

EVILÁZIO CUNHA CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PÓS ESQUEMA DE
IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 EM PACIENTES COM DOENÇA
FALCIFORME**

**Manaus – AM
2026**

EVILÁZIO CUNHA CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PÓS-ESQUEMA DE
IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 EM PACIENTES COM DOENÇA
FALCIFORME**

Tese apresentada, a Coordenação do Programa de Pós-Graduação e Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, sob área de concentração de Ciência da Saúde. A pesquisa foi conduzida sob a orientação da Profa. Dra Adriana Malheiro Alle Marie, do Departamento de Pesquisa e Genômica da Fundação HEMOAM.

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

Coorientador: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

**Manaus – AM
2026**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C268a Cardoso, Evilázio Cunha
Avaliação da resposta imunológica pós esquema de imunização contra
COVID-19 em pacientes com doença falciforme / Evilázio Cunha
Cardoso. - 2026.
77 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Adriana Malheiro Alle Marie.
Coorientador(a): Erich Vinicius de Paula.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2026.

1. Doença Falciforme. 2. Imunização. 3. COVID-19. 4. Imunidade
celular. 5. Linfócitos T. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Paula, Erich
Vinicius de. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. IV. Título

FOLHA DE JULGAMENTO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PÓS-ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

EVILÁZIO CUNHA CARDOSO

**“Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
Doutor em Biotecnologia, aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em convênio com a
Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do
Amazonas”.**

Banca Julgadora:

Adriana Malheiro Alle Marie

Presidente

Aya Sadahiro

Membro

Luis Andre Morais Mariuba

Membro

José Pereira de Moura Neto

Membro

Nilberto Dias de Araújo

Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por toda a proteção, ensinamento e direção para alcançar as vitórias na minha vida e por colocar pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta dos desafios.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Adriana Malheiro, por ter me acolhido e acreditado em mim, pelas orientações, dispor de tempo e paciência para a conclusão do meu doutorado.

Você não foi apenas orientadora, mas também incentivadora, conselheira e será sempre referência para o meu crescimento profissional e acadêmico.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula e Prof. Dr. Allyson Costa pelo apoio e dedicação prestados ao longo desse período da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Nelson Fraiji, pela inspiração contínua, pelo incentivo decisivo para que eu ingressasse no mestrado e, posteriormente, no doutorado. Agradeço por seu apoio e confiança depositada em meu potencial e por seu compromisso incansável em estimular a pesquisa e o desenvolvimento científico daqueles que o cercam. Sua dedicação e orientação foram fundamentais para minha trajetória acadêmica.

Ao nosso grupo de pesquisa, coordenado pela Prof.^a Dra. Adriana Malheiro, pela valiosa colaboração dos alunos de doutorado, mestrado e do Programa de Iniciação Científica, em especial ao grupo de pesquisa da Doença Falciforme, que se dispôs a participar deste estudo e foi fundamental em todas as etapas, desde a coleta das amostras até as análises laboratoriais. Vocês foram incríveis! Nada disso teria sido possível sem a dedicação de todos.

Aos professores do programa Pós Graduação do PPGBIOTEC, através da Universidade Federal do Amazonas/UFAM, pela oportunidade, dedicação, competência, apoio e todo o conhecimento compartilhado, fortalecendo o crescimento dos alunos e contribuir para a pesquisa e ciência brasileira.

À Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e todo o aporte financeiro ao longo do desenvolvimento do projeto, bem como minha jornada como pesquisador. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro fornecido para o desenvolvimento deste, e de outros projetos do grupo de pesquisa.

Aos pacientes portadores de doenças falciforme que participaram voluntariamente desde estudo. Graças à colaboração de vocês, foi possível aprofundar o conhecimento sobre a doença e contribuir para uma melhor compreensão de sua realidade. Esta tese foi idealizada e concretizada em razão de cada um de vocês.

Por fim, a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), por incentivar a pesquisa e disponibilizar a estrutura necessária para o desenvolvimento deste e de diversos outros projetos. Sinto-me honrado por ter construído minha trajetória dentro desta instituição e por colaborar em múltiplas iniciativas de pesquisa, sempre com o propósito de promover a saúde de pacientes e doadores.

Gratidão eterna a todos!

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Manoel Cardoso e Francisca Cunha (in memoriam), pela dedicação incondicional, pelo amor e cuidado constantes, pela as orações diária e por nunca deixarem de acreditar em meu potencial. Sou profundamente grato por cada renúncia e por todas as ações realizadas em prol das conquistas e da felicidade de seus filhos. Amor eterno a vocês!

Aos meus filhos, Kayo Cardoso e Matheus Cardoso, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão. Vocês estão presentes em cada uma das minhas vitórias e representam os maiores presentes que a vida me concedeu. Amo vocês!

Aos meus irmãos pelo fato de, embora tenham estado distantes, acreditaram e sempre torceram pelo meu sucesso.

RESUMO

Introdução: A Doença Falciforme (DF) é a hemoglobinopatia mais comum no mundo, decorrente de uma mutação no gene que codifica a cadeia beta da hemoglobina, originando a hemoglobina S (HbS). Os pacientes apresentam imunocomprometimento crônico associado ao estado hipoesplênico, inflamação sistêmica persistente e defeitos na resposta imune celular, condições que os classificam como grupo de risco para complicações graves da COVID-19 e como grupo prioritário para vacinação. **Objetivo:** Avaliar a resposta imunológica celular induzida pela vacinação contra a COVID-19 em pacientes com doença falciforme, por meio da imunofenotipagem de células T e B e dosagem de biomarcadores imunológicos circulantes. **Metodologia:** Estudo transversal conduzido entre 2021 e 2023, incluiu 73 pacientes com Doença Falciforme (50 SS e 23 S β) e 73 controles saudáveis, atendidos na Fundação HEMOAM, Manaus-AM. Do total de pacientes, 73 completaram o esquema vacinal de duas doses contra a COVID-19 com imunizantes disponibilizados pelo Programa Nacional de Imunizações: CoronaVac (n=27; 37,0%), Pfizer/BioNTech (n=27; 37,0%), AstraZeneca/Fiocruz (n=18; 24,7%) e Janssen (n=1; 1,4%). Foram realizados hemograma pelo sistema ADVIA 2120i, imunofenotipagem de linfócitos T e quantificação de linfócitos B por citometria de fluxo, e dosagem de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento pela técnica de Luminex. As análises estatísticas foram conduzidas nos softwares GraphPad Prism v.9.0 e RStudio. **Resultados:** Foi demonstrada redução significativa de eritrócitos, HCM e VCM em pacientes S β comparados ao genótipo SS. Durante crises vaso-oclusivas no grupo SS, observou-se leucocitose e neutrofilia significativas. A imunofenotipagem revelou redução significativa de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ totais nos pacientes com DF em comparação ao grupo controle saudável, com depleção acentuada das subpopulações naïve e de células de memória efetora terminal (TEMRA), e expansão das células de memória central (TCM) e efetora (TEM). O perfil de mediadores solúveis demonstrou elevação marcante de IL-6, CCL3, CXCL10 e G-CSF nos pacientes com DF em relação aos controles, com amplificação durante as crises vaso-oclusivas. **Conclusão:** Este estudo caracterizou de forma abrangente o perfil imunológico de pacientes com Doença Falciforme dos genótipos SS e S β no contexto da vacinação contra a COVID-19, evidenciando comprometimento imunológico significativo com depleção de células T naïve, expansão de fenótipos de memória e inflamação sistêmica desregulada. Tais alterações podem impactar a qualidade e a duração da resposta vacinal nesta população. Estudos futuros devem avaliar a correlação entre os parâmetros imunológicos e os títulos de anticorpos anti-Spike para melhor compreensão da eficácia vacinal na Doença Falciforme.

