

**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 Jardim

**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 nº2013/08135-2, nº2014/03866-1 e nº2016/11544-0), 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 Bís caro 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -TRECs. Análises do repertório da cadeia V $\beta$  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 V $\beta$  com padrão *skewed* e picos de CDR3 monoclonais, sendo a família V $\beta$ 3 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 V $\beta$ 22 foi a mais expressa no período pré-transplante e em todos os seguimentos pós-transplante. Os pacientes com DF apresentaram aumento de linfócitos B *naïve*, 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 *naïve* 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 conseqüentemente nesses compartimentos celulares periféricos, que pode conferir aos pacientes com DF uma maior suscetibilidade 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 sjTREC and  $\beta$ -TREC levels. Analysis of the TCR V $\beta$  chain repertoire by *TCRBV CDR3 spectratyping* indicate that patients with SCA showed a less diverse repertoire, mainly composed by V $\beta$  families with a skewed pattern and monoclonal CDR3 peaks, being the V $\beta$ 3 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 V $\beta$ 22 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -TRECs. Los análisis del repertorio de la cadena V $\beta$  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 V $\beta$ 3 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 V $\beta$ 22 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.

---

# 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  $\beta$ -globina, levando a substituição de adenina por timina (GAG->GTG) nessa posição. Conseqüentemente, 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 homocigota (SS) do gene da HbS devido a herança dos alelos de ambos os pais, denominada “anemia falciforme” (AF). Outras combinações heterocigóticas sintomáticas com o gene da HbS também podem ocorrer com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD) e  $\beta$ -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 ter 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 sobrevivência 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 ofereçam 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-descendente 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  $\beta$ -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 sobrevivência 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. Conseqüentemente, 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). Adicionalmente, 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

sepsis, 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- $\alpha$ , 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  $\alpha 4\beta 1$ ) 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  $\alpha 4$  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 uma 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 ( $\alpha v\beta 3$ ), 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 ( $\alpha\beta 3$ ) 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  $\alpha L\beta 2$  e  $\alpha M\beta 2$ , 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- $\alpha$ , os quais favorecem as ligações entre plaquetas e entre células endoteliais 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  $\alpha\beta 3$  (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-Fe<sup>3+</sup>) e nitrato (NO<sup>3+</sup>) (AKINSHEYE; KLINGS, 2010; MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016; SCHAER et al., 2014).

A Hb-Fe<sup>3+</sup> 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- $\alpha$ . 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-1 $\beta$  aumentam nas células do sistema imune inato após ativação de NF- $\kappa$ B por agonistas de TLR e TNF- $\alpha$  (LEEMANS; CASSEL; SUTTERWALA, 2011). Um estudo conduzido por Dutra e colaboradores (2014), demonstrou que o heme é um indutor do processamento de pro-IL-1 $\beta$  através da ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos. O mecanismo molecular ilustra que a ativação de NLRP3 requer fosforilação da enzima 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 detectado por receptores do sistema imune inato ativando a resposta inflamatória em condições estéreis, e infecciosas e levando a secreção de IL-1 $\beta$  (DUTRA et al., 2014).

Outro estudo também avaliou *in vitro* a ativação de NLRP3 em monócitos por eritrócitos falciformes, via estimulação de TLR e NLR, e consequente aumento da secreção de IL-1 $\beta$  e leucotrienos (LTB<sub>4</sub>). 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- $\kappa$ B 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 (HO-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 conseqüente 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 conseqüência 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<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup> após sua remoção, especialmente as células CD27<sup>+</sup>IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup> que produzem anticorpos contra antígenos polissacarídeos (CAMERON et al., 2011; KRUEZMANN 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 (KRUEZMANN et al., 2003).

Embora a esplenectomia tenha sido associada ao decréscimo de células B de memória CD27<sup>+</sup>, 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  $\beta$ -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 adaptativa 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 resposta 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 reductase (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<sup>+</sup> e de memória CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. Porém, a HU levou ao aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> 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) mostraram que o tratamento com HU aumenta os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, 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- $\alpha$  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<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> 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 sobrevivência 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<sup>+</sup> 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-4<sup>+</sup>) e Th17 (IL-17<sup>+</sup>), 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<sup>+</sup> 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, caracterizado 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<sup>+</sup> e diminuição de células B reguladoras (Bregs) (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>), que são produtoras da citocina antiinflamatória 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 imunológica 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 priapismo 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 doppler transcerebral), hipertensão pulmonar e síndrome torácica aguda recidivante, 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; ABOUD, 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 inicialmente 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 efectoras 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-1 $\beta$  e IL-18 (JANKOVIC et al., 2013). Posteriormente ocorre a ativação e expansão de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que reconhecem APCs expressando peptídeos MHC e/ou antígenos menores de histocompatibilidade do hospedeiro (ZEISER; BLAZAR, 2017). As células T CD8<sup>+</sup> do doador causam danos nas células epiteliais medulares tímicas do hospedeiro, resultando na produção de células T CD4<sup>+</sup> 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, linfematopoético, dentre outros, tornando o diagnóstico e prognóstico difíceis, devido a heterogeneidade de manifestações clínicas (COOKE et al., 2017). As citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$  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<sup>+</sup> 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; ABOUD, 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  $\beta$ -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<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> *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  $\gamma\delta$  (DOUEK et al.,



2000). Adicionalmente, também pode ser feita a quantificação de  $\beta$ -TRECs, que constitui um conjunto de segmentos D $\beta$ -J $\beta$ , resultantes do rearranjo da cadeia  $\beta$ , sendo que a razão entre sjTREC/  $\beta$ -TREC fornece uma taxa direta da proliferação intratímica, pois a etapa em que ocorre o rearranjo das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  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  $\beta$  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 locus 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 locus se torna não funcional. Embora este evento leve a exclusão de quaisquer

rearranjos adicionais no locus 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 episossomal, 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  $\beta$  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 infecções 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 ressaltar 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  $\beta$ -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.

---

## 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 *naïve* 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.; ABOUD, 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  $\beta$  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.

MCCAVID, 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 acute *Trypanosoma 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 aggression** *Trends 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 V $\beta$  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/ $\beta$ TREC 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 pathways—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 TCR $\beta$  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 V $\beta$  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.

YAZDANBAKHSI, 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.