammatory molecule reduction with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. **Haematologica**, p. haematol.2017.177360, 16 nov. 2017.

PETZ, L. D. et al. The sickle cell hemolytic transfusion reaction syndrome. **Transfusion**, v. 37, n. 4, p. 382–92, abr. 1997.

PIEL, F. B. et al. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010–2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 7, p. e1001484, 16 jul. 2013.

PITANGA, T. N. 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**, v. 83, p. 75–84, jul. 2016.

PLASILOVA, M.; RISITANO, A.; MACIEJEWSKI, J. P. Application of the Molecular Analysis of the T-Cell Receptor Repertoire in the Study of Immune-Mediated Hematologic Diseases. **Hematology**, v. 8, n. 3, p. 173–181, 4 maio 2003.

PLATT, O. S. et al. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 2, p. 652–656, 1 ago. 1984.

PLATT, O. S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 3, p. 337–8, 2000.

POULIN, J. F. et al. Direct evidence for thymic function in adult humans. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 4, p. 479–86, 16 ago. 1999.

PULE, G. et al. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea- induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. **Expert Review of Hematology**, v. 8, n. 5, p. 669–679, 2015.

PUROHIT, S. et al. Durable immune response to inactivated H1N1 vaccine is less likely in children with sickle cell anemia receiving chronic transfusions. **Pediatric blood & cancer**, v. 59, n. 7, p. 1280–3, 15 dez. 2012.

QARI, M. H.; DIER, U.; MOUSA, S. A. Biomarkers of Inflammation, Growth Factor, and Coagulation Activation in Patients With Sickle Cell Disease. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 18, n. 2, p. 195–200, 23 abr. 2012.

QUIROLO, K. et al. The evaluation of a new apheresis device for automated red blood cell exchange procedures in patients with sickle cell disease. **Transfusion**, v. 55, n. 4, p. 775–781, abr. 2015.

RAPHAEL, R. I.; VICHINSKY, E. P. Pathophysiology and treatment of sickle cell disease. **Clinical Advances in Hematology and Oncology**, v. 3, n. 6, p. 492–505, 2005.

REES, D. C. et al. Gene expression profiles of erythroid precursors characterise several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 3, n. 1, p. 128–133, 2012.

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

REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1383–1389, 11 dez. 2002.

RINGHOFFER, S. et al. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/βTREC ratio and thymic naive T cells. **Haematologica**, v. 98, n. 10, p. 1600–8, out. 2013.

RITTER, J. et al. Donor CD4 T Cell Diversity Determines Virus Reactivation in Patients After HLA-Matched Allogeneic Stem Cell Transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 15, n. 8, p. 2170–2179, ago. 2015.

ROUMENINA, L. T. et al. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 200–213, mar. 2016.

SAUCE, D. et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 10, p. 3070–8, out. 2009.

SAVINO, W. et al. Hormonal control of T-cell development in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 77,n. 2, p. 77-89, fev. 2015.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 4, p. 636–43, nov. 2010.

SCHAER, D. J. et al. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blood**, v. 121, n. 8, p. 1276–1284, 21 fev. 2013.

SCHAER, D. J. et al. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathwaysâ€"basic science, clinical perspectives, and drug development. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 28 out. 2014.

SCHALL, R. Estimation in Generalized Linear Models with Random Effects. **Biometrika**, v. 78, n. 4, p. 719, dez. 1991.

SHLOMCHIK, W. D. Graft-versus-host disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 340–352, maio 2007.

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.

SIMINOVITCH, K. A. et al. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. **Nature**, v. 316, n. 6025, p. 260–262, 1985.

SIMÕES, B. P. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: Comitê de hemoglobinopatias. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. Supl 1, p. 46–53, 2010.

SOMECH, R. T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 11, n. 6, p. 517–24, dez. 2011.

STEINBERG, M. H. et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 13, p. 1645–1651, 2003.

STEINMANN, G. G.; KLAUS, B.; MÜLLER-HERMELINK, H. K. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. **Scandinavian journal of immunology**, v. 22, n. 5, p. 563–75, nov. 1985.

STOREK, J. et al. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood**, v. 98, n. 2, p. 489–91, 15 jul. 2001.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet (London, England)**, v. 364, n. 9442, p. 1343–60, 2004.

SUESSMUTH, Y. et al. CMV reactivation drives posttransplant T-cell reconstitution and results in defects in the underlying TCRβ repertoire. **Blood**, v. 125, n. 25, p. 3835–50, 18 jun. 2015.

SULLIVAN, K. M.; MURARO, P.; TYNDALL, A. Hematopoietic Cell Transplantation for Autoimmune Disease: Updates from Europe and the United States. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 16, n. 1, p. S48–S56, jan. 2010.

SZCZEPANEK, S. M. et al. Splenic Morphological Changes Are Accompanied by Altered Baseline Immunity in a Mouse Model of Sickle-Cell Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 5, p. 1725–1734, nov. 2012.

TALVENSAARI, K. et al. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. **Blood**, v. 99, n. 4, p. 1458–1464, 2002.

TCHAO, N. K.; TURKA, L. A. Lymphodepletion and homeostatic proliferation: Implications for transplantation**. American Journal of Transplantation**, , v. 12, n. 5, p. 1079-90, maio 2002.

TESHIMA, T.; REDDY, P.; ZEISER, R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. **Biology of blood and marrow transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 22, n. 1, p. 11–6, jan. 2016.

TELEN, M. J. et al. Alloimmunization in sickle cell disease: changing antibody specificities and association with chronic pain and decreased survival. **Transfusion**, v. 55, n. 6pt2, p. 1378–1387, jun. 2015.

THORNBURG, C. D. et al. Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. **Blood**, v. 120, n. 22, p. 4304–4310, 22 nov. 2012.

TOUBAI, T. et al. Danger Signals and Graft-versus-host Disease: Current Understanding and Future Perspectives. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 539, 2016.

TOUBERT, A. et al. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: Never say never again. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 2, p. 83–89, 2012.

TSITSIKAS, D. A. et al. Distinct patterns of response to transfusion therapy for different chronic complications of sickle cell disease: A useful insight. **Transfusion and Apheresis Science**, ago. 2017.

VAN DEN BEEMD, R. et al. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. **Cytometry**, v. 40, n. 4, p. 336–45, 1 ago. 2000.

VAN DEN BROEK, T. et al. Neonatal thymectomy reveals differentiation and plasticity within human naive T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 3, p. 1126–36, 1 mar. 2016.

VAN ZELM, M. C. et al. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 3, p. 645–55, 2007.

VAN ZELM, M. C. et al. PID comes full circle: Applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 2, n. MAY, 2011.

VAN ZELM, M. C.; VAN DER BURG, M.; VAN DONGEN, J. J. M. Homeostatic and Maturation-associated Proliferation in the Peripheral B-Cell Compartment. **Cell Cycle**, v. 6, n. 23, p. 2890–2895, 28 dez. 2007.

VENET, F. et al. Decreased T-Cell Repertoire Diversity in Sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 1, p. 111–119, jan. 2013.

VENTEVOGEL, M. S.; SEMPOWSKI, G. D. Thymic rejuvenation and aging. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 4, p. 516–522, 2013.

VINGERT, B. et al. Partial dysfunction of Treg activation in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 3, p. 261–266, mar. 2014.

VINGERT, B. et al. Phenotypic differences of CD4 + T cells in response to red blood cell immunization in transfused sickle cell disease patients. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1868–1879, jun. 2015.

VOLTARELLI, J. C. Imunologia do Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. **Manual Brasileiro de Transplante de Medula Óssea**, 2009.

VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2163–96, 15 dez. 2012.

WAGENER, F. A. D. T. G. Different Faces of the Heme-Heme Oxygenase System in Inflammation. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 551–571, 17 jul. 2003.

WAHLSTRÖM, J. et al. T cell receptor Vbeta expression in patients with allergic asthma before and after repeated low-dose allergen inhalation. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 100, n. 1, p. 31–9, jul. 2001.

WALUSIMBI, M. S. et al. Circulating cellular and humoral elements of immune function following splenic arterial embolisation or splenectomy in trauma patients. **Injury**, v. 43, n. 2, p. 180–3, fev. 2012.

WANG, S. D. et al. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 10, p. 5014–21, 15 maio 1994.

WANG, W. C. et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9778, p. 1663–72, 14 maio 2011.

WARE, R. E. Is Sickle Cell Anemia a Neglected Tropical Disease?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2120, 30 maio 2013.

WARE, R. E. et al. Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, jul. 2017.

WASSERSTROM, H. et al. Memory B Cells and Pneumococcal Antibody After Splenectomy. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 5, p. 3684–3689, 1 set. 2008.

WEINBERG, K. et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1458–1466, 2001.

WILLIAM, B. M.; CORAZZA, G. R. Hyposplenism: a comprehensive review. Part I: basic concepts and causes. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2007.

WILLIAMS, K. M.; HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. **Seminars in immunology**, v. 19, n. 5, p. 318–30, out. 2007.

WONG, T. E. et al. Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. **Blood**, v. 124, n. 26, p. 3850–3857, 18 dez. 2014.

WU, C. J. et al. Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. **Blood**, v. 95, n. 1, p. 352–359, 2000.

WU, J. et al. T-cell receptor diversity is selectively skewed in T-cell populations of patients with Wiskott-Aldrich syndrome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 209–216, 2015.

WU, T. et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 1, p. 488–99, 1 jul. 2013.

WU, Z. et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. **Nature medicine**, v. 10, n. 1, p. 87–92, jan. 2004.

XIONG, Y.; TAN, Y.; SONG, Y. G. Analysis of T cell receptor Vβ diversity in peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes obtained from patients with chronic severe hepatitis B. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 2, 2014.

YANG, X. et al. Pre-transplantation thymic function is associated with the risk of acute graft versus host disease and cytomegalovirus viremia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 23, n. 1, p. 30–37, jan. 2018.

YASSAI, M. B. et al. A clonotype nomenclature for T cell receptors. **Immunogenetics**, v. 61, n. 7, p. 493–502, 1 jul. 2009.

YAZDANBAKHSH, K.; SHAZ, B. H.; HILLYER, C. D. Immune Regulation of sickle Cell Alloimmunization. **ISBT science series**, v. 12, n. 1, p. 248–253, fev. 2017.

YEE, M. E. M. et al. Red blood cell minor antigen mismatches during chronic transfusion therapy for sickle cell anemia. **Transfusion**, 24 ago. 2017.

YOUNG, J. S. et al. Donor B cells in transplants augment clonal expansion and survival of pathogenic CD4+ T cells that mediate autoimmune-like chronic graft-versus-host disease. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 1, p. 222–33, 1 jul. 2012.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007.

ZEISER, R.; BLAZAR, B. R. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 22, p. 2167–2179, 2017.

ZEISER, R.; BLAZAR, B. R. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 26, p. 2565–2579, 2017.

ZHANG, L. et al. Cellular and molecular mechanisms in graft-versus-host disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 99, n. 2, p. 279–87, fev. 2016.

ZHONG, H. et al. Hemin Controls T Cell Polarization in Sickle Cell Alloimmunization. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 1, p. 102–110, 1 jul. 2014.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A – Representação esquemática do método *TCRBV CDR3 Spectratyping* e os padrões de distribuição da região CDR3 após a análise no software Gene Mapper™.

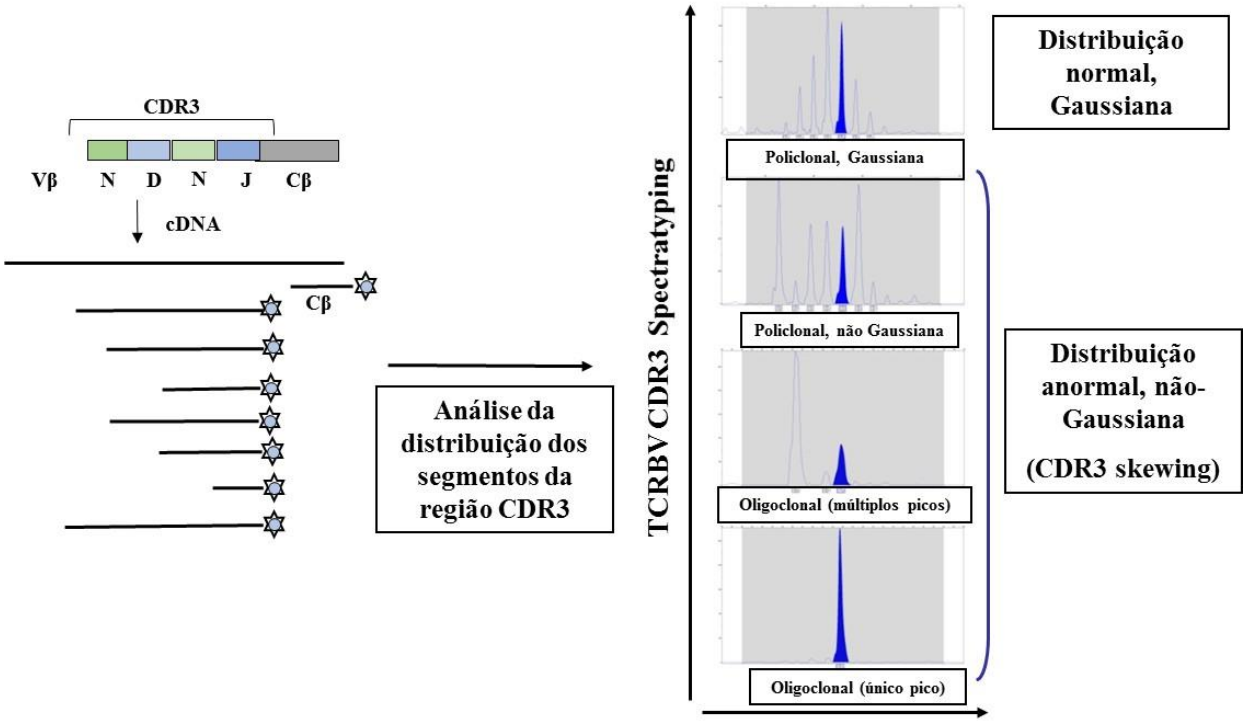


Figura A.1. Método de *TCRBV CDR3 Spectratyping*. Este método permite analisar a diversidade do repertório de linfócitos T e detectar populações celulares em expansão clonais (Pannetier et al., 1993; Pannetier et al., 1995). A técnica inicia-se pela amplificação por PCR dos segmentos Vβ-Cβ do TCR utilizando *primers* específicos para cada uma das 24 famílias Vβ estudadas. O produto desta reação é submetido a uma segunda amplificação por PCR que inclui um *primer* adicional marcado com fluorocromo. Nesta segunda reação, amplifica-se o segmento gênico que contém a região CDR3 (do inglês *Complementarity-Determining Regions*) do TCR, uma vez que esta região está localizada entre os segmentos V-D-J. Em seguida, estes seguimentos amplificados por PCR são submetidos a separação dos fragmentos em um sequenciador automático e através do software Gene Mapper™ v.4.1 (Applied Biosystem), é possível calcular o tamanho (em pares de bases) dos diferentes fragmentos (picos) de CDR3, o número de picos de CDR3, estimar a frequência de cada família Vβ no repertório do TCR e analisar a clonalidade e distribuição (gaussiana ou não gaussiana) dos picos na região CDR3.