Palavras-chave: Doença Falciforme; Imunização; COVID-19; Imunidade Celular; Linfócitos T.

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell disease (SCD) is the most common hemoglobinopathy in the world, resulting from a mutation in the gene that encodes the beta chain of hemoglobin, leading to the formation of hemoglobin S (HbS). Patients exhibit chronic immunodeficiency associated with hyposplenism, persistent systemic inflammation, and defects in the cellular immune response—conditions that classify them as a high-risk group for severe complications from COVID-19 and as a priority group for vaccination. **Objective:** To evaluate the cellular immune response induced by COVID-19 vaccination in patients with sickle cell disease, through T- and B-cell immunophenotyping and measurement of circulating immune biomarkers. **Methodology:** A cross-sectional study conducted between 2021 and 2023 included 73 patients with sickle cell disease (50 SS and 23 S β) and 73 healthy controls treated at the HEMOAM Foundation in Manaus, Amazonas. Of the total patients, 73 completed the two-dose COVID-19 vaccination regimen with vaccines provided by the National Immunization Program: CoronaVac (n=27; 37.0%), Pfizer/BioNTech (n=27; 37.0%), AstraZeneca/Fiocruz (n=18; 24.7%), and Janssen (n=1; 1.4%). Complete blood counts were performed using the ADVIA 2120i system, T-lymphocyte immunophenotyping and B-lymphocyte quantification were conducted by flow cytometry, and cytokine, chemokine, and growth factor assays were performed using the Luminex technique. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism v.9.0 and RStudio software. **Results:** A significant reduction in red blood cell count, mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular volume (MCV) was observed in S β patients compared to the SS genotype. During vaso-occlusive crises in the SS group, significant leukocytosis and neutrophilia were observed. Immunophenotyping revealed a significant reduction in total CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes in patients with FV compared to the healthy control group, with marked depletion of naive and terminal effector memory (TEMRA) subpopulations, and expansion of central memory (TCM) and effector (TEM) cells. The profile of soluble mediators showed a marked elevation of IL-6, CCL3, CXCL10, and G-CSF in patients with SD compared to controls, with amplification during vaso-occlusive crises. **Conclusion:** This study comprehensively characterized the immunological profile of patients with sickle cell disease of the SS and S β genotypes in the context of COVID-19 vaccination, demonstrating significant immunological impairment with depletion of naive T cells, expansion of memory phenotypes, and dysregulated systemic inflammation. Such alterations may impact the quality and duration of the vaccine response in this population. Future studies should evaluate the correlation between immunological parameters and anti-Spike antibody titers to better understand vaccine efficacy in sickle cell disease.

Keywords: Sickle Cell Disease; Immunization; COVID-19; Cellular Immunity; T Lymphocytes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Doença Falciforme	13
2.1.1. Etiologia.....	13
2.1.2. Epidemiologia da Doença Falciforme	14
2.1.3. Fisiopatologia da DF	15
2.1.4. Manifestações Clínicas da DF	17
2.1.5. Disfunções imunológicas na DF	18
2.1.5.1. Imunidade Inata e Adaptativa da DF	18
2.2. SARS-CoV-2 e desenvolvimento dos casos de COVID-19:	19
2.2.1. Características virais	19
2.2.2. Sintomatologia da COVID-19	21
2.3. Imunizantes contra a COVID-19 em pacientes com Doença Falciforme	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Aspectos Éticos	26
4.2. Amostragem	26
4.3. Tipo de Estudo.....	26
4.4. Recrutamento de pacientes e doadores saudáveis	26
4.5. Imunização contra a COVID-19	27
4.6. Critérios de Elegibilidade	27
4.6.1. Critério de Inclusão.....	27
4.6.2. Critério de Exclusão.....	28
4.6.3. Critério de não-inclusão	28
4.7. Coleta de Material Biológico.....	28
4.8. Contagem dos índices hematimétricos – Hemograma	28
4.9. Imunofenotipagem	28
4.10. Dosagem de citocinas	32
4.11. Análises Estatísticas.....	32
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO	56

8. EQUIPE DE PESQUISA	58
9. CRONOGRAMA	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	67
Anexo 1. Folha de Aprovação	67
APÊNDICES	68
Apêndice A: Parecer do Comitê de Ética	68
Apêndice B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	69
Apêndice C: Termo de Assentimento Livre Esclarecido	73
Apêndice D: Questionário sociodemográfico e clínico	76
Apêndice E: Protocolo de Imunofenotipagem	78
Apêndice F: Figura suplementar 1	80

1. INTRODUÇÃO

A Doença Falciforme (DF) é a hemoglobinopatia mais comum no mundo, decorrente de uma mutação no gene que codifica a cadeia beta da hemoglobina, e dá origem a uma variante estrutural conhecida como hemoglobina S (HbS). Do ponto de vista fisiopatológico, a AF é uma doença inflamatória, caracterizada pela ativação constante da imunidade, por consequência de dois elementos fisiológicos principais: repetidas vaso-oclusões e hemólise crônica, na qual ativam e retroalimentam o processo inflamatório (Piel; Steinberg; Rees, 2017a; Ware et al., 2017a).

No contexto epidemiológico, o continente africano apresenta a maior prevalência em todo o mundo com AF, sendo a África Subsaariana, a região com maior prevalência, apontando uma frequência aproximada de 230 mil nascimentos por ano. Segundo estimativa em 2008, na América do Sul, foi observada uma frequência de 2.900 crianças portadoras do gene da HbS, além de 1.300 casos de crianças descritas no continente europeu (Piel; Steinberg; Rees, 2017a). No Brasil, entre os anos de 2014 e 2020, a média anual de novos casos de crianças diagnosticadas com o gene mutado no Programa de Nacional de Triagem Neonatal foi de 1.087, uma incidência de 3,75 a cada 10 mil nascidos vivos. Estima-se que há 60 a 100 mil pacientes com a mutação no país. A distribuição no Brasil é bastante heterogênea, sendo a Bahia, o Distrito Federal e Minas Gerais, os locais de maior incidência (Frazão, 2022; Saúde, 2018). Na região norte do país, no Amazonas, foram estimados cerca de 350 pacientes em tratamento no hospital de referência para doenças hematológicas no ano de 2024 (Cesar et al., 2019; Saúde, 2023a).

A fisiopatologia da doença consiste principalmente da heme plasmática e a hemoglobina livres, advindos da hemólise crônica intravascular que desempenham o papel de moléculas associadas a padrões moleculares associados a danos (DAMPs), ativando o sistema imunológico inato e promovendo a adesão de células sanguíneas circulantes entre si e com o endotélio, desencadeando a ocorrência do processo de vaso-oclusão. A heme tem a capacidade de ativar os neutrófilos, estimulando a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que por sua vez aumentam a ativação plaquetária e a formação de trombos, contribuindo para a vaso-oclusão pulmonar. Além disso, também promovem a liberação do fator de crescimento da placenta (PGF) a partir de eritroblastos. O PGF atua como um ligante para o receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular em células endoteliais e

macrófagos, resultando na liberação de endotelina 1, um vasoconstritor que contribui para a hipertensão pulmonar (Gladwin; Kato, 2008a; Kato et al., 2018a; Piel; Steinberg; Rees, 2017a).

O manejo clínico da DF envolve abordagens farmacológicas e não farmacológicas. A hidroxiureia permanece como o principal fármaco modificador da doença, atuando na indução de hemoglobina fetal (HbF) e redução das crises vaso-oclusivas. Outros tratamentos incluem transfusões sanguíneas regulares, suplementação de ácido fólico e analgesia para controle das crises álgicas. Mais recentemente, avanços biotecnológicos têm ampliado as opções terapêuticas, com destaque para a terapia gênica e a edição genômica por CRISPR-Cas9, que representam perspectivas promissoras de cura para a doença (Kato et al., 2018; Ware et al., 2017).

A pandemia da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) foi estabelecida em março de 2020 pela Organização Mundial de Saúde, que teve seu encerramento após 3 anos, com o auxílio de medida profiláticas, como a vacinação. O Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu grupos prioritários para a vacinação, considerando complicações e mortalidade por COVID-19 em subgrupos específicos. Para pacientes onco-hematológicos, a prioridade é dada a aqueles com critérios gerais e fatores de risco como idade avançada, obesidade e doença de base não controlada. E em pacientes com AF, que apresentam uma taxa de mortalidade de 10%, em comparação com 3,3% na população geral, especialmente para aqueles acima de 50 anos com condições como doença cardiopulmonar, renal ou histórico de AVC, também foram classificados como grupo de risco para o desenvolvimento de complicações da COVID-19, e grupo prioritário À vacinação (Chiattonne, 2022).

Em um estudo realizado na Arabia Saudita por Fita e Colaboradores destacaram os significativos desafios de saúde enfrentados pelos pacientes com AF particularmente no contexto da pandemia de COVID-19. A AF é uma doença genética que leva a várias complicações, e o surgimento da COVID-19 levantou preocupações sobre seu impacto na saúde desses pacientes. A COVID-19 pode exacerbar os problemas de saúde existentes em pacientes com AF. A infecção por COVID-19 aumenta significativamente o risco de síndrome torácica aguda e outras complicações em pacientes com DF (Fita et al., 2024).

Essa pandemia gerou apreensão devido à maior susceptibilidade dos indivíduos com Doença Falciforme à COVID-19 e às formas mais severas da doença. Os centros de controle e prevenção de doenças categorizaram a Doença Falciforme como uma das condições com um

fator de risco aumentado para complicações graves relacionadas à infecção pelo SARS-CoV-2. Dado que os pacientes com Doença Falciforme apresentam uma fisiopatologia subjacente caracterizada por inflamação crônica e um aumento do risco de trombose, além de serem imunocomprometidos devido à auto infarto do baço ou esplenectomia cirúrgica, tornando-os especialmente suscetíveis a infecções e desenvolvimento da STA. Além disso, esses pacientes têm comorbidades e disfunção orgânica secundária, o que levanta preocupações sobre a probabilidade e a gravidade da COVID-19 nesse grupo de indivíduos (Abdulkarim AbdulRahman et al., 2020; Friedman et al., 2022; Sayad; Karimi; Rahimi, 2021).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Doença Falciforme

2.1.1. Etiologia

A Doença Falciforme (DF) é uma mutação estrutural da hemoglobina, de origem hereditária, causada por uma mutação no 17º nucleotídeo (timina → adenina) do gene da β -globina (HBB). Essa mutação resulta em uma substituição do ácido glutâmico por uma valina no sexto resíduo da β -globina. Em indivíduos homozigóticos (SS), a hemoglobina adulta normal ($\alpha 2/\beta 2$; HbA) é completamente substituída por uma hemoglobina pouco solúvel ($\alpha 2/\beta S 2$), chamada de hemoglobina S (HbS), sendo um fator patognomônico da Doença Falciforme (Costa; Conran; Fertrin, 2013a; Kato et al., 2018a).

Diferente da HbA, a molécula de HbS quando se encontra no estado de desoxigenação, possui regiões hidrofóbicas anômalas que promovem a ligação entre as duas cadeias de β -globina, facilitando sua cristalização e a formação de um polímero. A polimerização da molécula de HbS afeta a estrutura e flexibilidade do eritrócito, o que resulta em desidratação e dano oxidativo à célula. Em consequência, indivíduos com AF apresentam anemia hemolítica crônica, aumento da produção de células vermelhas na medula óssea, presença de níveis elevados de bilirrubina e redução da haptoglobina, além de maior interação entre o endotélio, hemácias, plaquetas e leucócitos (de Azevedo; Malmegrim, 2020a).

A presença da HbS altera as propriedades físico-químicas dos eritrócitos. Quando o eritrócito se encontra em um estado oxigenado, a molécula de HbS apresenta uma separação entre as globinas betas. Em contraste, quando a HbS está em condições de desoxigenação, ela se torna mais tensa e aumenta a proximidade com outras cadeias mutadas. E, por meio da união dessas cadeias, há formação de longos polímeros, que se precipitam no citoplasma alterando a

morfologia do eritrócito, consequentemente adquirindo o aspecto de foice ou falcizado (Stypulkowski; Manfredini, 2010). Esse processo de polimerização da HbS depende de vários fatores, como: tensão de oxigênio, concentração intracelular da HbS, temperatura e associação com outras hemoglobinas e talassemias. Em conjunto com a polimerização há também o aumento da viscosidade, e aumento do risco da ocorrência de eventos vaso-oclusivos e hemolíticos nos pacientes com AF, podendo desencadear diversas complicações clínicas e fisiológicas (Ware et al., 2017a).

A hemólise estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e em conjunto com a hemoglobina livre, leva ao sequestro do óxido nítrico (NO), uma molécula produzida pelo endotélio para regulação do tônus vascular basal, inibição da ativação plaquetária, e inibição da expressão de várias moléculas de adesão. A hemólise também induz a liberação de arginase, levando à depleção de arginina, um metabólito essencial para produção de NO. Assim, a depleção crônica de NO leva à disfunção endotelial, além de contribuir para o processo vaso-oclusivo e pro-trombótico (Kato; Gladwin; Steinberg, 2007).

A liberação da hemoglobina e da enzima arginase criam um estado de disfunção no revestimento interno dos vasos sanguíneos, aumento da formação de novos vasos, estresse causado por radicais livres e inflamação. A fisiopatologia da AF é complexa e caracterizada por episódios de bloqueio dos vasos sanguíneos, agregação da HbS em estruturas poliméricas e obstrução mecânica induzida pelos glóbulos vermelhos que assumiram forma falciforme de maneira irreversível. Isso inclui a aderência de elementos sanguíneos nas paredes das células endoteliais, problemas de coagulação e comprometimento da função do revestimento interno dos vasos sanguíneos (Aslan; Freeman, 2007; Ataga et al., 2008).

2.1.2. Epidemiologia da Doença Falciforme

No mundo, a Doença Falciforme (DF) é altamente prevalente no continente africano, sendo a África Subsaariana é a região com maior prevalência, com estimativa de cerca de 230.000 nascimentos por ano com DF. Na América do Sul, no ano de 2008, foi estimada a frequência de 2.900 crianças nascidas com DF. No Brasil, a ocorrência de doença falciforme varia consideravelmente entre os estados do País, representando a heterogeneidade étnica da população brasileira entre os negros e caucasianos. Estima-se que existem mais de dois milhões de portadores com o gene da doença e mais de 60.000 a 100.000 pessoas com DF em todo o país, e o predomínio do alelo βS no Brasil varia de 1,2% a 10,9% dependendo da região, conforme o Ministério da Saúde (Kato et al., 2018a; Saúde, 2023b, 2023a).