Os gráficos (ou espectros) representam a intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias em função do comprimento da região CDR3 em pares de bases. Nos espectros, os picos destacados em azul correspondem ao segmento de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.

Apêndice B – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da quantificação das moléculas de TREC e β-TREC e razão TREC/β-TREC (taxa de divisão celular intratímica) nos pacientes com anemia falcforme convencionalmente tratados e sem tratamento e no grupo controle.

Tabela B.1. Valores e média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas nas comparações entre todos os grupos e com o grupo controle.

	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
	Hidroxiuréia (N=20)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,56 (0,27)	2,51	2,54 (0,32)	2,65	0,01	(-0,19;0,2)	0,94
β-TREC	1,44 (0,51)	1,57	1,39 (0,42)	1,39	-0,01	(-0,41;0,4)	0,97
sjTREC/ β-TREC	3,29(1,46)	3,09	3,82(1,29)	3,95	0,43	(-0,72;1,59)	0,45
	Transfusão Crônica (N=21)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,61(0,4)	2,49	2,54 (0,32)	2,65	-0,01	(-0,2;0,18)	0,91
β-TREC	1,38(0,82)	1,52	1,39 (0,42)	1,39	0,11	(-0,29;0,52)	0,58
sjTREC/ β-TREC	3,75(2,14)	3,03	3,82(1,29)	3,95	-0,16	(-1,31;0,99)	0,78
	Sem tratamento (N=15)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,31(0,29)	2,36	2,54 (0,32)	2,65	0,21	(0;0,41)	**0,04**
β-TREC	1,03(0,76)	1,1	1,39 (0,42)	1,39	0,32	(-0,12;0,75)	0,14
sjTREC/ β-TREC	3,13(2,21)	3,47	3,82(1,29)	3,95	0,79	(-0,45;2,03)	0,20
	Hidroxiuréia (N=20)		**Transfusão Crônica (N=21)**				
sjTREC	2,56 (0,27)	2,51	2,61(0,4)	2,49	-0,02	(-0,2;0,16)	0,85
β-TREC	1,44 (0,51)	1,57	1,38(0,82)	1,52	0,12	(-0,26;0,5)	0,53
sjTREC/ β-TREC	3,29(1,46)	3,09	3,75(2,14)	3,03	-0,59	(-1,67;0,49)	0,27
	Hidroxiuréia (N=20)		**Sem tratamento (N=15)**				
sjTREC	2,56 (0,27)	2,51	2,31(0,29)	2,36	0,20	(0;0,4)	**0,04**
β-TREC	1,44 (0,51)	1,57	1,03(0,76)	1,1	0,32	(-0,09;0,74)	0,12
sjTREC/ β-TREC	3,29(1,46)	3,09	3,13(2,21)	3,47	0,36	(-0,82;1,54)	0,54
	Transfusão Crônica (N=21)		**Sem tratamento (N=15)**				
sjTREC	2,61(0,4)	2,49	2,31(0,29)	2,36	0,22	(0,02;0,41)	**0,03**
β-TREC	1,38(0,82)	1,52	1,03(0,76)	1,1	0,21	(-0,21;0,62)	0,32
sjTREC/ β-TREC	3,75(2,14)	3,03	3,13(2,21)	3,47	0,95	(-0,23;2,13)	0,11

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Taxa de divisão celular intratímica das células T foi calculada segundo a seguinte fórmula: n = Log(sjTREC/β-TREC)/Log2.As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice C – Valres de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da frequência total (%) de cada família Vβ em linfócitos T de sangue periférico nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados e sem tratamento e no grupo controle.

Tabela C.1. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo tratado com hidroxiuréia e o grupo controle.

	Hidroxiuréia (N=19)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,16(6,93)	0,18	0,76(0,76)	0,51	-0,01	(-0,38;0,36)	0,95
2	4,88(2,97)	5,16	5,57(4,06)	5,95	-0,02	(-0,38;0,35)	0,93
3	10,84(6,12)	10,2	6,18(3,43)	6,28	0,49	(0,12;0,86)	**0,01**
4	1,25(1,44)	0,78	1,32(1,76)	0,9	-0,08	(-0,45;0,29)	0,67
5	7,71(3,92)	6,84	7,21(4,36)	7,91	0,09	(-0,28;0,46)	0,63
6	11,67(5,25)	10,97	12,98(5,1)	12,7	-0,07	(-0,43;0,3)	0,72
7	2,3(1,79)	1,76	2,73(1,59)	2,84	-0,19	(-0,55;0,18)	0,32
8	1,09(1,2)	0,63	1(1,05)	0,55	0,00	(-0,37;0,36)	0,99
9	2,03(2,15)	1,54	1,96(2,04)	1,6	0,01	(-0,36;0,37)	0,98
10	3,03(2,41)	2,45	2,24(1,17)	1,98	0,15	(-0,22;0,52)	0,43
11	3,3(2,12)	2,91	2,99(1,83)	2,56	0,07	(-0,3;0,44)	0,70
12	0,08(0,17)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,20	(-0,57;0,17)	0,29
13	4,44(1,87)	4,54	4,09(1,57)	4,3	0,02	(-0,35;0,38)	0,93
14	2,37(2,52)	1,37	2,8(2,61)	2,17	-0,15	(-0,52;0,21)	0,41
15	4,63(3,1)	4,79	4,56(2,49)	5,5	-0,03	(-0,4;0,34)	0,87
16	5,24(4,22)	3,72	6,95(2,95)	6,53	-0,40	(-0,77;-0,04)	**0,03**
17	1,7(1,16)	1,48	1,98(1,35)	1,63	-0,12	(-0,49;0,25)	0,52
18	3,38(3,97)	2,2	2,42(2,02)	1,75	0,08	(-0,28;0,45)	0,65
19	0,07(0,1)	0	0,06(0,09)	0	-0,01	(-0,38;0,36)	0,95
20	2,22(2,72)	1,26	1,91(1,59)	1,48	-0,03	(-0,39;0,34)	0,89
21	9,11(3,47)	8,44	9,71(3,1)	9,27	-0,10	(-0,47;0,27)	0,60
22	17,7(8,79)	14,97	17,07(4,64)	18,4	-0,03	(-0,4;0,34)	0,87
23	1,97(1,1)	1,95	1,5(0,74)	1,27	0,13	(-0,24;0,49)	0,50
24	2,09(1,27)	1,69	1,71(0,9)	1,67	0,11	(-0,26;0,48)	0,56

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela C.2. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo tratado com transfusão crônica e o grupo controle.

	Transfusão crônica (N=21)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,77(1,64)	0,36	0,76(0,76)	0,51	-0,11	(-0,47;0,24)	0,54
2	8,79(9,65)	6,78	5,57(4,06)	5,95	0,34	(-0,02;0,7)	0,07
3	8,84(4,97)	8,12	6,18(3,43)	6,28	0,28	(-0,08;0,64)	0,13
4	2,43(4,95)	0,87	1,32(1,76)	0,9	0,12	(-0,24;0,48)	0,53
5	6,73(3,66)	6,69	7,21(4,36)	7,91	-0,09	(-0,45;0,27)	0,63
6	10,09(5,8)	9,83	12,98(5,1)	12,7	-0,30	(-0,66;0,06)	0,10
7	2,24(1,59)	2,08	2,73(1,59)	2,84	-0,20	(-0,56;0,16)	0,28
8	0,97(1,44)	0,21	1(1,05)	0,55	-0,12	(-0,48;0,24)	0,52
9	1,57(1,08)	1,3	1,96(2,04)	1,6	-0,10	(-0,46;0,26)	0,57
10	1,87(0,98)	1,98	2,24(1,17)	1,98	-0,15	(-0,51;0,21)	0,41
11	2,31(1,49)	2,05	2,99(1,83)	2,56	-0,20	(-0,56;0,16)	0,28
12	0,08(0,12)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,20	(-0,57;0,16)	0,27
13	4,3(2,59)	4,23	4,09(1,57)	4,3	-0,11	(-0,47;0,25)	0,55
14	2,45(2,55)	1,09	2,8(2,61)	2,17	-0,18	(-0,54;0,18)	0,34
15	3,98(2,94)	4,66	4,56(2,49)	5,5	-0,19	(-0,55;0,17)	0,31
16	3,83(2,6)	2,69	6,95(2,95)	6,53	-0,60	(-0,96;-0,24)	**<0,01**
17	1,67(1,03)	1,49	1,98(1,35)	1,63	-0,13	(-0,49;0,23)	0,48
18	1,54(1,59)	0,92	2,42(2,02)	1,75	-0,35	(-0,71;0,01)	0,06
19	0,3(0,88)	0,06	0,06(0,09)	0	0,08	(-0,28;0,44)	0,66
20	1,58(1,61)	0,96	1,91(1,59)	1,48	-0,15	(-0,51;0,21)	0,40
21	9,13(3,81)	8,85	9,71(3,1)	9,27	-0,14	(-0,5;0,22)	0,45
22	20,4(10,09)	18,37	17,07(4,64)	18,4	0,04	(-0,32;0,4)	0,81
23	2,22(1,19)	1,85	1,5(0,74)	1,27	0,20	(-0,16;0,56)	0,28
24	1,9(1,31)	1,46	1,71(0,9)	1,67	0,01	(-0,35;0,37)	0,96

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela C.3. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo sem tratamento e o grupo controle.

	Sem tratamento (N=14)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,35(0,42)	0,21	0,76(0,76)	0,51	0,22	(-0,17;0,62)	0,27
2	6,23(3,96)	6,22	5,57(4,06)	5,95	-0,18	(-0,57;0,21)	0,37
3	13,45(7,44)	11,82	6,18(3,43)	6,28	-0,74	(-1,14;-0,35)	**<0,01**
4	0,69(0,57)	0,63	1,32(1,76)	0,9	0,23	(-0,16;0,62)	0,25
5	8,68(7,12)	7,66	7,21(4,36)	7,91	-0,13	(-0,52;0,27)	0,53
6	10,84(4,89)	12,55	12,98(5,1)	12,7	0,13	(-0,26;0,53)	0,50
7	2,11(1,64)	1,84	2,73(1,59)	2,84	0,23	(-0,16;0,63)	0,25
8	0,37(0,59)	0,02	1(1,05)	0,55	-0,27	(-0,67;0,12)	0,17
9	1,49(0,87)	1,52	1,96(2,04)	1,6	0,09	(-0,3;0,49)	0,64
10	1,65(1,16)	1,53	2,24(1,17)	1,98	0,23	(-0,17;0,62)	0,26
11	2,5(2,01)	1,97	2,99(1,83)	2,56	0,16	(-0,24;0,55)	0,43
12	0,13(0,21)	0	0,31(0,31)	0,31	0,13	(-0,26;0,53)	0,51
13	5,04(3,1)	4,63	4,09(1,57)	4,3	-0,08	(-0,48;0,31)	0,69
14	2,41(2,79)	0,95	2,8(2,61)	2,17	0,13	(-0,26;0,53)	0,51
15	3,39(3,25)	2,97	4,56(2,49)	5,5	0,36	(-0,04;0,75)	0,07
16	4,92(5,61)	3,39	6,95(2,95)	6,53	0,50	(0,1;0,89)	**0,01**
17	1,76(0,93)	1,75	1,98(1,35)	1,63	0,04	(-0,35;0,43)	0,84
18	1,85(2,16)	1,3	2,42(2,02)	1,75	0,20	(-0,2;0,59)	0,33
19	0,06(0,1)	0	0,06(0,09)	0	0,00	(-0,4;0,39)	0,98
20	1,22(1,06)	1,04	1,91(1,59)	1,48	0,21	(-0,18;0,61)	0,29
21	10,92(7,68)	8,9	9,71(3,1)	9,27	-0,01	(-0,41;0,38)	0,94
22	16,33(9,14)	14,72	17,07(4,64)	18,4	0,19	(-0,2;0,59)	0,34
23	2,24(2,14)	1,47	1,5(0,74)	1,27	-0,17	(-0,56;0,23)	0,41
24	1,35(0,52)	1,44	1,71(0,9)	1,67	0,11	(-0,29;0,5)	0,60

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela C.4. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo tratado com hidroxiuréia e o grupo tratado com transfusão crônica.

	Hidroxiuréia (N=19)		**Transfusão crônica (N=21)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,16(6,93)	0,18	0,77(1,64)	0,36	0,10	(-0,23;0,43)	0,54
2	4,88(2,97)	5,16	8,79(9,65)	6,78	-0,35	(-0,69;-0,02)	**0,04**
3	10,84(6,12)	10,2	8,84(4,97)	8,12	0,22	(-0,12;0,55)	0,20
4	1,25(1,44)	0,78	2,43(4,95)	0,87	-0,20	(-0,53;0,14)	0,25
5	7,71(3,92)	6,84	6,73(3,66)	6,69	0,18	(-0,15;0,51)	0,29
6	11,67(5,25)	10,97	10,09(5,8)	9,83	0,23	(-0,1;0,56)	0,17
7	2,3(1,79)	1,76	2,24(1,59)	2,08	0,01	(-0,32;0,34)	0,94
8	1,09(1,2)	0,63	0,97(1,44)	0,21	0,12	(-0,21;0,45)	0,49
9	2,03(2,15)	1,54	1,57(1,08)	1,3	0,11	(-0,22;0,44)	0,52
10	3,03(2,41)	2,45	1,87(0,98)	1,98	0,30	(-0,03;0,63)	0,08
11	3,3(2,12)	2,91	2,31(1,49)	2,05	0,27	(-0,06;0,6)	0,11
12	0,08(0,17)	0	0,08(0,12)	0	0,01	(-0,32;0,34)	0,97
13	4,44(1,87)	4,54	4,3(2,59)	4,23	0,13	(-0,2;0,46)	0,45
14	2,37(2,52)	1,37	2,45(2,55)	1,09	0,02	(-0,31;0,35)	0,89
15	4,63(3,1)	4,79	3,98(2,94)	4,66	0,16	(-0,17;0,49)	0,35
16	5,24(4,22)	3,72	3,83(2,6)	2,69	0,19	(-0,14;0,52)	0,25
17	1,7(1,16)	1,48	1,67(1,03)	1,49	0,01	(-0,32;0,34)	0,95
18	3,38(3,97)	2,2	1,54(1,59)	0,92	0,43	(0,1;0,76)	**0,01**
19	0,07(0,1)	0	0,3(0,88)	0,06	-0,09	(-0,42;0,24)	0,59
20	2,22(2,72)	1,26	1,58(1,61)	0,96	0,13	(-0,2;0,46)	0,45
21	9,11(3,47)	8,44	9,13(3,81)	8,85	0,04	(-0,29;0,37)	0,81
22	17,7(8,79)	14,97	20,4(10,09)	18,37	-0,08	(-0,41;0,26)	0,65
23	1,97(1,1)	1,95	2,22(1,19)	1,85	-0,07	(-0,4;0,26)	0,66
24	2,09(1,27)	1,69	1,9(1,31)	1,46	0,10	(-0,23;0,43)	0,56

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela C.5. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo tratado com hidroxiuréia e o grupo sem tratamento.