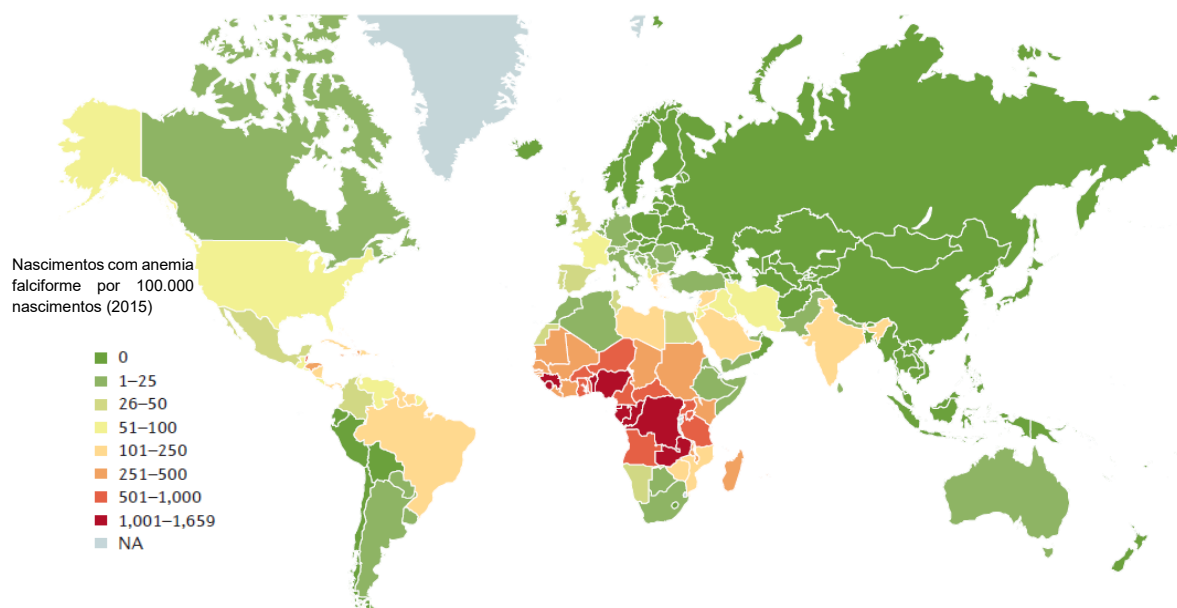


Figura 1: Epidemiologia de casos estimados de nascimentos com Doença Falciforme no ano de 2015. Estimativa de casos por 100.000 nascimentos por país no ano de 2015. Fonte: Adaptado de Kato et al., 2018.

Em relação aos recém-nascidos nas regiões brasileira, cerca de 1 a cada 37.400 nascem com a doença falciforme, e nascem de 1.000 a 1.200 novos casos por ano no Brasil. A DF é mais comum em pessoas de descendência africana, apresentando um índice elevado nos estados da Bahia (1:650), Rio de Janeiro (1:1.300), Pernambuco, Maranhão, Goiás e Minas Gerais com incidência de 1:1.400, e Santa Catarina (1:13.500). No ano de 2016, 1.071 dos recém-nascidos foram identificados com doença falciforme (Arduini; Rodrigues; Trovó de Marqui, 2017). No Amazonas, a prevalência estimada é de ± 350 conforme os dados do DataSUS – Ministério da Saúde/Hemoglobinopatias de pessoas portadoras com DF, com a incidência de 6 a 8 casos novos por ano (Cesar et al., 2019; Saúde, 2023b).

2.1.3. Fisiopatologia da DF

Apesar da AF ser causada por uma única mutação de ponto no gene *HBB*, sua fisiopatologia é extremamente complexa, envolvendo não apenas a anemia hemolítica crônica, mas também um segundo mecanismo fisiopatológico que consiste na vaso-oclusão da microcirculação (Nath; Hebbel, 2015). Devido à essa tendência da HbS em se polimerizar quando exposta a baixas tensões de oxigênio, o que pode levar à formação de hemácias

irreversivelmente falcizadas, que apresentam maiores dificuldades em circular por capilares sanguíneos (Kato et al., 2018a; Kato; Gladwin; Steinberg, 2007).

Os ciclos repetidos de polimerização e despolimerização que passam as hemácias ricas em HbS levam à lesão da membrana eritrocitária. A associação da polimerização da HbS com estas lesões lentificam o trânsito das hemácias pela microcirculação, levando a ciclos de isquemia e reperfusão que ativam uma complexa cascata de eventos inflamatórios (Nath; Hebbel, 2015). Essa cascata envolve a alteração das interações fisiológicas entre hemácias, leucócitos, plaquetas e células endoteliais, com aumento da adesão entre estas células (Higuera; Bravo; Guerrero, 2014).

A condição de baixa tensão de oxigênio em vênulas pós-capilares, por exemplo, altera a interação dinâmica entre as células do sangue com as células endoteliais, contribuindo para a inflamação e isquemia crônicas, assim como para episódios vaso-oclusivos agudos (Hebbel; Vercellotti; Nath, 2009). Por sua arquitetura microvascular sinuosa, a vaso-oclusão é mais frequente no tecido pulmonar, o que explica os frequentes episódios de dor óssea intensa e mal localizada apresentados por estes pacientes, conhecidas como crises álgicas (Costa; Conran; Fertrin, 2013a; Piel; Steinberg; Rees, 2017a; Ware et al., 2017a). O segundo mecanismo fisiopatológico importante da AF é a anemia hemolítica. Por muitos anos, o impacto atribuído à hemólise no quadro clínico da AF restringiu-se à anemia, em geral bem tolerada pelos pacientes. A ativação imunológica da AF ocorre com a liberação de hemoglobina livre na corrente sanguínea durante aumento de hemólise intravascular (Kato; Gladwin; Steinberg, 2007).

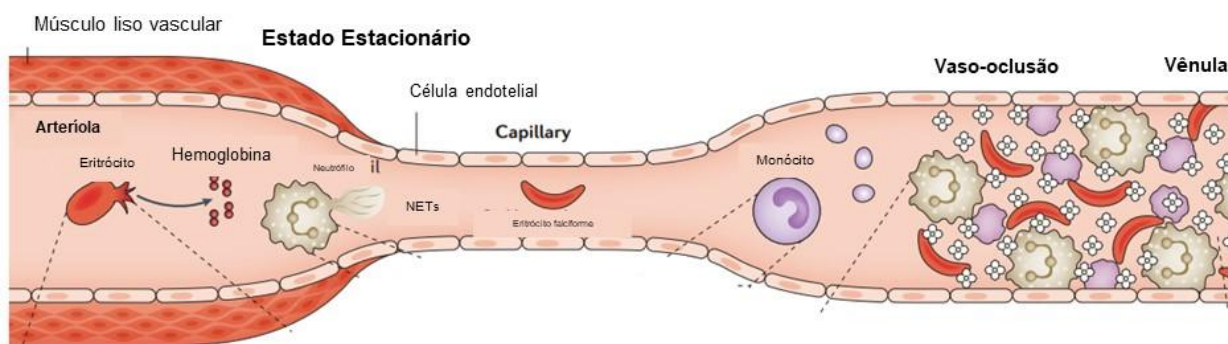


Figura 2: Fisiopatologia da Doença Falciforme. Mecanismos da doença no perfil de estado estacionário com a apresentação de hemólise e falcização do eritrócito, até a evolução para o estado de crise-vasoclusiva.

Fonte: Adaptado de Kato et al., 2018.

A hemólise desempenha um papel central, influenciando a fisiopatologia e a variabilidade fenotípica. Subprodutos da hemólise, como hemoglobina descompartimentalizada, arginase 1, dimetilarginina assimétrica e nucleotídeos de adenina, desencadeiam disfunção vasomotora e complicações clínicas vasculares, incluindo hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo, doença renal crônica e acidente vascular cerebral isquêmico. Além disso, também inativa o óxido nítrico, formando metemoglobina e prejudicando a função vascular. Moléculas como hemoglobina e heme atuam como padrões moleculares associados ao dano eritrocitário, ativando o sistema imunológico e desencadeando inflamação e vaso-oclusão falciforme (Gladwin; Kato, 2008a; Kato et al., 2018a; Kato; Steinberg; Gladwin, 2017a). A hemólise intravascular compromete a disponibilidade do NO, resultando em estresse oxidativo e desequilíbrio redox, intensificando processos fisiológicos e promovendo vasoconstrição e remodelação vascular (Kato; Steinberg; Gladwin, 2017a).

2.1.4. Manifestações Clínicas da DF

Do ponto de vista clínico, a DF pode ser descrita como uma condição multissistêmica, caracterizada por danos orgânicos crônicos e progressivos, além de episódios vaso-oclusivos recorrentes. Os episódios mais comuns se manifestam com crises álgicas, que frequentemente afetam ossos longos, esqueleto axial, o tórax e o abdômen. Outra forma significativa é a síndrome torácica aguda (STA), resultante de uma crise de oclusão vascular nos pulmões, e pode ser identificada por um infiltrado pulmonar na radiografia torácica e se manifesta clinicamente como infiltrados pulmonares múltiplos, febre alta, taquipneia, tosse e dor torácica (Kato; Steinberg; Gladwin, 2017a). A lesão crônica da AF diminui a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes que possuem complicações debilitantes, como as úlceras cutâneas, a necrose asséptica da cabeça de fêmur e a hipertensão pulmonar. Ambas manifestações clínicas são as mais recorrentes nos pacientes falciformes, e apresentam maior gravidade (Costa; Conran; Fertrin, 2013a; Piel; Steinberg; Rees, 2017a; Ware et al., 2017a).

As crises álgicas ainda são as manifestações mais frequentes da AF e caracterizam-se por episódios de dor intensa que afetam principalmente a região lombar, tórax e ossos longos, cuja frequência e gravidade variam entre pacientes. Sua ocorrência inicia-se logo após os 6 meses de idade, sendo que após o sexto ano de vida, quase todos os pacientes já apresentaram algum episódio. Além disso, cerca de 30% dos pacientes experimentam crises dolorosas diárias, das quais muitas são controladas em casa. Não há exames laboratoriais para o diagnóstico dessas crises, e é baseada na clínica do paciente (Meier; Abraham; Fasano, 2017).

O termo STA é uma descrição genérica para qualquer forma de doença pulmonar aguda em pacientes com AF. Dentro de critérios clínicos, a síndrome é definida como a ocorrência de um novo infiltrado pulmonar combinado com febre, dor no peito, respiração acelerada e/ou tosse ou baixos níveis de oxigênio no sangue. A STA é a segunda condição mais comum em termos de frequência, ficando apenas atrás das crises vaso-oclusivas, no entanto é a principal causa de morte em adultos com AF, com uma taxa de mortalidade de cerca de 9% nesta população (Arduini; Rodrigues; Trovó de Marqui, 2017; Cesar et al., 2019).

2.1.5. Disfunções imunológicas na DF

2.1.5.1. Imunidade Inata e Adaptativa da DF

Na imunidade inata de pacientes com AF, há uma forte atividade do sistema complemento, principalmente do fator B e outros complexos imunes circulantes que podem se apresentar aumentados nestes pacientes. Esses complexos circulantes podem gerar respostas imunes em todo o corpo dependendo de seu depósito, podendo esta característica causar diversas complicações. A ativação de mastócitos ocorre de forma desregulada, além do número de eosinófilos, com maior capacidade de degranulação, migração e adesão nas respostas imunes. Neutrófilos e macrófagos cultivados com heme tem sua capacidade fagocítica inibida pela remodelação do citoesqueleto; além desse fator, o heme livre, reconhecido como DAMP, é capaz de ativar macrófagos e células endoteliais através da sinalização via TLR-4, e nos neutrófilos induz a formação de NETs, que pode contribuir com os episódios vaso-oclusivos e inflamação (Balandya et al., 2016a; de Azevedo; Malmegrim, 2020a).

Estudos descrevem alterações nas subpopulações de células T, com relatos de células T CD4⁺ e CD8⁺ elevadas em crianças com AF, embora os achados possam variar conforme a população estudada e o contexto clínico. Além disso, células T CD4⁺ e CD8⁺ naïve foram observadas reduzidas e células T CD45RO⁺ e CD45RA⁺ circulantes aumentadas em pacientes adultos, principalmente devido à presença de osteonecrose (Balandya et al., 2017a; Daltro et al., 2020a; Vingert et al., 2015a). As células Treg já foram descritas na AF como elevadas, todavia, sua função supressora é caracterizada como normal. Além disso, pode-se destacar que o perfil de células Treg nos pacientes com AF que apresentam sintomas clínicos é diferente. Um subconjunto de células B é apresentado de forma elevada na AF, contudo, sua principal função de produzir anticorpos apresenta-se prejudicada (Balandya et al., 2017a). As células iNKT também têm importante papel na patogênese da AF, contribuindo para resposta

inflamatória e episódios de vaso-occlusão (Figura 1) (Balandya et al., 2016a; de Azevedo; Malmegrim, 2020a).