	Hidroxiuréia (N=19)		**Sem tratamento (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,16(6,93)	0,18	0,35(0,42)	0,21	0,21	(-0,15;0,58)	0,26
2	4,88(2,97)	5,16	6,23(3,96)	6,22	-0,20	(-0,56;0,17)	0,30
3	10,84(6,12)	10,2	13,45(7,44)	11,82	-0,25	(-0,62;0,12)	0,18
4	1,25(1,44)	0,78	0,69(0,57)	0,63	0,15	(-0,22;0,52)	0,42
5	7,71(3,92)	6,84	8,68(7,12)	7,66	-0,03	(-0,4;0,33)	0,85
6	11,67(5,25)	10,97	10,84(4,89)	12,55	0,07	(-0,3;0,44)	0,72
7	2,3(1,79)	1,76	2,11(1,64)	1,84	0,04	(-0,32;0,41)	0,81
8	1,09(1,2)	0,63	0,37(0,59)	0,02	0,32	(-0,04;0,69)	0,08
9	2,03(2,15)	1,54	1,49(0,87)	1,52	0,10	(-0,27;0,47)	0,59
10	3,03(2,41)	2,45	1,65(1,16)	1,53	0,37	(0,01;0,74)	**0,04**
11	3,3(2,12)	2,91	2,5(2,01)	1,97	0,23	(-0,14;0,6)	0,22
12	0,08(0,17)	0	0,13(0,21)	0	-0,07	(-0,43;0,3)	0,73
13	4,44(1,87)	4,54	5,04(3,1)	4,63	-0,06	(-0,43;0,3)	0,73
14	2,37(2,52)	1,37	2,41(2,79)	0,95	-0,02	(-0,39;0,35)	0,91
15	4,63(3,1)	4,79	3,39(3,25)	2,97	0,33	(-0,04;0,7)	0,08
16	5,24(4,22)	3,72	4,92(5,61)	3,39	0,09	(-0,28;0,46)	0,62
17	1,7(1,16)	1,48	1,76(0,93)	1,75	-0,08	(-0,45;0,29)	0,67
18	3,38(3,97)	2,2	1,85(2,16)	1,3	0,28	(-0,09;0,65)	0,14
19	0,07(0,1)	0	0,06(0,1)	0	-0,02	(-0,38;0,35)	0,94
20	2,22(2,72)	1,26	1,22(1,06)	1,04	0,19	(-0,18;0,56)	0,32
21	9,11(3,47)	8,44	10,92(7,68)	8,9	-0,11	(-0,48;0,25)	0,54
22	17,7(8,79)	14,97	16,33(9,14)	14,72	0,16	(-0,21;0,53)	0,39
23	1,97(1,1)	1,95	2,24(2,14)	1,47	-0,04	(-0,41;0,33)	0,83
24	2,09(1,27)	1,69	1,35(0,52)	1,44	0,21	(-0,15;0,58)	0,25

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela C.6. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo tratado com transfusão crônica e o grupo sem tratamento.

	Transfusão crônica (N=21)		**Sem tratamento (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,77(1,64)	0,36	0,35(0,42)	0,21	0,11	(-0,25;0,47)	0,55
2	8,79(9,65)	6,78	6,23(3,96)	6,22	0,16	(-0,2;0,52)	0,39
3	8,84(4,97)	8,12	13,45(7,44)	11,82	-0,47	(-0,83;-0,11)	**0,01**
4	2,43(4,95)	0,87	0,69(0,57)	0,63	0,35	(-0,01;0,71)	0,06
5	6,73(3,66)	6,69	8,68(7,12)	7,66	-0,21	(-0,58;0,15)	0,24
6	10,09(5,8)	9,83	10,84(4,89)	12,55	-0,17	(-0,53;0,2)	0,37
7	2,24(1,59)	2,08	2,11(1,64)	1,84	0,03	(-0,33;0,39)	0,86
8	0,97(1,44)	0,21	0,37(0,59)	0,02	0,21	(-0,15;0,57)	0,26
9	1,57(1,08)	1,3	1,49(0,87)	1,52	-0,01	(-0,37;0,35)	0,96
10	1,87(0,98)	1,98	1,65(1,16)	1,53	0,07	(-0,29;0,43)	0,69
11	2,31(1,49)	2,05	2,5(2,01)	1,97	-0,04	(-0,4;0,32)	0,82
12	0,08(0,12)	0	0,13(0,21)	0	-0,07	(-0,43;0,29)	0,69
13	4,3(2,59)	4,23	5,04(3,1)	4,63	-0,19	(-0,55;0,17)	0,30
14	2,45(2,55)	1,09	2,41(2,79)	0,95	-0,04	(-0,41;0,32)	0,81
15	3,98(2,94)	4,66	3,39(3,25)	2,97	0,17	(-0,19;0,53)	0,35
16	3,83(2,6)	2,69	4,92(5,61)	3,39	-0,10	(-0,46;0,26)	0,59
17	1,67(1,03)	1,49	1,76(0,93)	1,75	-0,09	(-0,45;0,27)	0,63
18	1,54(1,59)	0,92	1,85(2,16)	1,3	-0,15	(-0,51;0,21)	0,41
19	0,3(0,88)	0,06	0,06(0,1)	0	0,08	(-0,28;0,44)	0,68
20	1,58(1,61)	0,96	1,22(1,06)	1,04	0,06	(-0,3;0,42)	0,74
21	9,13(3,81)	8,85	10,92(7,68)	8,9	-0,15	(-0,51;0,21)	0,41
22	20,4(10,09)	18,37	16,33(9,14)	14,72	0,24	(-0,12;0,6)	0,20
23	2,22(1,19)	1,85	2,24(2,14)	1,47	0,03	(-0,33;0,39)	0,85
24	1,9(1,31)	1,46	1,35(0,52)	1,44	0,12	(-0,25;0,48)	0,53

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice D – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da quantificação das moléculas de KREC e Cj e razão Cj/KREC (taxa de divisão celular periférica) nos pacientes com anemia falciforme convencionalmente tratados e sem tratamento e no grupo controle.

Tabela D.1. Valores e média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas nas comparações entre todos os grupos e com o grupo controle.

	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
	Hidroxiuréia (N=20)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,27(0,37)	3,34	2,79(0,39)	2,82	-10,44	(-18,1;-2,8)	**<0,01**
Cj	4,04(0,18)	4,04	3,94(0,2)	4	-4,78	(-13,5;3,9)	0,27
Cj/ sjKREC	2,53(0,98)	2,18	3,82(1,4)	3,6	1,29	(0,53;2,05)	**<0,01**
	Transfusão Crônica (N=21)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,47(0,7)	3,67	2,79(0,39)	2,82	-18,82	(-26,5;-11,2)	**<0,01**
Cj	4,06(0,65)	4,23	3,94(0,2)	4	-10,44	(-19,1;-1,7)	**0,01**
Cj/ sjKREC	1,94(1,04)	1,6	3,82(1,4)	3,6	1,9	(1,14;2,66)	**<0,01**
	Sem tratamento (N=15)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,19(0,43)	3,12	2,79(0,39)	2,82	-9,86	(-18,1;-1,7)	**0,01**
Cj	4,02(0,26)	3,99	3,94(0,2)	4	-6,10	(-15,4;3,2)	0,19
Cj/ sjKREC	2,74(1,11)	3,11	3,82(1,4)	3,6	1,07	(0,25;1,89)	**0,01**
	Hidroxiuréia (N=20)		**Transfusão Crônica (N=21)**				
sjKREC	3,27(0,37)	3,34	3,47(0,7)	3,67	-8,39	(-15,5;-1,2)	**0,02**
Cj	4,04(0,18)	4,04	4,06(0,65)	4,23	-5,66	(-13,8;2,5)	0,16
Cj/ sjKREC	2,53(0,98)	2,18	1,94(1,04)	1,6	0,61	(-0,1;1,32)	0,09
	Hidroxiuréia (N=20)		**Sem tratamento (N=15)**				
sjKREC	3,27(0,37)	3,34	3,19(0,43)	3,12	0,58	(-7,3;8,4)	0,88
Cj	4,04(0,18)	4,04	4,02(0,26)	3,99	-1,32	(-10,2;7,6)	0,76
Cj/ sjKREC	2,53(0,98)	2,18	2,74(1,11)	3,11	-0,22	(-1;0,56)	0,57
	Transfusão Crônica (N=21)		**Sem tratamento (N=15)**				
sjKREC	3,47(0,7)	3,67	3,19(0,43)	3,12	8,96	(1,1;16,8)	**0,02**
Cj	4,06(0,65)	4,23	4,02(0,26)	3,99	4,34	(-4,6;13,3)	0,33
Cj/ sjKREC	1,94(1,04)	1,6	2,74(1,11)	3,11	-0,83	(-1,6;-0,05)	**0,03**

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Taxa de divisão celular periférica das células B foi calculada segundo a seguinte fórmula: n = Log(Cj/sjKREC)/Log2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice E – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da quantificação das moléculas de KREC e Cj e razão Cj/KREC (taxa de divisão celular periférica) nos pacientes com anemia falciforme tratados com transfusão crônica (aloimunizados e não aloimunizados) e no grupo controle.

Tabela E.1. Valores e média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas nas comparações entre o grupo aloimunizado e não aloimunizado e com o grupo controle.

	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
	Aloimunizado (N=7)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,02(1,06)	3,27	2,79(0,39)	2,82	-9,41	(-19,2;0,4)	0,06
Cj	3,78(1,1)	4,13	3,94(0,2)	4	-1,93	(-13,8;9,9)	0,74
Cj/ sjKREC	2,52(1,29)	2,47	3,82(1,4)	3,6	1,26	(0,15;2,3)	**0,02**
	Não Aloimunizado (N=13)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,7(0,24)	3,72	2,79(0,39)	2,82	-23,1	(-31,0;-15,1)	**<0,01**
Cj	4,19(0,2)	4,24	3,94(0,2)	4	-13,2	(-22,8;-3,71)	**<0,01**
Cj/ sjKREC	1,64(0,78)	1,57	3,82(1,4)	3,6	2,15	(1,26;3,05)	**<0,01**
	Aloimunizado (N=7)		**Não Aloimunizado (N=13)**				
sjKREC	3,02(1,06)	3,27	3,7(0,24)	3,72	-13,6	(-23,6;-3,7)	**<0,01**
Cj	3,78(1,1)	4,13	4,19(0,2)	4,24	-11,3	(-23,3;0,6)	0,06
Cj/ sjKREC	2,52(1,29)	2,47	1,64(0,78)	1,57	0,89	(-0,24;2,02)	0,11

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Taxa de divisão celular intratímica das células T foi calculada segundo a seguinte fórmula: n = Log(sjTREC/β-TREC)/Log2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice F – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da frequência total (%) de cada família Vβ em linfócitos T de sangue periférico nos pacientes com anemia falciforme tratados com transfusão crônica (aloimunizados e não aloimunizados) e no grupo controle.

Tabela F.1. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo aloimunizado e o grupo controle.

	Aloimunizado (N=7)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,52(0,48)	0,48	0,76(0,76)	0,51	-0,12	(-0,59;0,35)	0,62
2	9,52(4,4)	11,07	5,57(4,06)	5,95	0,60	(0,13;1,07)	**0,01**
3	9,25(6,72)	8,12	6,18(3,43)	6,28	0,31	(-0,16;0,78)	0,20
4	1,3(1,36)	0,79	1,32(1,76)	0,9	-0,01	(-0,48;0,46)	0,97
5	5,93(3,86)	6,43	7,21(4,36)	7,91	-0,22	(-0,69;0,25)	0,36
6	8,26(4,82)	8,91	12,98(5,1)	12,7	-0,44	(-0,91;0,03)	0,06
7	1,65(1,35)	1,87	2,73(1,59)	2,84	-0,40	(-0,87;0,07)	0,10
8	0,87(1,65)	0,07	1(1,05)	0,55	-0,19	(-0,66;0,28)	0,43
9	1,79(1,06)	1,97	1,96(2,04)	1,6	0,00	(-0,47;0,47)	0,99
10	2,06(1,16)	1,98	2,24(1,17)	1,98	-0,07	(-0,54;0,4)	0,77
11	2,63(1,3)	2,35	2,99(1,83)	2,56	-0,06	(-0,53;0,41)	0,80
12	0,03(0,04)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,23	(-0,7;0,24)	0,34
13	2,79(3,04)	1,66	4,09(1,57)	4,3	-0,58	(-1,05;-0,1)	**0,02**
14	1,34(2,03)	0,13	2,8(2,61)	2,17	-0,52	(-0,99;-0,05)	0,03
15	3,48(3,43)	1,32	4,56(2,49)	5,5	-0,35	(-0,82;0,12)	0,14
16	3,13(2,67)	2,69	6,95(2,95)	6,53	-0,78	(-1,25;-0,31)	**<0,01**
17	2,13(1,03)	1,73	1,98(1,35)	1,63	0,07	(-0,4;0,54)	0,76
18	2,3(2,17)	1,72	2,42(2,02)	1,75	-0,11	(-0,58;0,36)	0,64
19	0,69(1,51)	0,06	0,06(0,09)	0	0,25	(-0,22;0,73)	0,29
20	1,56(1,42)	0,96	1,91(1,59)	1,48	-0,11	(-0,58;0,36)	0,64
21	8,94(4,48)	8,74	9,71(3,1)	9,27	-0,14	(-0,61;0,33)	0,56
22	24,76(12,12)	19,61	17,07(4,64)	18,4	0,29	(-0,18;0,76)	0,23
23	2,95(1,15)	2,99	1,5(0,74)	1,27	0,45	(-0,02;0,92)	0,06
24	2,09(1,28)	2,27	1,71(0,9)	1,67	0,09	(-0,38;0,56)	0,71

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela F.2. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo não aloimunizado e o grupo controle.