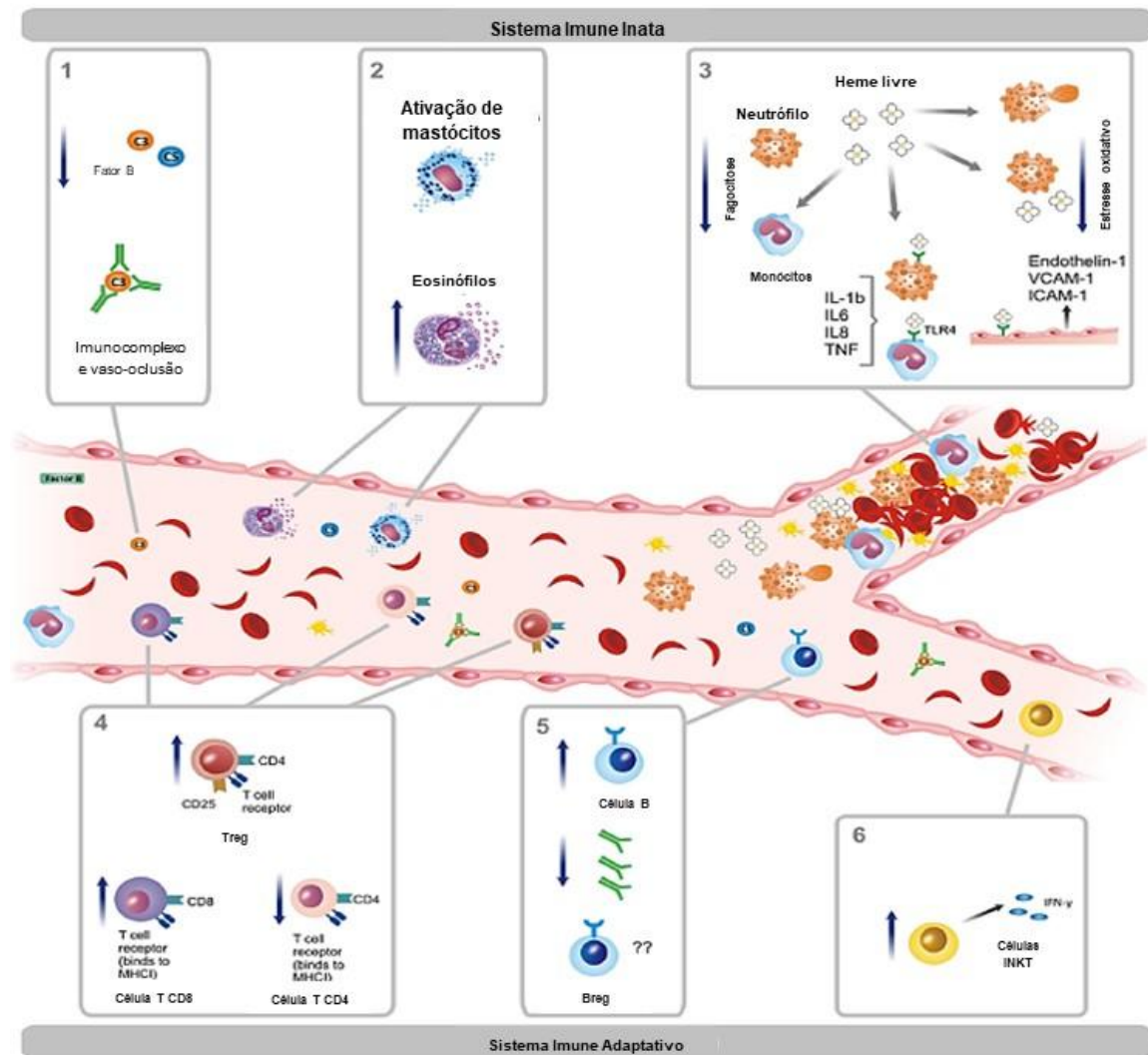


Figura 3: Papel do sistema imunológico inato e adaptativo na patogênese da doença falciforme, genótipo homozigoto.

TLR4: Toll like receptor 4; NET: armadilhas extracelulares de neutrófilos; HO-1: heme oxigenase-1; Treg: células T reguladoras; células iNKT: células T natural killer invariantes; Breg: células B reguladoras.

Fonte: DE AZEVEDO, Júlia Teixeira Cottas; MALMEGRIM, Kelen Cristina Ribeiro, 2020.

2.2. SARS-CoV-2 e desenvolvimento dos casos de COVID-19:

2.2.1. Características virais

No mês de dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, capital da província de Hubei, na China, foram registrados vários casos de pneumonia de origem desconhecida. Observou-se que o agente causador dessa doença apresentava sintomas similares ao coronavírus SARS-CoV, responsável pela epidemia ocorrida entre 2002 e 2004 na China (34). Os coronavírus são

classificados taxonomicamente, pertencendo à ampla e diversa família Coronaviridae, da ordem Nidovirales e gênero Betacoronavirus. Os gêneros α e β -coronavírus têm a capacidade de infectar mamíferos, incluindo humanos, enquanto γ e δ -coronavírus infectam mamíferos e aves (Lauxmann; Santucci; Autrán-Gómez, 2020).

O vírus que surgiu no final de 2019, conhecido como "novo" coronavírus, é o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2). Ele faz parte da família Coronaviridae, especificamente do gênero Betacoronavirus (Jan et al., 2020), devido à sua semelhança genética, compartilhando 79% da sequência genética com o SARS-CoV (Tay et al., 2020). Este vírus apresenta um genoma de RNA de fita simples, envelopado e tem a capacidade de infectar tanto seres humanos quanto morcegos. Em contraste, outra variante, o *MERS-CoV* (*Middle East Respiratory Syndrome*), que causou uma epidemia no Oriente Médio em 2012, foi associada a infecções em camelos, humanos e morcegos (Singh et al., 2020; Yang et al., 2020). A morfologia do SARS-CoV-2 é caracterizada por quatro proteínas estruturais essenciais: as proteínas Spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). A proteína S confere uma aparência de uma "coroa" no vírus e desempenha um papel crucial como o principal meio de entrada nas células hospedeiras, interagindo com o receptor da enzima conversora de angiotensina (ACE2) (Sarvepalli, 2020; Schoeman; Fielding, 2019).

O SARS-CoV-2 é o agente causador do surto pandêmico que se desdobrou no período compreendido entre 2020 e 2022. Trata-se de uma crise de saúde global que se caracteriza pela rápida propagação da doença e uma elevada taxa de mortalidade, assumindo dimensões preocupantes, conforme alertado nos relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Ataga et al., 2008). Em fevereiro de 2020, a doença foi oficialmente denominada como doença do coronavírus 2019 (COVID-19) e é transmitida de pessoa para pessoa, tanto por contato direto quanto por vias indiretas. Embora tenha se originado na China, até maio de 2020, já havia afetado pessoas em todas as regiões do mundo, totalizando mais de quatro milhões de casos e resultando em 219 mil óbitos (Lauxmann; Santucci; Autrán-Gómez, 2020).

A espécie *SARS-CoV-2* do coronavírus é uma das sete que podem infectar seres humanos. Das três espécies que podem causar doenças graves (SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2), o novo coronavírus foi descrito como mais letal (De Wit et al., 2016). A Doença do Novo Coronavírus 2019 (COVID-19), pode apresentar manifestações graves que levam à síndrome de desconforto respiratório agudo e, em última instância, ao óbito (Naqvi et al., 2020).

A transmissão da COVID-19 se dá principalmente por meio da inalação de gotículas de saliva e de secreções respiratória que ficam suspensas no ar quando uma pessoa contaminada. Além disso, outras formas importantes de contaminação é contato com superfície contaminadas. Desde dezembro de 2019, após o surgimento da primeira infecção pelo SARS-CoV-2, diferentes variantes foram identificadas, com destaque as variantes Delta e Omicron, designadas como variantes de preocupação, devido apresentar características de alta transmissibilidade e letalidade (Jan et al., 2020; Singh et al., 2020).

2.2.2. Sintomatologia da COVID-19

Os sintomas iniciais da COVID-19 assemelham-se aos da gripe e podem incluir febre, calafrios, tosse seca, dor de garganta, náuseas, dor de cabeça e mialgias. O sintoma predominante em indivíduos infectados é a pneumonia grave, que pode levar à angústia respiratória aguda, e à medida que a doença progride, é possível observar falência de múltiplos órgãos. Diversos mecanismos podem explicar os danos aos órgãos, incluindo toxicidade viral direta, lesões às células endoteliais, ativação de processos tromboinflamatórios, desregulação da resposta imune e desequilíbrio do sistema renina-angiotensina-aldosterona. É importante ressaltar que os sintomas da COVID-19 podem variar consideravelmente dependendo de vários fatores, mas, em geral, a maioria das pessoas apresenta casos leves ou é assintomática durante a infecção. No entanto, a doença pode progredir para formas mais graves, como pneumonia e síndrome respiratória aguda, resultando em níveis mais elevados de morbidade e mortalidade. As taxas de letalidade podem chegar a 6,6% em uma escala global (Gupta et al., 2020; Li et al., 2020; Sarvepalli, 2020; Yang et al., 2020).

A COVID-19 pode ser dividida em quatro categorias de gravidade: leve, moderada, grave e crítica. A forma leve é a mais comum, caracterizada por sintomas não graves que não requerem cuidados médicos e não apresentam sinais de pneumonia viral ou falta de oxigênio. Os pacientes com COVID-19 moderada demonstram sinais de pneumonia, podendo ter dificuldade para respirar, mas ainda não sofrem de falta de oxigênio. A COVID-19 grave se refere a casos com pneumonia, acompanhados de respiração rápida, baixos níveis de oxigênio e progressão de manchas nos pulmões em exames de imagem. Já a COVID-19 crítica é aquela que evolui para complicações como insuficiência respiratória, choque e disfunção de múltiplos órgãos, com uma alta taxa de mortalidade (Escandón et al., 2021; Sarvepalli, 2020; Silva Filho et al., 2021).