	Não Aloimunizado (N=13)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,88(2,08)	0,25	0,76(0,76)	0,51	0,11	(-0,28;0,5)	0,59
2	5,57(4,68)	5,1	5,57(4,06)	5,95	-0,09	(-0,48;0,31)	0,67
3	9,3(3,42)	8,19	6,18(3,43)	6,28	-0,45	(-0,84;-0,06)	**0,02**
4	3,16(6,19)	0,88	1,32(1,76)	0,9	-0,23	(-0,62;0,16)	0,25
5	7,6(3,32)	6,77	7,21(4,36)	7,91	-0,1	(-0,49;0,29)	0,61
6	9,84(4,58)	10,43	12,98(5,1)	12,7	0,28	(-0,12;0,67)	0,17
7	2,23(1,24)	2,08	2,73(1,59)	2,84	0,14	(-0,26;0,53)	0,5
8	1,09(1,41)	0,52	1(1,05)	0,55	0,02	(-0,38;0,41)	0,94
9	1,51(1,15)	1,16	1,96(2,04)	1,6	0,11	(-0,28;0,5)	0,58
10	1,83(0,9)	2,05	2,24(1,17)	1,98	0,14	(-0,25;0,53)	0,49
11	2,16(1,66)	1,81	2,99(1,83)	2,56	0,24	(-0,15;0,64)	0,22
12	0,11(0,15)	0	0,31(0,31)	0,31	0,16	(-0,23;0,55)	0,43
13	5,17(2,09)	4,92	4,09(1,57)	4,3	-0,17	(-0,56;0,23)	0,4
14	3,23(2,63)	3,43	2,8(2,61)	2,17	-0,11	(-0,5;0,28)	0,59
15	4,46(2,74)	4,67	4,56(2,49)	5,5	0,02	(-0,37;0,41)	0,91
16	4,33(2,63)	3,6	6,95(2,95)	6,53	0,45	(0,06;0,84)	**0,03**
17	1,48(1,01)	1,38	1,98(1,35)	1,63	0,18	(-0,21;0,58)	0,35
18	1,25(1,1)	0,92	2,42(2,02)	1,75	0,39	(-0,01;0,78)	0,05
19	0,08(0,1)	0,06	0,06(0,09)	0	-0,01	(-0,4;0,38)	0,97
20	1,69(1,78)	1,5	1,91(1,59)	1,48	0,11	(-0,29;0,5)	0,6
21	9,65(3,38)	9,21	9,71(3,1)	9,27	0,06	(-0,34;0,45)	0,78
22	19,55(7,28)	16,4	17,07(4,64)	18,4	-0,11	(-0,5;0,28)	0,57
23	1,93(1,06)	1,8	1,5(0,74)	1,27	-0,13	(-0,52;0,26)	0,51
24	1,88(1,38)	1,32	1,71(0,9)	1,67	-0,02	(-0,41;0,37)	0,91

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela F.3. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o grupo aloimunizado e o grupo não aloimunizado.

	Aloimunizado (N=7)		**Não Aloimunizado (N=13)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,52(0,48)	0,48	0,88(2,08)	0,25	-0,01	(-0,49;0,47)	0,97
2	9,52(4,4)	11,07	5,57(4,68)	5,1	0,51	(0,04;0,99)	**0,03**
3	9,25(6,72)	8,12	9,3(3,42)	8,19	-0,14	(-0,62;0,34)	0,56
4	1,3(1,36)	0,79	3,16(6,19)	0,88	-0,24	(-0,72;0,24)	0,33
5	5,93(3,86)	6,43	7,6(3,32)	6,77	-0,32	(-0,8;0,15)	0,18
6	8,26(4,82)	8,91	9,84(4,58)	10,43	-0,17	(-0,65;0,31)	0,49
7	1,65(1,35)	1,87	2,23(1,24)	2,08	-0,26	(-0,74;0,21)	0,28
8	0,87(1,65)	0,07	1,09(1,41)	0,52	-0,17	(-0,65;0,3)	0,48
9	1,79(1,06)	1,97	1,51(1,15)	1,16	0,11	(-0,37;0,58)	0,66
10	2,06(1,16)	1,98	1,83(0,9)	2,05	0,07	(-0,41;0,55)	0,78
11	2,63(1,3)	2,35	2,16(1,66)	1,81	0,18	(-0,29;0,66)	0,45
12	0,03(0,04)	0	0,11(0,15)	0	-0,07	(-0,55;0,41)	0,77
13	2,79(3,04)	1,66	5,17(2,09)	4,92	-0,74	(-1,22;-0,27)	**<0,01**
14	1,34(2,03)	0,13	3,23(2,63)	3,43	-0,63	(-1,1;-0,15)	**0,01**
15	3,48(3,43)	1,32	4,46(2,74)	4,67	-0,33	(-0,81;0,15)	0,17
16	3,13(2,67)	2,69	4,33(2,63)	3,6	-0,33	(-0,81;0,14)	0,17
17	2,13(1,03)	1,73	1,48(1,01)	1,38	0,26	(-0,22;0,73)	0,29
18	2,3(2,17)	1,72	1,25(1,1)	0,92	0,27	(-0,21;0,75)	0,26
19	0,69(1,51)	0,06	0,08(0,1)	0,06	0,25	(-0,23;0,72)	0,31
20	1,56(1,42)	0,96	1,69(1,78)	1,5	-0,01	(-0,48;0,47)	0,98
21	8,94(4,48)	8,74	9,65(3,38)	9,21	-0,08	(-0,56;0,4)	0,74
22	24,76(12,12)	19,61	19,55(7,28)	16,4	0,18	(-0,3;0,65)	0,47
23	2,95(1,15)	2,99	1,93(1,06)	1,8	0,31	(-0,16;0,79)	0,20
24	2,09(1,28)	2,27	1,88(1,38)	1,32	0,07	(-0,41;0,54)	0,78

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice G – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da quantificação das moléculas de TREC e β-TREC e razão TREC/β-TREC (taxa de divisão celular intratímica) nos pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas e no grupo controle.

Tabela G.1. Valores e média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas nas comparações entre o período pré-transplante e os períodos pós-transplante.

	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
	Pré-Mob (N=18)		**1 mês (N=19)**				
sjTREC	2,65(0,29)	2,6	2,10(0,58)	2,14	0,56	(0,33;0,78)	**<0,01**
β-TREC	1,27(0,84)	1,56	0,7(0,85)	0,44	0,61	(0,16;1,06)	**<0,01**
sjTREC/ β-TREC	3,73(2,44)	3,3	3,09(3,58)	2,81	0,64	(-1,08;2,36)	0,45
	Pré-Mob (N=18)		**3 meses (N=19)**				
sjTREC	2,65(0,29)	2,6	1,97(0,66)	2,22	0,67	(0,44;0,9)	**<0,01**
β-TREC	1,27(0,84	1,56	0,92(0,93)	1,06	0,4	(-0,06;0,85)	0,08
sjTREC/ β-TREC	3,73(2,44)	3,3	2,77(3,11)	2,23	0,96	(-0,76;2,68)	0,27
	Pré-Mob (N=18)		**6 meses (N=18)**				
sjTREC	2,65(0,29)	2,6	2,26(0,53)	2,23	0,38	(0,15;0,61)	**<0,01**
β-TREC	1,27(0,84	1,56	0,8(1,06)	1,02	0,49	(0,03;0,95)	**0,03**
sjTREC/ β-TREC	3,73(2,44)	3,3	3,54(3,31)	2,99	0,21	(-1,54;1,96)	0,81
	Pré-Mob (N=18)		**1 ano (N=16)**				
sjTREC	2,65(0,29)	2,6	2,71(0,55)	2,93	-0,03	(-0,27;0,21)	0,79
β-TREC	1,27(0,84	1,56	1,65(0,88)	1,67	-0,3	(-0,78;0,18)	0,21
sjTREC/ β-TREC	3,73(2,44)	3,3	2,89(2,16)	3,01	0,92	(-0,89;2,73)	0,31
	Pré-Mob (N=18)		**2 anos (N=12)**				
sjTREC	2,65(0,29)	2,6	2,63(0,3)	2,66	-0,13	(-0,4;0,13)	0,32
β-TREC	1,27(0,84)	1,56	1,32(0,85)	1,71	-0,18	(-0,71;0,34)	0,48
sjTREC/ β-TREC	3,73(2,44)	3,3	3,05(2,11)	3	0,69	(-1,28;2,67)	0,48
	Pré-Mob (N=18)		**>2 anos (N=14)**				
sjTREC	2,65(0,29)	2,6	2,69(0,19)	2,71	-0,18	(-0,52;0,17)	0,30
β-TREC	1,27(0,84)	1,56	1,44(0,56)	1,26	-0,35	(-1;0,31)	0,30
sjTREC/ β-TREC	3,73(2,44)	3,3	3,72(1,68)	3,91	0,08	(-2,3;2,46)	0,94

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança; Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). Taxa de divisão celular intratímica das células T foi calculada segundo a seguinte fórmula: n = Log(sjTREC/β-TREC)/Log2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela G.2. Valores e média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas nas comparações entre o período pré-transplante e os períodos pós-transplante com o grupo controle.

	Media (DP)	Mediana	Media (DP)	Mediana	Diferença Estimada	IC	*P*
	Pré-Mob (N=18)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,65(0,29)	2,6	2,54 (0,32)	2,65	-0,02	(-0,31;0,26)	0,87
β-TREC	1,27(0,84)	1,56	1,39 (0,42)	1,39	-0,25	(-0,79;0,28)	0,34
sjTREC/ β-TREC	3,73(2,44)	3,3	3,82(1,29)	3,95	-0,15	(-2,01;1,71)	0,87
	1 mês (N=19)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,1(0,58)	2,14	2,54 (0,32)	2,65	-0,58	(-0,86;-0,3)	**<0,01**
β-TREC	0,7(0,85)	0,44	1,39 (0,42)	1,39	-0,87	(-1,4;-0,34)	**<0,01**
sjTREC/ β-TREC	3,09(3,58)	2,81	3,82(1,29)	3,95	-0,8	(-2,64;1,05)	0,39
	3 meses (N=19)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	1,97(0,66)	2,22	2,54 (0,32)	2,65	-0,69	(-0,98;-0,41)	**<0,01**
β-TREC	0,92(0,93)	1,06	1,39 (0,42)	1,39	-0,65	(-1,18;-0,12)	**<0,01**
sjTREC/ β-TREC	2,77(3,11)	2,23	3,82(1,29)	3,95	-1,11	(-2,96;0,74)	0,23
	6 meses (N=18)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,26(0,53)	2,23	2,54 (0,32)	2,65	-0,4	(-0,69;-0,12)	**<0,01**
β-TREC	0,8(1,06)	1,02	1,39 (0,42)	1,39	-0,75	(-1,28;-0,21)	**<0,01**
sjTREC/ β-TREC	3,54(3,31)	2,99	3,82(1,29)	3,95	-0,36	(-2,23;1,5)	0,69
	1 ano (N=16)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,71(0,55)	2,93	2,54 (0,32)	2,65	0,01	(-0,29;0,3)	0,95
β-TREC	1,65(0,88)	1,67	1,39 (0,42)	1,39	0,05	(-0,5;0,6)	0,85
sjTREC/ β-TREC	2,89(2,16)	3,01	3,82(1,29)	3,95	-1,07	(-3,01;0,87)	0,27
	2 anos (N=12)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,63(0,3)	2,66	2,54 (0,32)	2,65	0,11	(-0,2;0,42)	0,47
β-TREC	1,32(0,85)	1,71	1,39 (0,42)	1,39	-0,07	(-0,65;0,52)	0,81
sjTREC/ β-TREC	3,05(2,11)	3	3,82(1,29)	3,95	-0,85	(-2,9;1,21)	0,41
	>2 anos (N=14)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjTREC	2,69(0,19)	2,71	2,54 (0,32)	2,65	0,15	(-0,21;0,52)	0,40
β-TREC	1,44(0,56)	1,26	1,39 (0,42)	1,39	0,09	(-0,6;0,78)	0,79
sjTREC/ β-TREC	3,72(1,68)	3,91	3,82(1,29)	3,95	-0,23	(-2,67;2,21)	0,84

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança; Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). Taxa de divisão celular intratímica das células T foi calculada segundo a seguinte fórmula: n = Log(sjTREC/β-TREC)/Log2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice H – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da frequência total (%) de cada família Vβ em linfócitos T de sangue periférico nos pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas entre o período pré-transplante e os períodos pós-transplante.

Tabela H.1. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período pré-transplante e o período D+30 (1 mês pós-transplante).

	Pré-Mob (N=18)		**1 mês (N=19)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,58(7,23)	0,1	0,34(0,76)	0	0,35	(-0,04;0,74)	0,08
2	2,77(2,88)	2,14	1,67(2,17)	0,86	0,31	(-0,08;0,7)	0,12
3	9,3(6,63)	6,58	9,36(5,96)	7,53	-0,04	(-0,43;0,35)	0,85
4	1,44(1,64)	0,81	1,62(3,04)	0,55	0,08	(-0,31;0,47)	0,70
5	8,29(4,23)	6,78	6,55(3,98)	6,32	0,27	(-0,12;0,66)	0,17
6	11,93(3,56)	11,1	11,55(8,57)	10,94	0,21	(-0,18;0,6)	0,29
7	2,39(1,93)	1,9	2,93(2,9)	2,02	-0,06	(-0,45;0,33)	0,77
8	1,09(1,46)	0,07	0,71(1,26)	0	0,17	(-0,22;0,56)	0,40
9	2,79(2,47)	2,51	3,21(2,3)	2,69	-0,15	(-0,54;0,24)	0,44
10	3,17(1,87)	3,06	4,1(2,95)	3,86	-0,11	(-0,5;0,28)	0,57
11	3,57(2,51)	2,98	4,2(2,15)	4,03	-0,17	(-0,56;0,22)	0,39
12	0,08(0,17)	0	0,1(0,22)	0	-0,03	(-0,41;0,36)	0,90
13	3,57(2,84)	4,47	2,71(3,33)	0,24	0,34	(-0,05;0,73)	0,09
14	2,24(2,04)	1,18	2,07(2,64)	0,65	0,15	(-0,24;0,54)	0,46
15	4,67(3,05)	5,08	4,16(3,11)	4,3	0,11	(-0,28;0,5)	0,59
16	4,44(2,95)	3,66	4,24(2,17)	4,56	-0,02	(-0,41;0,37)	0,93
17	2,63(1,55)	2,27	3,28(2,12)	3,27	-0,13	(-0,52;0,26)	0,51
18	3,45(4,48)	1,99	1,9(2,84)	0,43	0,31	(-0,08;0,7)	0,11
19	0,09(0,1)	0,07	0,2(0,53)	0	-0,06	(-0,44;0,33)	0,78
20	1,43(2,75)	0,36	1,53(2,6)	0,06	-0,02	(-0,41;0,37)	0,91
21	9,43(3,72)	8,75	8,4(4,33)	7,93	0,14	(-0,25;0,53)	0,47
22	17,68(8,06)	18,32	16,48(9,34)	13,83	0,07	(-0,32;0,45)	0,74
23	2,62(1,64)	2,23	3,39(2,21)	2,69	-0,17	(-0,56;0,22)	0,40
24	2,9(1,92)	2,74	5,52(8,42)	3,69	-0,29	(-0,67;0,1)	0,15

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela H.2. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período pré-transplante e o período D+90 (3 meses pós-transplante).