Poucos estudos avaliaram as proporções de COVID-19 em cada uma dessas categorias de gravidade. Além disso, alguns indivíduos que se recuperam da doença aguda experimentam sintomas persistentes, conhecidos como sequelas pós-agudas de COVID-19 ou "COVID-19 longa". Muitos desses sintomas se assemelham à síndrome da fadiga crônica/encefalomielite miálgica e incluem fadiga, sintomas neuropsiquiátricos, perda de cabelo, dificuldades de sono, problemas de atenção, dispneia e perda persistente do olfato ou paladar. Também foram relatados casos raros de síndromes hiperinflamatórias, como a síndrome inflamatória multissistêmica em crianças e adultos, que podem estar relacionadas à síndrome de tempestade/liberação de citocinas (Escandón et al., 2021).

2.3. Imunizantes contra a COVID-19 em pacientes com Doença Falciforme

No Brasil, o Informe Técnico da campanha de vacinação contra a COVID-19 revelou que a OMS identificou 173 vacinas em fase pré-clínica e 63 em pesquisa clínica, com 20 delas alcançando a fase III de ensaios clínicos (Quadro 1). Duas dessas vacinas, a CoronaVac (desenvolvida pela Sinovac/Butantan) e a AstraZeneca (produzida em colaboração com a Fiocruz e o Instituto Serum da Índia), foram escolhidas para integração no Programa Nacional de Imunização e distribuídas na rede pública de saúde. A CoronaVac utiliza o vírus inativado SARS-CoV-2, enquanto a AstraZeneca se baseia em um adenovírus recombinante, e foram os principais imunizantes administrados na população brasileira desde 2021 (Creech; Walker; Samuels, 2021).

No que se refere a vacina, quatro categorias principais foram desenvolvidas e aprovadas para uso contra a SARS-CoV-2, tais como mRNA, vetor adenoviral, inativadas e vacinas de subunidades recombinantes. Inicialmente havia um total de 2016 vacinas em desenvolvimentos, sendo que 92 delas entraram na fase de testes em humanos. Devido à gravidade da epidemia e falta de controle, a OMS incluiu 10 vacinas na lista de uso emergencial (Radhwi et al., 2022). Estudos indicam que a maioria das vacinas é eficaz na proteção contra a variante Alfa. No entanto, a eficácia contra a variante Beta reduziu significativamente. O efeito das vacinas contra variante Gamma também foi reduzido (Creech; Walker; Samuels, 2021; Pang et al., 2020; Radhwi et al., 2022), enquanto a taxa de evasão imunológica da variante Delta permanece a mesma da variante Gamma. Ao mesmo tempo que a Omicron é altamente transmissível, mesmo entre indivíduos totalmente vacinados, esta variante tem a capacidade de evadir-se às respostas imunitárias protetoras ocasionadas pelas vacinas atuais (Prüß, 2022).

As atuais orientações sobre a administração de vacinas em crianças com AF são baseadas em estudos de eficácia realizados predominantemente em indivíduos sem AF. A presença de anormalidades imunológicas na AF, como a diminuição das células T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue, disfunção das células T reguladoras e comprometimento na produção de IgM pelas células B, podem afetar a resposta às vacinas em pessoas com AF, potencialmente explicando a observação de respostas prejudicadas ou de menor duração às vacinas nesses indivíduos, especialmente na nos Estados Unidos e Europa (Balandya et al., 2016a; Sayad; Karimi; Rahimi, 2021; Varelas et al., 2022a).

Entretanto, é importante considerar que as funções imunológicas podem variar geograficamente entre as populações com Doença Falciforme (DF), particularmente entre aquelas no Ocidente e na África Subsaariana. Isso se deve a diferentes exposições ambientais, como a prevalência de malária e outras infecções endêmicas na África Subsaariana, que exercem influência direta sobre o sistema imunológico. É essencial levar em conta as diferenças regionais ao planejar estratégias eficazes de vacinação. Na região Subsaariana, onde a incidência de Doença Falciforme e doenças infecciosas endêmicas, incluindo a malária, é a mais alta do mundo, ambos os fatores podem ter um impacto direto na eficácia das vacinas, tornando a compreensão regional fundamental para o planejamento de vacinação eficaz (Balandya et al., 2016a; Varelas et al., 2022a).

Pesquisas recentes lançaram luz sobre o impacto potencial da vacinação contra SARS-CoV-2 em pacientes com AF, que geralmente são considerados como tendo o sistema imunológico comprometido. Um estudo observou que adultos diagnosticados com Doença Falciforme e COVID-19 exibem uma resposta de IgG mais forte e duradoura após a vacinação quando comparados a indivíduos sem a doença falciforme que compartilham características demográficas semelhantes (Nakahara et al., 2023). Outro estudo confirmou o aumento da reação de IgG, observando que indivíduos com doença falciforme exibiram uma geração de IgG mais pronunciada e prolongada após a vacinação, indicando uma variação nas reações imunes a diversas vacinas. Apesar dessa diferença, a atividade neutralizante contra o vírus mostrou-se comparável em ambos os grupos (Han; Saraf; Gordeuk, 2023a).

Foi constatado que cerca de 85% dos pacientes com hemoglobinopatias desenvolvem uma resposta de anticorpos neutralizantes após serem vacinados contra a COVID-19. Contudo, essa resposta é notavelmente influenciada pela história de infecção prévia e pelo número de doses administradas (Radhwi et al., 2022). É crucial destacar que a resposta é

predominantemente heterogênea, com valores discrepantes de anticorpos, mesmo após a administração de duas doses da vacina. Dado que a maioria dos pacientes com AF é categorizada como imunocomprometida devido ao estado hipoesplênico ou à autoesplenectomia, bem como à presença de defeitos na resposta imune celular. Isso ocorre porque a reação hiperimune ou a tempestade de citocinas tem sido identificada como a principal causa de casos graves de COVID-19 (Al-Ansari et al., 2022).

Em outro estudo observacional de caráter prospectivo avaliando os níveis séricos de anticorpos em indivíduos com SCD e talassemia dependente de transfusão, revelando que ambas as coortes geraram anticorpos IgG anti-*Spike* suficientes após a vacinação com mRNA COVID-19 da Pfizer-BioNTech (Giatagantzidou et al., 2022). Na resposta imune em pacientes com SCD, observa-se então com base em outro estudo que a maioria alcançou níveis adequados de anticorpos neutralizantes após a segunda dose da vacina de mRNA, com alguma correlação com a ativação do complemento (Varelas et al., 2022b, 2022c). Foi demonstrado que vários fatores, como ativação do complemento e derrames vasculares anteriores, afetam o resultado geral. Em conjunto, esses resultados indicam que, embora os pacientes com doença falciforme possam produzir uma forte resposta de anticorpos à vacinação contra SARS-CoV-2, essa resposta pode ser afetada pelas características de saúde individuais e pelo tipo específico de vacina usada (Giatagantzidou et al., 2022).