	Pré-Mob (N=18)		**3 meses (N=18)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,58(7,23)	0,1	0,42(0,98)	0	0,33	(-0,07;0,72)	0,10
2	2,77(2,88)	2,14	2,51(3,83)	0,68	0,22	(-0,18;0,61)	0,28
3	9,3(6,63)	6,58	8,06(6,17)	6,87	0,15	(-0,24;0,55)	0,45
4	1,44(1,64)	0,81	2,72(5,01)	0,47	-0,06	(-0,45;0,34)	0,77
5	8,29(4,23)	6,78	6,12(2,28)	6,62	0,24	(-0,15;0,64)	0,22
6	11,93(3,56)	11,1	13(9,52)	11,6	0,1	(-0,29;0,49)	0,62
7	2,39(1,93)	1,9	1,11(1,09)	0,84	0,42	(0,03;0,82)	**0,04**
8	1,09(1,46)	0,07	0,74(1,19)	0	0,14	(-0,25;0,54)	0,47
9	2,79(2,47)	2,51	3,34(2,61)	2,64	-0,14	(-0,53;0,26)	0,50
10	3,17(1,87)	3,06	4,45(3,59)	3,32	-0,15	(-0,55;0,24)	0,45
11	3,57(2,51)	2,98	3,96(2,73)	3,25	-0,05	(-0,45;0,34)	0,79
12	0,08(0,17)	0	0,04(0,11)	0	0,03	(-0,37;0,42)	0,90
13	3,57(2,84)	4,47	2,7(3,77)	1,71	0,29	(-0,1;0,69)	0,15
14	2,24(2,04)	1,18	0,56(0,7)	0,38	0,6	(0,21;1)	**<0,01**
15	4,67(3,05)	5,08	5,65(5,99)	4,81	0,02	(-0,37;0,42)	0,91
16	4,44(2,95)	3,66	5,83(3,98)	5,54	-0,2	(-0,59;0,2)	0,33
17	2,63(1,55)	2,27	3,55(2,58)	3,32	-0,14	(-0,53;0,26)	0,50
18	3,45(4,48)	1,99	0,76(1,74)	0	0,69	(0,29;1,08)	**<0,01**
19	0,09(0,1)	0,07	0,04(0,07)	0	0,04	(-0,36;0,43)	0,85
20	1,43(2,75)	0,36	0,81(1,17)	0,05	0,13	(-0,27;0,52)	0,53
21	9,43(3,72)	8,75	8,03(4,75)	7,82	0,24	(-0,15;0,64)	0,23
22	17,68(8,06)	18,32	17,51(15,02)	12,88	0,18	(-0,22;0,57)	0,38
23	2,62(1,64)	2,23	3,98(2,7)	3,41	-0,26	(-0,66;0,13)	0,19
24	2,9(1,92)	2,74	4,08(2,72)	3,3	-0,22	(-0,62;0,17)	0,27

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela H.3. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período pré-transplante e o período D+180 (6 meses pós-transplante).

	Pré-Mob (N=18)		**6 meses (N=16)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,58(7,23)	0,1	1,49(2,48)	0,42	-0,05	(-0,46;0,35)	0,79
2	2,77(2,88)	2,14	2,77(2,55)	2,07	-0,03	(-0,44;0,38)	0,88
3	9,3(6,63)	6,58	6,43(3,33)	6,25	0,29	(-0,12;0,7)	0,16
4	1,44(1,64)	0,81	1,05(1,65)	0,28	0,18	(-0,23;0,59)	0,38
5	8,29(4,23)	6,78	5,96(4,28)	5,1	0,33	(-0,08;0,74)	0,11
6	11,93(3,56)	11,1	13,86(9,4)	13,16	-0,01	(-0,41;0,4)	0,97
7	2,39(1,93)	1,9	1,43(1,31)	1,33	0,29	(-0,11;0,7)	0,16
8	1,09(1,46)	0,07	0,64(1,04)	0	0,16	(-0,24;0,57)	0,43
9	2,79(2,47)	2,51	2,47(2,34)	1,41	0,08	(-0,33;0,48)	0,72
10	3,17(1,87)	3,06	2,61(1,71)	2,42	0,14	(-0,27;0,54)	0,51
11	3,57(2,51)	2,98	3,95(2,93)	4,05	-0,06	(-0,47;0,34)	0,76
12	0,08(0,17)	0	0,18(0,33)	0	-0,08	(-0,49;0,32)	0,69
13	3,57(2,84)	4,47	2,89(2,87)	3,49	0,18	(-0,23;0,58)	0,39
14	2,24(2,04)	1,18	1,28(1,42)	0,66	0,28	(-0,12;0,69)	0,17
15	4,67(3,05)	5,08	3,8(2,06)	3,59	0,06	(-0,34;0,47)	0,76
16	4,44(2,95)	3,66	3,84(3,14)	3,72	0,17	(-0,23;0,58)	0,40
17	2,63(1,55)	2,27	2,76(1,76)	2,67	-0,03	(-0,43;0,38)	0,90
18	3,45(4,48)	1,99	2,9(4,92)	0,51	0,15	(-0,26;0,56)	0,47
19	0,09(0,1)	0,07	0,11(0,26)	0	-0,01	(-0,42;0,39)	0,94
20	1,43(2,75)	0,36	3,37(8,68)	0,56	-0,23	(-0,64;0,17)	0,26
21	9,43(3,72)	8,75	7,44(2,62)	7,51	0,19	(-0,21;0,6)	0,35
22	17,68(8,06)	18,32	20,81(15,26)	15,24	-0,1	(-0,51;0,3)	0,62
23	2,62(1,64)	2,23	2,28(1,67)	1,73	0,09	(-0,31;0,5)	0,65
24	2,9(1,92)	2,74	5,67(9,05)	4,56	-0,3	(-0,7;0,11)	0,15

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela H.4. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período pré-transplante e o período D+360 (1 ano pós-transplante).

	Pré-Mob (N=18)		**1 ano (N=15)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,58(7,23)	0,1	0,67(1,74)	0	0,24	(-0,17;0,66)	0,25
2	2,77(2,88)	2,14	2,72(3,03)	1,55	-0,01	(-0,42;0,41)	0,97
3	9,3(6,63)	6,58	9,34(7,45)	7,45	0,04	(-0,38;0,45)	0,87
4	1,44(1,64)	0,81	2,66(5,01)	1,17	-0,18	(-0,59;0,23)	0,40
5	8,29(4,23)	6,78	4,97(3,05)	5,05	0,49	(0,08;0,9)	**0,02**
6	11,93(3,56)	11,1	11,52(7,77)	8,44	0,11	(-0,3;0,53)	0,59
7	2,39(1,93)	1,9	1,93(2,13)	1,24	0,19	(-0,22;0,61)	0,36
8	1,09(1,46)	0,07	1,59(1,68)	1,34	-0,21	(-0,62;0,21)	0,33
9	2,79(2,47)	2,51	1,71(2)	0,75	0,32	(-0,09;0,74)	0,12
10	3,17(1,87)	3,06	3,65(2,32)	3,59	-0,08	(-0,5;0,33)	0,69
11	3,57(2,51)	2,98	3,8(2,18)	4,49	-0,06	(-0,47;0,35)	0,78
12	0,08(0,17)	0	0,13(0,25)	0	-0,06	(-0,47;0,36)	0,79
13	3,57(2,84)	4,47	2,94(2,68)	3,61	0,13	(-0,28;0,55)	0,53
14	2,24(2,04)	1,18	1,68(1,43)	1,28	0,12	(-0,29;0,53)	0,57
15	4,67(3,05)	5,08	3,75(2,82)	3,66	0,2	(-0,22;0,61)	0,35
16	4,44(2,95)	3,66	7,95(4,95)	7,81	-0,47	(-0,89;-0,06)	**0,03**
17	2,63(1,55)	2,27	2,43(1,73)	2,02	0,07	(-0,34;0,49)	0,72
18	3,45(4,48)	1,99	3,19(3,6)	1,96	-0,04	(-0,46;0,37)	0,84
19	0,09(0,1)	0,07	0,07(0,09)	0,07	0	(-0,41;0,41)	1,00
20	1,43(2,75)	0,36	1,78(2,34)	0,51	-0,18	(-0,6;0,23)	0,38
21	9,43(3,72)	8,75	8,55(2,98)	8,29	0,06	(-0,36;0,47)	0,78
22	17,68(8,06)	18,32	17,64(9,95)	14,96	-0,03	(-0,45;0,38)	0,87
23	2,62(1,64)	2,23	2,98(1,85)	2,98	0,2	(-0,21;0,62)	0,33
24	2,9(1,92)	2,74	2,33(2,06)	1,53	0,24	(-0,17;0,66)	0,25

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela H.5. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período pré-transplante e o período D+720 (2 anos pós-transplante).

	Pré-Mob (N=18)		**2 anos (N=11)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,58(7,23)	0,1	0,09(0,11)	0,05	0,43	(-0,02;0,88)	0,06
2	2,77(2,88)	2,14	4,16(4,31)	3,03	-0,38	(-0,83;0,07)	0,10
3	9,3(6,63)	6,58	8,67(6,79)	6,92	0,01	(-0,45;0,46)	0,97
4	1,44(1,64)	0,81	1,55(1,61)	1,15	-0,11	(-0,56;0,35)	0,65
5	8,29(4,23)	6,78	6,72(2,77)	6,63	0,14	(-0,31;0,6)	0,53
6	11,93(3,56)	11,1	10,64(4,44)	10,86	0,15	(-0,31;0,6)	0,52
7	2,39(1,93)	1,9	2,72(2,48)	1,66	-0,05	(-0,5;0,41)	0,84
8	1,09(1,46)	0,07	1,96(1,93)	1,9	-0,38	(-0,83;0,07)	0,10
9	2,79(2,47)	2,51	2,22(2,75)	0,78	0,19	(-0,26;0,65)	0,40
10	3,17(1,87)	3,06	3,2(2,34)	3,06	0	(-0,46;0,45)	0,99
11	3,57(2,51)	2,98	3,5(2,2)	2,76	-0,06	(-0,51;0,4)	0,80
12	0,08(0,17)	0	0,95(1,67)	0	-0,4	(-0,86;0,05)	0,08
13	3,57(2,84)	4,47	3,68(3,22)	3,22	-0,05	(-0,5;0,41)	0,84
14	2,24(2,04)	1,18	1,98(1,73)	1,11	0	(-0,45;0,46)	0,98
15	4,67(3,05)	5,08	3,71(2,43)	4,09	0,07	(-0,39;0,52)	0,77
16	4,44(2,95)	3,66	5,51(4,27)	5,16	-0,14	(-0,6;0,31)	0,53
17	2,63(1,55)	2,27	2,2(2,09)	1,85	0,17	(-0,28;0,63)	0,46
18	3,45(4,48)	1,99	3,48(3,33)	1,84	-0,18	(-0,63;0,27)	0,44
19	0,09(0,1)	0,07	0,1(0,1)	0,08	-0,05	(-0,51;0,4)	0,82
20	1,43(2,75)	0,36	2,69(2,21)	2,64	-0,58	(-1,03;-0,12)	**0,01**
21	9,43(3,72)	8,75	6,44(3,08)	5,89	0,31	(-0,14;0,77)	0,18
22	17,68(8,06)	18,32	19,84(13,04)	15,56	-0,16	(-0,62;0,29)	0,48
23	2,62(1,64)	2,23	2,51(2,2)	1,65	0,07	(-0,39;0,52)	0,77
24	2,9(1,92)	2,74	1,37(1,47)	0,94	0,47	(0,02;0,92)	**0,04**

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela H.6. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período pré-transplante e os período D+1080, D+1440, D+1800 (acima de 2 anos pós-transplante).

	Pré-Mob (N=18)		**>2 anos (N=16)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,58(7,23)	0,1	0,23(0,24)	0,16	0,33	(-0,15;0,81)	0,18
2	2,77(2,88)	2,14	2,27(1,58)	2,02	-0,07	(-0,56;0,41)	0,77
3	9,3(6,63)	6,58	7,65(4,04)	6,72	0,12	(-0,37;0,6)	0,64
4	1,44(1,64)	0,81	1,55(0,77)	1,23	-0,22	(-0,71;0,26)	0,37
5	8,29(4,23)	6,78	5,32(3,26)	4,99	0,39	(-0,09;0,88)	0,11
6	11,93(3,56)	11,1	11,03(3,44)	10,65	0,04	(-0,45;0,52)	0,87
7	2,39(1,93)	1,9	2,86(1,72)	2,58	-0,24	(-0,72;0,25)	0,34
8	1,09(1,46)	0,07	2,43(1,33)	2,54	-0,66	(-1,15;-0,18)	**0,01**
9	2,79(2,47)	2,51	1,65(1,24)	1,35	0,23	(-0,25;0,72)	0,35
10	3,17(1,87)	3,06	2,83(1,54)	3	0,05	(-0,44;0,53)	0,85
11	3,57(2,51)	2,98	3,15(2,47)	2,49	0,11	(-0,37;0,6)	0,65
12	0,08(0,17)	0	0,11(0,21)	0	-0,06	(-0,55;0,42)	0,80
13	3,57(2,84)	4,47	5,03(2,69)	4,75	-0,52	(-1;-0,03)	**0,04**
14	2,24(2,04)	1,18	2,73(0,95)	2,65	-0,34	(-0,82;0,14)	0,17
15	4,67(3,05)	5,08	4,95(3,08)	3,93	-0,2	(-0,68;0,28)	0,42
16	4,44(2,95)	3,66	7,41(2,5)	7,12	-0,58	(-1,06;-0,09)	**0,02**
17	2,63(1,55)	2,27	1,56(1,22)	0,98	0,32	(-0,17;0,8)	0,20
18	3,45(4,48)	1,99	3,54(2,39)	3,3	-0,39	(-0,87;0,1)	0,12
19	0,09(0,1)	0,07	0,12(0,04)	0,14	-0,06	(-0,55;0,42)	0,80
20	1,43(2,75)	0,36	1,61(0,94)	2,16	-0,36	(-0,84;0,13)	0,15
21	9,43(3,72)	8,75	8,31(2,33)	8,68	0,05	(-0,43;0,53)	0,84
22	17,68(8,06)	18,32	19,9(8,67)	17	-0,23	(-0,71;0,26)	0,36
23	2,62(1,64)	2,23	1,6(0,81)	1,81	0,25	(-0,23;0,73)	0,31
24	2,9(1,92)	2,74	2,3(1,52)	1,49	0,13	(-0,36;0,61)	0,61

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice I – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da frequência total (%) de cada família Vβ em linfócitos T de sangue periférico nos pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas entre o período pré-transplante e os períodos pós-transplante com o grupo controle.

Tabela I.1. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período pré-transplante e o grupo controle.

	Pré-Mob (N=18)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	2,58(7,23)	0,1	0,76(0,76)	0,51	0,05	(-0,38;0,47)	0,82
2	2,77(2,88)	2,14	5,57(4,06)	5,95	-0,56	(-0,99;-0,14)	**0,01**
3	9,3(6,63)	6,58	6,18(3,43)	6,28	0,34	(-0,08;0,77)	0,11
4	1,44(1,64)	0,81	1,32(1,76)	0,9	-0,03	(-0,46;0,39)	0,88
5	8,29(4,23)	6,78	7,21(4,36)	7,91	0,19	(-0,24;0,61)	0,39
6	11,93(3,56)	11,1	12,98(5,1)	12,72	0,01	(-0,42;0,43)	0,97
7	2,39(1,93)	1,9	2,73(1,59)	2,84	-0,19	(-0,61;0,24)	0,38
8	1,09(1,46)	0,07	1(1,05)	0,55	-0,07	(-0,49;0,36)	0,76
9	2,79(2,47)	2,51	1,96(2,04)	1,6	0,18	(-0,25;0,6)	0,41
10	3,17(1,87)	3,06	2,24(1,17)	1,98	0,2	(-0,23;0,62)	0,36
11	3,57(2,51)	2,98	2,99(1,83)	2,56	0,1	(-0,32;0,53)	0,63
12	0,08(0,17)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,2	(-0,62;0,23)	0,36
13	3,57(2,84)	4,47	4,09(1,57)	4,3	-0,38	(-0,8;0,05)	0,08
14	2,24(2,04)	1,18	2,8(2,61)	2,17	-0,12	(-0,54;0,3)	0,58
15	4,67(3,05)	5,08	4,56(2,49)	5,5	-0,04	(-0,47;0,38)	0,84
16	4,44(2,95)	3,66	6,95(2,95)	6,53	-0,48	(-0,9;-0,05)	**0,03**
17	2,63(1,55)	2,27	1,98(1,35)	1,63	0,17	(-0,25;0,6)	0,42
18	3,45(4,48)	1,99	2,42(2,02)	1,75	-0,06	(-0,49;0,36)	0,78
19	0,09(0,1)	0,07	0,06(0,09)	0	0,01	(-0,42;0,43)	0,97
20	1,43(2,75)	0,36	1,91(1,59)	1,48	-0,37	(-0,8;0,05)	0,09
21	9,43(3,72)	8,75	9,71(3,1)	9,27	-0,07	(-0,49;0,35)	0,75
22	17,68(8,06)	18,32	17,07(4,64)	18,49	-0,08	(-0,51;0,34)	0,70
23	2,62(1,64)	2,23	1,5(0,74)	1,27	0,3	(-0,13;0,72)	0,17
24	2,9(1,92)	2,74	1,71(0,9)	1,67	0,3	(-0,13;0,72)	0,17

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela I.2. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período D+30 (1 mês pós-transplante) e o grupo controle.

	1 mês (N=19)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,34(0,76)	0	0,76(0,76)	0,51	-0,3	(-0,72;0,12)	0,16
2	1,67(2,17)	0,86	5,57(4,06)	5,95	-0,87	(-1,29;-0,45)	**<0,01**
3	9,36(5,96)	7,53	6,18(3,43)	6,28	0,38	(-0,04;0,8)	0,07
4	1,62(3,04)	0,55	1,32(1,76)	0,9	-0,11	(-0,53;0,31)	0,61
5	6,55(3,98)	6,32	7,21(4,36)	7,91	-0,08	(-0,5;0,34)	0,70
6	11,55(8,57)	10,94	12,98(5,1)	12,72	-0,2	(-0,62;0,22)	0,35
7	2,93(2,9)	2,02	2,73(1,59)	2,84	-0,13	(-0,55;0,29)	0,54
8	0,71(1,26)	0	1(1,05)	0,55	-0,23	(-0,65;0,19)	0,28
9	3,21(2,3)	2,69	1,96(2,04)	1,6	0,33	(-0,09;0,75)	0,12
10	4,1(2,95)	3,86	2,24(1,17)	1,98	0,31	(-0,11;0,73)	0,15
11	4,2(2,15)	4,03	2,99(1,83)	2,56	0,28	(-0,14;0,69)	0,20
12	0,1(0,22)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,17	(-0,59;0,25)	0,42
13	2,71(3,33)	0,24	4,09(1,57)	4,3	-0,71	(-1,13;-0,29)	**<0,01**
14	2,07(2,64)	0,65	2,8(2,61)	2,17	-0,27	(-0,69;0,15)	0,21
15	4,16(3,11)	4,3	4,56(2,49)	5,5	-0,15	(-0,57;0,27)	0,48
16	4,24(2,17)	4,56	6,95(2,95)	6,53	-0,46	(-0,88;-0,04)	**0,03**
17	3,28(2,12)	3,27	1,98(1,35)	1,63	0,3	(-0,12;0,72)	0,16
18	1,9(2,84)	0,43	2,42(2,02)	1,75	-0,37	(-0,79;0,04)	0,08
19	0,2(0,53)	0	0,06(0,09)	0	0,06	(-0,36;0,48)	0,77
20	1,53(2,6)	0,06	1,91(1,59)	1,48	-0,35	(-0,77;0,07)	0,10
21	8,4(4,33)	7,93	9,71(3,1)	9,27	-0,21	(-0,63;0,21)	0,32
22	16,48(9,34)	13,83	17,07(4,64)	18,49	-0,15	(-0,57;0,27)	0,48
23	3,39(2,21)	2,69	1,5(0,74)	1,27	0,46	(0,04;0,88)	**0,03**
24	5,52(8,42)	3,69	1,71(0,9)	1,67	0,58	(0,16;1)	**0,01**

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela I.3. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período D+90 (3 meses pós-transplante) e o grupo controle.

	3 meses (N=18)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,42(0,98)	0	0,76(0,76)	0,51	-0,28	(-0,7;0,14)	0,20
2	2,51(3,83)	0,68	5,57(4,06)	5,95	-0,78	(-1,21;-0,36)	**<0,01**
3	8,06(6,17)	6,87	6,18(3,43)	6,28	0,19	(-0,23;0,62)	0,38
4	2,72(5,01)	0,47	1,32(1,76)	0,9	0,02	(-0,4;0,45)	0,91
5	6,12(2,28)	6,62	7,21(4,36)	7,91	-0,06	(-0,48;0,37)	0,79
6	13(9,52)	11,6	12,98(5,1)	12,72	-0,09	(-0,52;0,33)	0,67
7	1,11(1,09)	0,84	2,73(1,59)	2,84	-0,61	(-1,04;-0,19)	**<0,01**
8	0,74(1,19)	0	1(1,05)	0,55	-0,21	(-0,63;0,21)	0,33
9	3,34(2,61)	2,64	1,96(2,04)	1,6	0,32	(-0,11;0,74)	0,15
10	4,45(3,59)	3,32	2,24(1,17)	1,98	0,35	(-0,08;0,77)	0,11
11	3,96(2,73)	3,25	2,99(1,83)	2,56	0,16	(-0,27;0,58)	0,47
12	0,04(0,11)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,22	(-0,65;0,2)	0,30
13	2,7(3,77)	1,71	4,09(1,57)	4,3	-0,67	(-1,09;-0,24)	**<0,01**
14	0,56(0,7)	0,38	2,8(2,61)	2,17	-0,72	(-1,15;-0,3)	**<0,01**
15	5,65(5,99)	4,81	4,56(2,49)	5,5	-0,07	(-0,49;0,36)	0,76
16	5,83(3,98)	5,54	6,95(2,95)	6,53	-0,28	(-0,7;0,15)	0,20
17	3,55(2,58)	3,32	1,98(1,35)	1,63	0,31	(-0,11;0,73)	0,15
18	0,76(1,74)	0	2,42(2,02)	1,75	-0,75	(-1,17;-0,33)	**<0,01**
19	0,04(0,07)	0	0,06(0,09)	0	-0,03	(-0,45;0,39)	0,89
20	0,81(1,17)	0,05	1,91(1,59)	1,48	-0,5	(-0,92;-0,07)	**0,02**
21	8,03(4,75)	7,82	9,71(3,1)	9,27	-0,31	(-0,74;0,11)	0,15
22	17,51(15,02)	12,88	17,07(4,64)	18,49	-0,26	(-0,69;0,16)	0,23
23	3,98(2,7)	3,41	1,5(0,74)	1,27	0,56	(0,14;0,98)	**0,01**
24	4,08(2,72)	3,3	1,71(0,9)	1,67	0,52	(0,1;0,94)	**0,02**

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela I.4. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período D+180 (6 mês pós-transplante) e o grupo controle.

	6 meses (N=16)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	1,49(2,48)	0,42	0,76(0,76)	0,51	0,1	(-0,33;0,54)	0,64
2	2,77(2,55)	2,07	5,57(4,06)	5,95	-0,53	(-0,97;-0,1)	**0,02**
3	6,43(3,33)	6,25	6,18(3,43)	6,28	0,05	(-0,38;0,49)	0,81
4	1,05(1,65)	0,28	1,32(1,76)	0,9	-0,21	(-0,65;0,22)	0,34
5	5,96(4,28)	5,1	7,21(4,36)	7,91	-0,14	(-0,58;0,29)	0,52
6	13,86(9,4)	13,16	12,98(5,1)	12,72	0,02	(-0,42;0,45)	0,94
7	1,43(1,31)	1,33	2,73(1,59)	2,84	-0,48	(-0,92;-0,05)	**0,03**
8	0,64(1,04)	0	1(1,05)	0,55	-0,23	(-0,67;0,21)	0,30
9	2,47(2,34)	1,41	1,96(2,04)	1,6	0,1	(-0,33;0,54)	0,64
10	2,61(1,71)	2,42	2,24(1,17)	1,98	0,06	(-0,37;0,5)	0,78
11	3,95(2,93)	4,05	2,99(1,83)	2,56	0,17	(-0,27;0,6)	0,45
12	0,18(0,33)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,11	(-0,55;0,32)	0,61
13	2,89(2,87)	3,49	4,09(1,57)	4,3	-0,55	(-0,99;-0,12)	**0,01**
14	1,28(1,42)	0,66	2,8(2,61)	2,17	-0,41	(-0,84;0,03)	0,07
15	3,8(2,06)	3,59	4,56(2,49)	5,5	-0,11	(-0,54;0,33)	0,62
16	3,84(3,14)	3,72	6,95(2,95)	6,53	-0,65	(-1,08;-0,21)	**<0,01**
17	2,76(1,76)	2,67	1,98(1,35)	1,63	0,2	(-0,23;0,64)	0,36
18	2,9(4,92)	0,51	2,42(2,02)	1,75	-0,21	(-0,65;0,23)	0,34
19	0,11(0,26)	0	0,06(0,09)	0	0,02	(-0,41;0,46)	0,92
20	3,37(8,68)	0,56	1,91(1,59)	1,48	-0,14	(-0,57;0,3)	0,54
21	7,44(2,62)	7,51	9,71(3,1)	9,27	-0,26	(-0,7;0,17)	0,24
22	20,81(15,26)	15,24	17,07(4,64)	18,49	0,02	(-0,42;0,45)	0,93
23	2,28(1,67)	1,73	1,5(0,74)	1,27	0,2	(-0,23;0,64)	0,36
24	5,67(9,05)	4,56	1,71(0,9)	1,67	0,59	(0,16;1,03)	**0,01**

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela I.5. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período D+360 (1 ano pós-transplante) e o grupo controle.

	1 ano (N=15)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,67(1,74)	0	0,76(0,76)	0,51	-0,2	(-0,64;0,25)	0,39
2	2,72(3,03)	1,55	5,57(4,06)	5,95	-0,56	(-1;-0,11)	**0,01**
3	9,34(7,45)	7,45	6,18(3,43)	6,28	0,31	(-0,13;0,75)	0,17
4	2,66(5,01)	1,17	1,32(1,76)	0,9	0,15	(-0,3;0,59)	0,52
5	4,97(3,05)	5,05	7,21(4,36)	7,91	-0,3	(-0,75;0,14)	0,18
6	11,52(7,77)	8,44	12,98(5,1)	12,72	-0,11	(-0,55;0,34)	0,64
7	1,93(2,13)	1,24	2,73(1,59)	2,84	-0,38	(-0,82;0,06)	0,09
8	1,59(1,68)	1,34	1(1,05)	0,55	0,14	(-0,3;0,58)	0,53
9	1,71(2)	0,75	1,96(2,04)	1,6	-0,15	(-0,59;0,3)	0,52
10	3,65(2,32)	3,59	2,24(1,17)	1,98	0,28	(-0,16;0,72)	0,21
11	3,8(2,18)	4,49	2,99(1,83)	2,56	0,16	(-0,28;0,61)	0,47
12	0,13(0,25)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,14	(-0,58;0,3)	0,54
13	2,94(2,68)	3,61	4,09(1,57)	4,3	-0,51	(-0,95;-0,07)	**0,02**
14	1,68(1,43)	1,28	2,8(2,61)	2,17	-0,24	(-0,68;0,2)	0,29
15	3,75(2,82)	3,66	4,56(2,49)	5,5	-0,24	(-0,68;0,2)	0,29
16	7,95(4,95)	7,81	6,95(2,95)	6,53	0	(-0,45;0,44)	0,99
17	2,43(1,73)	2,02	1,98(1,35)	1,63	0,1	(-0,34;0,54)	0,66
18	3,19(3,6)	1,96	2,42(2,02)	1,75	-0,02	(-0,46;0,42)	0,93
19	0,07(0,09)	0,07	0,06(0,09)	0	0,01	(-0,44;0,45)	0,98
20	1,78(2,34)	0,51	1,91(1,59)	1,48	-0,19	(-0,63;0,26)	0,41
21	8,55(2,98)	8,29	9,71(3,1)	9,27	-0,13	(-0,57;0,31)	0,57
22	17,64(9,95)	14,96	17,07(4,64)	18,49	-0,05	(-0,49;0,39)	0,82
23	2,98(1,85)	2,98	1,5(0,74)	1,27	0,39	(-0,05;0,84)	0,08
24	2,33(2,06)	1,53	1,71(0,9)	1,67	0,09	(-0,35;0,54)	0,68

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela I.6. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre o período D+720 (2 anos pós-transplante) e o grupo controle.

	2 anos (N=11)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,09(0,11)	0,05	0,76(0,76)	0,51	-0,38	(-0,86;0,1)	0,12
2	4,16(4,31)	3,03	5,57(4,06)	5,95	-0,19	(-0,67;0,29)	0,45
3	8,67(6,79)	6,92	6,18(3,43)	6,28	0,34	(-0,14;0,81)	0,17
4	1,55(1,61)	1,15	1,32(1,76)	0,9	0,07	(-0,41;0,55)	0,76
5	6,72(2,77)	6,63	7,21(4,36)	7,91	0,04	(-0,44;0,52)	0,86
6	10,64(4,44)	10,86	12,98(5,1)	12,72	-0,14	(-0,62;0,34)	0,57
7	2,72(2,48)	1,66	2,73(1,59)	2,84	-0,14	(-0,62;0,34)	0,56
8	1,96(1,93)	1,9	1(1,05)	0,55	0,31	(-0,17;0,79)	0,20
9	2,22(2,75)	0,78	1,96(2,04)	1,6	-0,02	(-0,49;0,46)	0,95
10	3,2(2,34)	3,06	2,24(1,17)	1,98	0,2	(-0,28;0,68)	0,41
11	3,5(2,2)	2,76	2,99(1,83)	2,56	0,16	(-0,32;0,64)	0,51
12	0,95(1,67)	0	0,31(0,31)	0,31	0,21	(-0,27;0,68)	0,40
13	3,68(3,22)	3,22	4,09(1,57)	4,3	-0,33	(-0,81;0,15)	0,18
14	1,98(1,73)	1,11	2,8(2,61)	2,17	-0,12	(-0,6;0,35)	0,61
15	3,71(2,43)	4,09	4,56(2,49)	5,5	-0,11	(-0,59;0,37)	0,65
16	5,51(4,27)	5,16	6,95(2,95)	6,53	-0,33	(-0,81;0,15)	0,18
17	2,2(2,09)	1,85	1,98(1,35)	1,63	0	(-0,48;0,48)	0,99
18	3,48(3,33)	1,84	2,42(2,02)	1,75	0,12	(-0,36;0,6)	0,63
19	0,1(0,1)	0,08	0,06(0,09)	0	0,06	(-0,42;0,54)	0,81
20	2,69(2,21)	2,64	1,91(1,59)	1,48	0,21	(-0,27;0,68)	0,40
21	6,44(3,08)	5,89	9,71(3,1)	9,27	-0,38	(-0,86;0,1)	0,12
22	19,84(13,04)	15,56	17,07(4,64)	18,49	0,08	(-0,4;0,56)	0,75
23	2,51(2,2)	1,65	1,5(0,74)	1,27	0,23	(-0,25;0,71)	0,35
24	1,37(1,47)	0,94	1,71(0,9)	1,67	-0,17	(-0,65;0,31)	0,48

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela I.7. Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas na comparação entre os períodos D+1080, D+1440, D+1800 (acima de 2 anos pós-transplante) e o grupo controle.

	>2 anos (N=16)		**Grupo Controle (N=14)**				
	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
1	0,23(0,24)	0,16	0,76(0,76)	0,51	-0,28	(-0,79;0,23)	0,28
2	2,27(1,58)	2,02	5,57(4,06)	5,95	-0,49	(-1;0,02)	0,06
3	7,65(4,04)	6,72	6,18(3,43)	6,28	0,23	(-0,28;0,73)	0,38
4	1,55(0,77)	1,23	1,32(1,76)	0,9	0,19	(-0,32;0,7)	0,46
5	5,32(3,26)	4,99	7,21(4,36)	7,91	-0,21	(-0,71;0,3)	0,43
6	11,03(3,44)	10,65	12,98(5,1)	12,72	-0,03	(-0,54;0,48)	0,91
7	2,86(1,72)	2,58	2,73(1,59)	2,84	0,05	(-0,46;0,56)	0,85
8	2,43(1,33)	2,54	1(1,05)	0,55	0,6	(0,09;1,11)	**0,02**
9	1,65(1,24)	1,35	1,96(2,04)	1,6	-0,05	(-0,56;0,45)	0,84
10	2,83(1,54)	3	2,24(1,17)	1,98	0,15	(-0,36;0,66)	0,56
11	3,15(2,47)	2,49	2,99(1,83)	2,56	-0,01	(-0,52;0,5)	0,97
12	0,11(0,21)	0	0,31(0,31)	0,31	-0,14	(-0,64;0,37)	0,60
13	5,03(2,69)	4,75	4,09(1,57)	4,3	0,14	(-0,37;0,65)	0,59
14	2,73(0,95)	2,65	2,8(2,61)	2,17	0,22	(-0,29;0,73)	0,40
15	4,95(3,08)	3,93	4,56(2,49)	5,5	0,15	(-0,35;0,66)	0,55
16	7,41(2,5)	7,12	6,95(2,95)	6,53	0,1	(-0,41;0,61)	0,70
17	1,56(1,22)	0,98	1,98(1,35)	1,63	-0,14	(-0,65;0,36)	0,58
18	3,54(2,39)	3,3	2,42(2,02)	1,75	0,33	(-0,18;0,83)	0,21
19	0,12(0,04)	0,14	0,06(0,09)	0	0,07	(-0,44;0,58)	0,79
20	1,61(0,94)	2,16	1,91(1,59)	1,48	-0,02	(-0,52;0,49)	0,95
21	8,31(2,33)	8,68	9,71(3,1)	9,27	-0,12	(-0,63;0,39)	0,64
22	19,9(8,67)	17	17,07(4,64)	18,49	0,14	(-0,37;0,65)	0,58
23	1,6(0,81)	1,81	1,5(0,74)	1,27	0,05	(-0,46;0,55)	0,86
24	2,3(1,52)	1,49	1,71(0,9)	1,67	0,17	(-0,34;0,68)	0,51

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança. Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). São mostrados os valores da frequência (%) calculados segundo a seguinte fórmula: % Vβ total = (Σ área todos picos Vβ/ Σ área todos Vβ) x100. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice J – Valores de média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** da quantificação das moléculas de KREC e Cj e razão Cj/KREC (taxa de divisão celular periférica) nos pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células tronco hematopoéticas e no grupo controle.

Tabela J.1. Valores e média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas nas comparações entre o período pré-transplante e os períodos pós-transplante.

	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
	Pré-Mob (N=18)		**1 mês (N=19)**				
sjKREC	3,53(0,76)	3,66	2,26(1,01)	2,5	26,64	(17,7;35,6)	**<0,01**
Cj	3,97(0,7)	4,04	2,97(0,93)	3,17	34,93	(26,7;43,1)	**<0,01**
Cj/ sjKREC	1,47(0,89)	1,57	2,16(1,35)	2,06	-0,66	(-1,31;0)	**0,04**
	Pré-Mob (N=18)		**3 meses (N=19)**				
sjKREC	3,53(0,76)	3,66	3,35(0,64)	3,42	6,01	(-3;15)	0,18
Cj	3,97(0,7)	4,04	3,67(0,56)	3,78	14,91	(6,7;23,2)	**<0,01**
Cj/ sjKREC	1,47(0,89)	1,57	1,06(1,06)	0,74	0,44	(-0,21;1,1)	0,18
	Pré-Mob (N=18)		**6 meses (N=18)**				
sjKREC	3,53(0,76)	3,66	3,59(0,44)	3,4	-0,21	(-9,3;8,9)	0,96
Cj	3,97(0,7)	4,04	3,9(0,26)	3,88	9,07	(0,7;17,5)	**0,03**
Cj/ sjKREC	1,47(0,89)	1,57	1,01(0,8)	1,08	0,49	(-0,18;1,15)	0,14
	Pré-Mob (N=18)		**1 ano (N=16)**				
sjKREC	3,53(0,76)	3,66	3,6(0,44)	3,72	0,16	(-9,3;9,7)	0,97
Cj	3,97(0,7)	4,04	4(0,21)	3,96	5,59	(-3,2;14,3)	0,20
Cj/ sjKREC	1,47(0,89)	1,57	1,31(0,89)	1,05	0,2	(-0,49;0,9)	0,55
	Pré-Mob (N=18)		**2 anos (N=12)**				
sjKREC	3,53(0,76)	3,66	3,49(0,36)	3,64	4,58	(-5,9;15)	0,38
Cj	3,97(0,7)	4,04	4,06(0,25)	4,12	-0,77	(-10,5;8,9)	0,87
Cj/ sjKREC	1,47(0,89)	1,57	1,9(0,73)	1,69	-0,48	(-1,24;0,28)	0,21
	Pré-Mob (N=18)		**>2 anos (N=16)**				
sjKREC	3,53(0,76)	3,66	3,57(0,3)	3,47	1,99	(-10,9;14,9)	0,76
Cj	3,97(0,7)	4,04	4,17(0,18)	4,15	-6,68	(-18,9;5,5)	0,27
Cj/ sjKREC	1,47(0,89)	1,57	2(0,83)	1,57	-0,53	(-1,45;0,39)	0,25

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança; Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). Taxa de divisão celular periférica das células B foi calculada segundo a seguinte fórmula: n= Log(Cj/sjKREC)/Log2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Tabela J.2. Valores e média, desvio padrão, mediana, diferença estimada, intervalo de confiança e valores de ***p*** encontrados nas análises estatísticas nas comparações entre o período pré-transplante e os períodos pós-transplante com o grupo controle.

	Media (DP)	**Mediana**	**Media (DP)**	**Mediana**	**Diferença Estimada**	**IC**	***P***
	Pré-Mob (N=18)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,53(0,76)	3,66	2,79(0,39)	2,82	21	(10,7;31,3)	**<0,01**
Cj	3,97(0,7)	4,04	3,94(0,2)	4	5,65	(-4,3;15,6)	0,26
Cj/ sjKREC	1,47(0,89)	1,57	3,82(1,4)	3,6	-2,33	(-3,05;-1,6)	**<0,01**
	1 mês (N=19)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	2,26(1,01)	2,5	2,79(0,39)	2,82	-5,64	(-15,9;4,6)	0,27
Cj	2,97(0,93)	3,17	3,94(0,2)	4	-29,28	(-39,2;-19,4)	**<0,01**
Cj/ sjKREC	2,16(1,35)	2,06	3,82(1,4)	3,6	-1,67	(-2,39;-0,95)	**<0,01**
	3 meses (N=19)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,35(0,64)	3,42	2,79(0,39)	2,82	14,99	(4,7;25,2)	**<0,01**
Cj	3,67(0,56)	3,78	3,94(0,2)	4	-9,27	(-19,2;0,6)	0,06
Cj/ sjKREC	1,06(1,06)	0,74	3,82(1,4)	3,6	-2,77	(-3,49;-2,05)	**<0,01**
	6 meses (N=18)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,59(0,44)	3,4	2,79(0,39)	2,82	21,21	(10,9;31,6)	**<0,01**
Cj	3,9(0,26)	3,88	3,94(0,2)	4	-3,42	(-13,4;6,6)	0,49
Cj/ sjKREC	1,01(0,8)	1,08	3,82(1,4)	3,6	-2,8	(-3,54;-2,09)	**<0,01**
	1 ano (N=16)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,6(0,44)	3,72	2,79(0,39)	2,82	20,83	(10,1;31,5)	**<0,01**
Cj	4(0,21)	3,96	3,94(0,2)	4	0,06	(-10,3;10,4)	0,99
Cj/ sjKREC	1,31(0,89)	1,05	3,82(1,4)	3,6	-2,53	(-3,29;-1,78)	**<0,01**
	2 anos (N=12)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,49(0,36)	3,64	2,79(0,39)	2,82	16,42	(5,1;27,8)	**<0,01**
Cj	4,06(0,25)	4,12	3,94(0,2)	4	6,42	(-4,5;17,3)	0,24
Cj/ sjKREC	1,9(0,73)	1,69	3,82(1,4)	3,6	-1,85	(-2,65;-1,05)	**<0,01**
	>2 anos (N=16)		**Grupo Controle (N=16)**				
sjKREC	3,57(0,3)	3,47	2,79(0,39)	2,82	19,01	(5,6;32,5)	**<0,01**
Cj	4,17(0,18)	4,15	3,94(0,2)	4	12,33	(-0,6;25,2)	**0,04**
Cj/ sjKREC	2(0,83)	1,57	3,82(1,4)	3,6	-1,8	(-2,75;-0,85)	**<0,01**

DP, Desvio Padrão; IC, Intervalo de confiança; Pré-Mob, pré-mobilização (pré-transplante). Taxa de divisão celular periférica das células B foi calculada segundo a seguinte fórmula: n= Log(Cj/sjKREC)/Log2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Apêndice K – Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um indivíduo controle saudável.

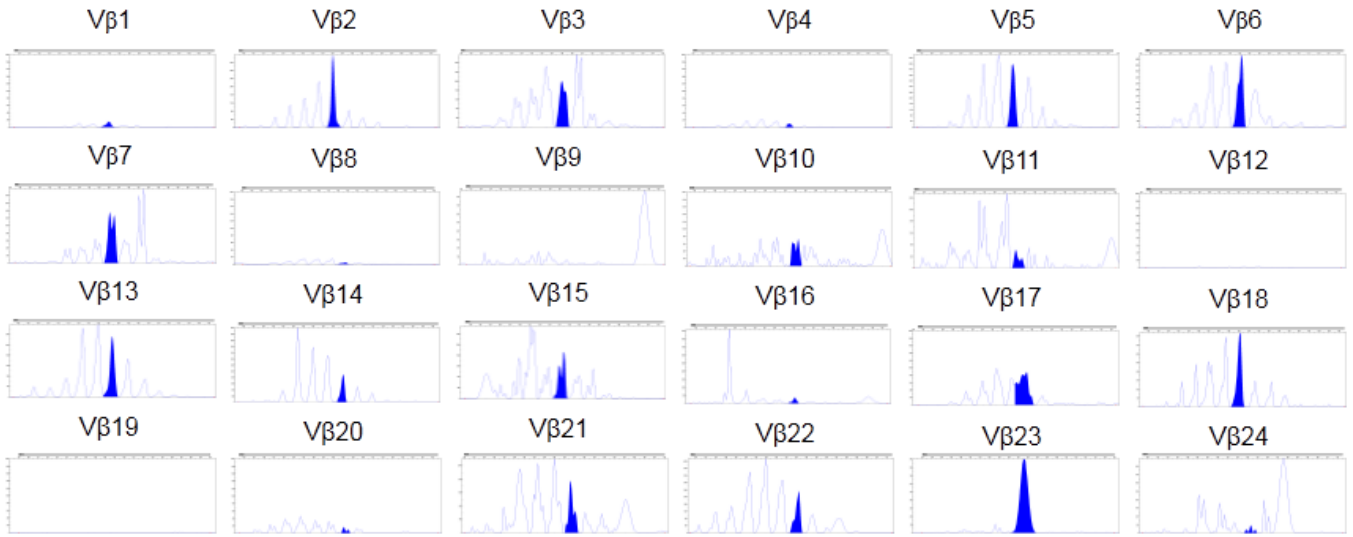


Figura K.1. Repertório da cadeia Vβ do TCR de um indivíduo saudável. Representação esquemática do perfil de espectros de CDR3 de cada uma das 24 famílias Vβ. O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, transcrito em cDNA e amplificado para *primers* específicos para 24 famílias Vβ, e o repertório Vβ do TCR de cada paciente foi analisado pelo método de *TCRBV CDR3 spectratyping*. Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.

Apêndice L – Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com anemia falciforme tratado com Hidroxiuréia.

Figura L.1. Repertório da cadeia Vβ do TCR de um paciente com anemia falciforme em tratamento com Hidroxiuréia. Representação esquemática do perfil de espectros de CDR3 de cada uma das 24 famílias Vβ. O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, transcrito em cDNA e amplificado para *primers* específicos para 24 famílias Vβ, e o repertório Vβ do TCR de cada paciente foi analisado pelo método de *TCRBV CDR3 spectratyping*. Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.

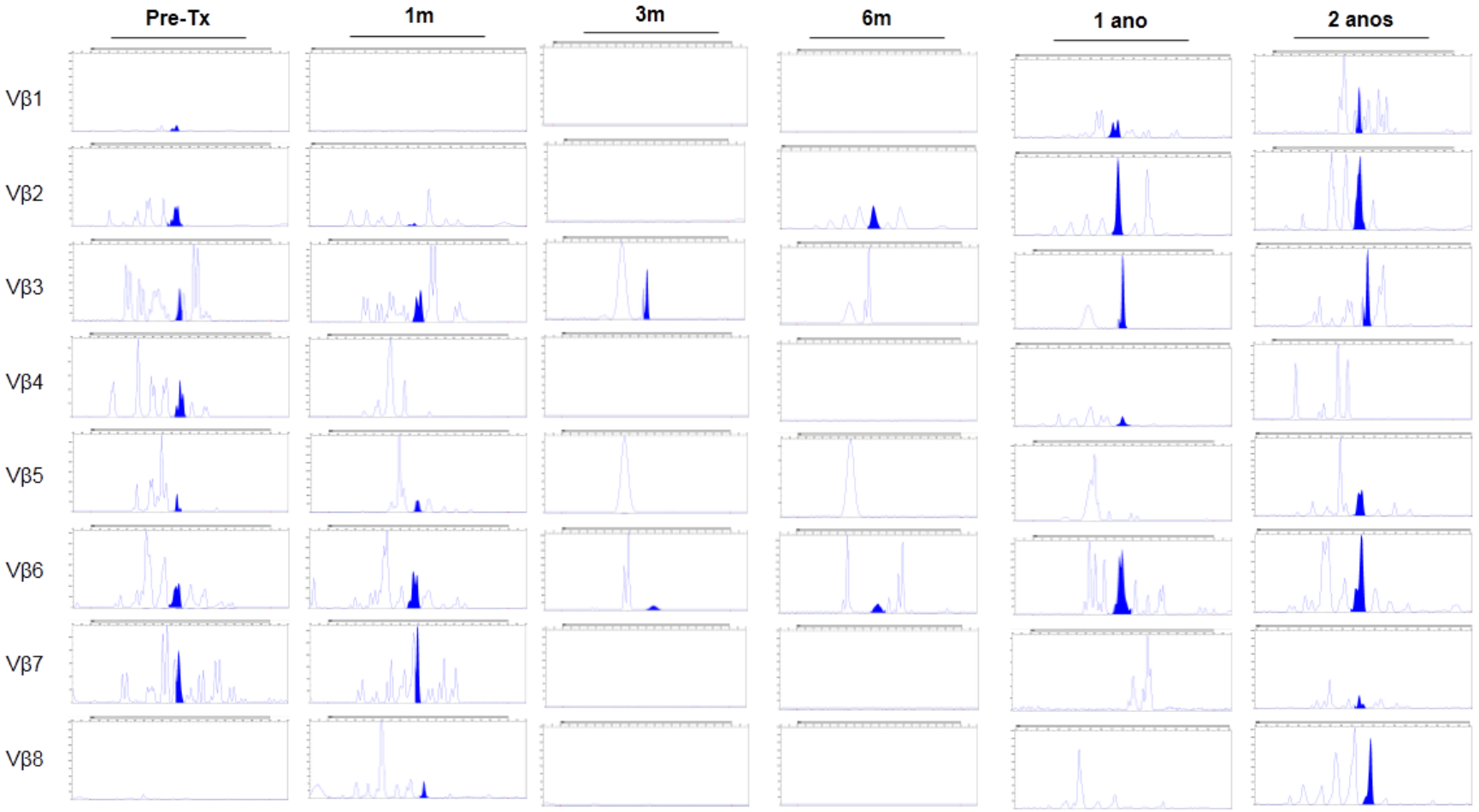
Apêndice M – Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com anemia falciforme tratado com transfusões crônicas.

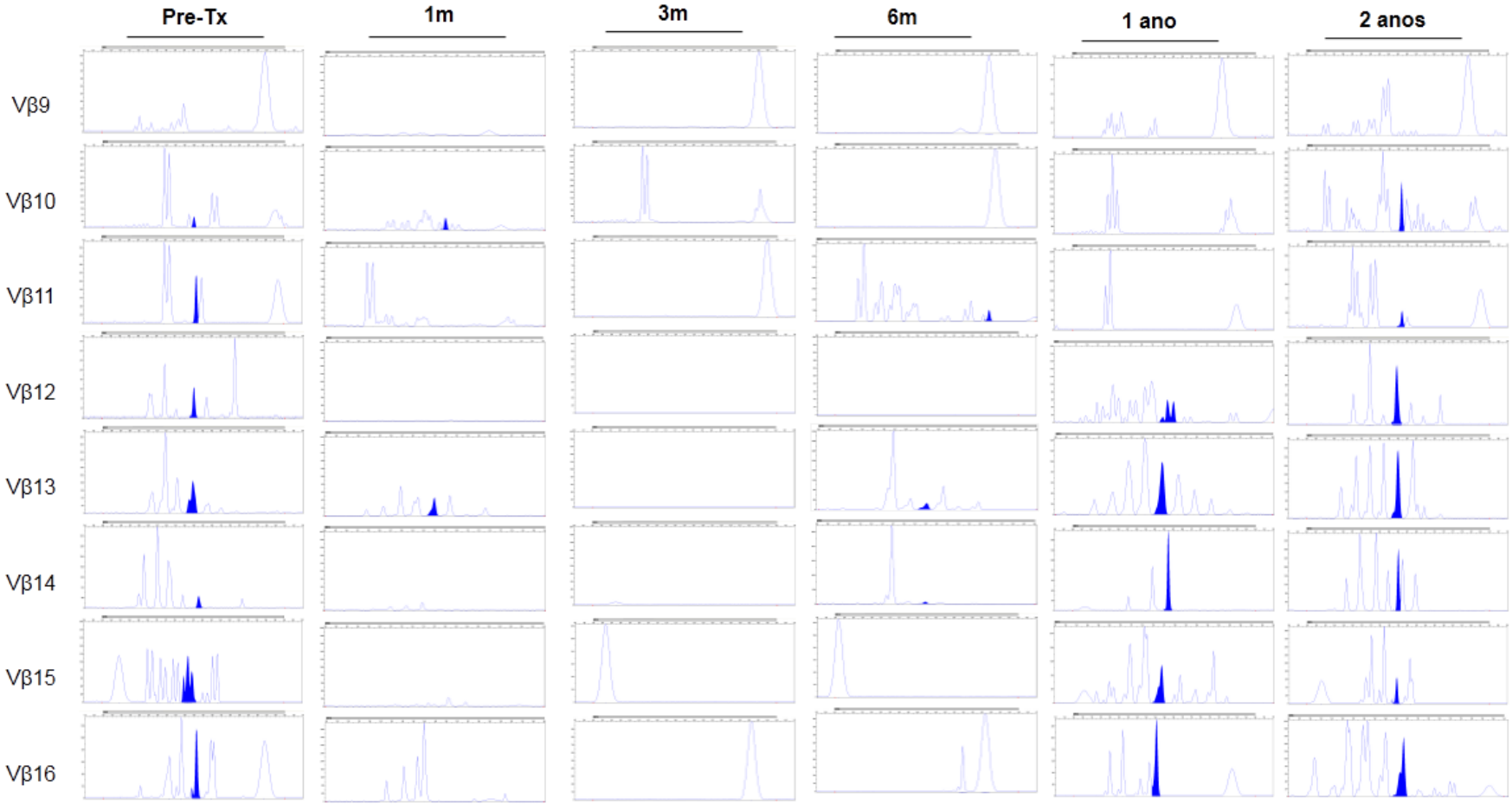
Figura M.1. Repertório da cadeia Vβ do TCR de um paciente com anemia falciforme em tratamento com Transfusão Crônica. Representação esquemática do perfil de espectros de CDR3 de cada uma das 24 famílias Vβ. O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, transcrito em cDNA e amplificado para *primers* específicos para 24 famílias Vβ, e o repertório Vβ do TCR de cada paciente foi analisado pelo método de *TCRBV CDR3 spectratyping*. Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.

Apêndice N – Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com anemia falciforme sem tratamento.

Figura N.1. Repertório da cadeia Vβ do TCR de um paciente com anemia falciforme sem tratamento. Representação esquemática do perfil de espectros de CDR3 de cada uma das 24 famílias Vβ. O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, transcrito em cDNA e amplificado para *primers* específicos para 24 famílias Vβ, e o repertório Vβ do TCR de cada paciente foi analisado pelo método de *TCRBV CDR3 spectratyping*. Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.

Apêndice O – Repertório da cadeia Vβ do TCR de linfócitos T no sangue periférico de um paciente com doença falciforme pré e pós transplante alogênico de células tronco hematopoéticas.




Pre-Tx
1m
3m
6m
1 ano
2 anos
Vβ9
Vβ10
Vβ11
Vβ12
Vβ13
Vβ14
Vβ15
Vβ16

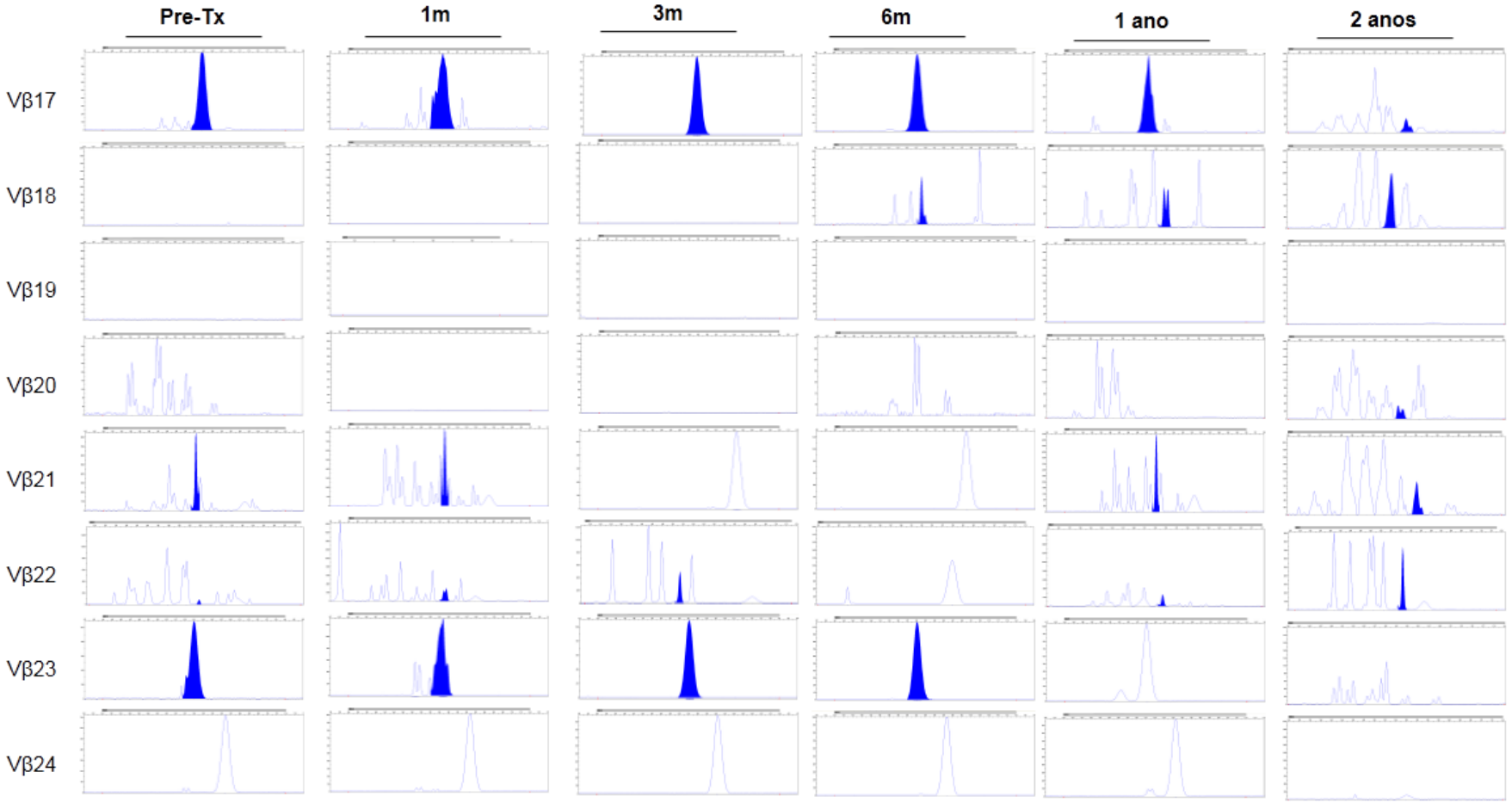


Figura O.1. Repertório da cadeia Vβ do TCR de um paciente com anemia falciforme pré e pós transplante alogênico de células tronco hematopoéticas. Representação esquemática do perfil de espectros de CDR3 de cada uma das 24 famílias Vβ. O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, transcrito em cDNA e amplificado para *primers* específicos para 24 famílias Vβ, e o repertório Vβ do TCR de cada paciente foi analisado pelo método de *TCRBV CDR3 spectratyping*. Cada gráfico representa a intensidade de fluorescência, que é proporcional ao número de transcritos para a família Vβ, em unidades arbitrárias (eixo Y), em função do comprimento da região CDR3, em pares de bases (eixo X). Os picos destacados em azul em cada gráfico correspondem ao tamanho de CDR3 com 10 resíduos de aminoácidos.