Em relação a resposta imunológicas induzidas por vacina contra a COVID-19, pesquisas indicaram que a variante Omicron (B.1.1.529), possui uma distância antigênica ainda mais expressiva em relação ao vírus ancestral, quando comparado às variantes Beta e Delta. Como consequência, ficou evidente uma redução acentuada na eficácia protetora das vacinas anteriores contra o Omicron (Araf et al., 2022; Zhou et al., 2022). No entanto, a reduzida sensibilidade dos anticorpos neutralizantes às principais proteínas virais das variantes, incluindo a variante Omicron do SARS-CoV-2, resultou em um aumento dos riscos de escape imunológico e na diminuição da eficácia da vacina. Dessa forma se fez necessária a aderência de doses de reforço das vacinas contra a COVID-19 (Araf et al., 2022; Creech; Walker; Samuels, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta imunológica celular induzida pela vacinação contra a COVID-19 em pacientes com doença falciforme, por meio da imunofenotipagem de células T e B e dosagem de biomarcadores imunológicos circulantes.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os subtipos de linfócitos T e B por citometria de fluxo após a vacinação, com base na expressão de CD45RA, CCR7 e CD27, identificando os compartimentos naíve, memória central, memória efetora e TEMRA.
- Avaliar a expressão de marcadores de ativação em células T e B dos pacientes com Doença Falciforme após a vacina.
- Analisar o perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no plasma dos pacientes com DF utilizando a plataforma Luminex.
- Correlacionar os dados imunológicos (imunofenótipo e biomarcadores) com parâmetros clínicos dos pacientes, com o estado clínico de crise e estado estacionário.
- Comparar os resultados dos pacientes com Doença Falciforme com um grupo controle de indivíduos saudáveis vacinados contra a COVID-19.

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos Éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), sob o número de parecer: 5.414.049, e está em conformidade com as diretrizes estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (**Apêndice A**). A participação dos pacientes no estudo ocorreu após a devida assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, **Apêndice B**) e/ou do Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE, **Apêndice C**).

4.2. Amostragem

A amostra do estudo foi composta por pacientes com doença falciforme de caráter homozigoto (anemia falciforme, genótipo SS) e heterozigoto (genótipo S/β talassemia) que buscaram atendimento voluntariamente ou por urgência médica, e que receberam tratamento na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM durante o período de abril de 2023 a março de 2024.

4.3. Tipo de Estudo

Este estudo é do tipo transversal e possui abordagem descritiva e analítica. Envolve a coleta de amostras de pacientes em crise vaso-oclusiva e em estado estacionário de pacientes com Doença falciforme, e teve como objetivo avaliar os dados clínicos e laboratoriais. Para realizar a caracterização, foram coletadas informações dos prontuários médicos por meio do Serviço de Arquivo Médico (SAME).

4.4. Recrutamento de pacientes e doadores saudáveis

Os pacientes foram recrutados durante suas consultas ambulatoriais na Fundação HEMOAM. Inicialmente, foi solicitada a assinatura do TCLE após uma explicação do projeto. O paciente que concordou em participar do estudo foi aplicado um questionário para coletar informações sociodemográficas e clínicas (**Apêndice D**). No caso de os pacientes que não possuíam determinadas informações essenciais, como os dados sociodemográficos, clínicos ou referentes à vacinação contra a COVID-19, foram então obtidos a partir dos prontuários físicos e eletrônicos.

Ao grupo de indivíduos saudáveis, são doadores de sangue regulares (>3 doações) pareados por idade e sexo, sem comorbidades hematológicas ou imunossupressoras, com o esquema vacinal contra a COVID-19 completo (três ou quatro doses). A este grupo foram atendidos no bloco C da doação de sangue do HEMOAM.

Em ambos os grupos, os pacientes e doadores foram abordados pela equipe de pesquisa, os quais apresentavam o termo de consentimento/assentimento e questionário contendo informações sociodemográficas e clínicas.

4.5. Imunização contra a COVID-19

No período de 2021 a 2023, os participantes do estudo foram imunizados contra a COVID-19 conforme disponibilidade das vacinas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde. Foram utilizadas quatro plataformas vacinais distintas: CoronaVac (Sinovac/Butantan), composta por vírus inativado; ChAdOx1-S (AstraZeneca/Fiocruz), desenvolvida com vetor viral recombinante de adenovírus; Ad26.COV2.S (Janssen/Johnson & Johnson), também de plataforma de vetor viral; e BNT162b2 (Pfizer/BioNTech), baseada em RNA mensageiro (mRNA).

Do total de 77 participantes vacinados, 27 (37%) receberam a CoronaVac, 27 (37%) a Pfizer, 18 (24,7%) a AstraZeneca/Fiocruz e 1 (1,4%) a Janssen. A distribuição por tipo de vacina não foi utilizada como variável de estratificação nas análises principais deste estudo, constituindo, portanto, uma limitação a ser considerada na interpretação dos resultados. Estudos futuros com maior poder amostral poderão avaliar o impacto diferencial de cada plataforma vacinal na resposta imunológica de pacientes com Doença Falciforme.

4.6. Critérios de Elegibilidade

4.6.1. Critério de Inclusão

Foram incluídos pacientes com o diagnóstico de doença falciforme (SS e Sβ), maiores de 12 anos de idade, que aceitaram participar do projeto através da assinatura do TCLE e/ou TALE, incluídos em estado estacionário e em crise vaso-oclusiva. Foram elegíveis pacientes que tomaram qualquer vacina contra a COVID-19, sendo da primeira à quarta dose.

Ao grupo de doadores, foram incluídos aqueles aprovados na triagem clínica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHMOAM.

4.6.2. Critério de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que não atenderam as especificidades da pesquisa, bem como aqueles com prontuários incompletos e/ou por razão particular em qualquer momento ou motivo desejaram desistir da pesquisa.

4.6.3. Critério de não-inclusão

Não foram incluídos pacientes e doadores (as) gestantes, e também os que não corresponderam aos critérios de inclusão de ambos os grupos.

4.7. Coleta de Material Biológico

Após a obtenção da assinatura do TCLE e a conclusão do questionário, os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) e/ou no setor de pronto atendimento de urgência e emergência da Fundação HEMOAM. As coletas de amostras foram realizadas por profissionais treinados da própria Fundação, por punção de veia periférica ou por cateter venoso central, sendo que neste caso um volume de 2 ml foi descartado. A técnica empregada seguiu os procedimentos operacionais padrão da instituição, minimizando o uso de garroteamento e evitando traumas desnecessários. Foram obtidos 9 mL de sangue, distribuídos entre um tubo de EDTA (4 mL), para confecção do hemograma e imunofenotipagem dos linfócitos T e B, e um tubo com gel separador (5 mL), para a quantificação de moléculas circulantes e anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2.

Para o grupo saudável, a abordagem ocorreu durante a doação de sangue, em que foram coletados do sangue periférico 5 mL em um tubo com EDTA K2 e um tubo de gel separador para a execução dos mesmos procedimentos acima citados.

4.8. Contagem dos índices hematimétricos – Hemograma

O sistema ADVIA 2120i, operante no departamento de hematologia da Fundação HEMOAM, foi empregado para realizar a contagem dos índices hematimétricos a partir de amostras de sangue coletadas dos pacientes e doadores em tubos contendo EDTA.

4.9. Imunofenotipagem

Foi utilizada a técnica de Imunofenotipagem e citometria de fluxo para identificar e analisar o perfil das populações de linfócitos T e B em cada ponto de acompanhamento. Esse processo envolve o uso de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que são específicos para marcadores que indicam o estágio de maturação e ativação das células do sistema

imunológico, o painel de anticorpos e fluorocromos usados está descrito no **quadro 2**, enquanto que o protocolo para imunofenotipagem está no anexo (**Apêndice E**).

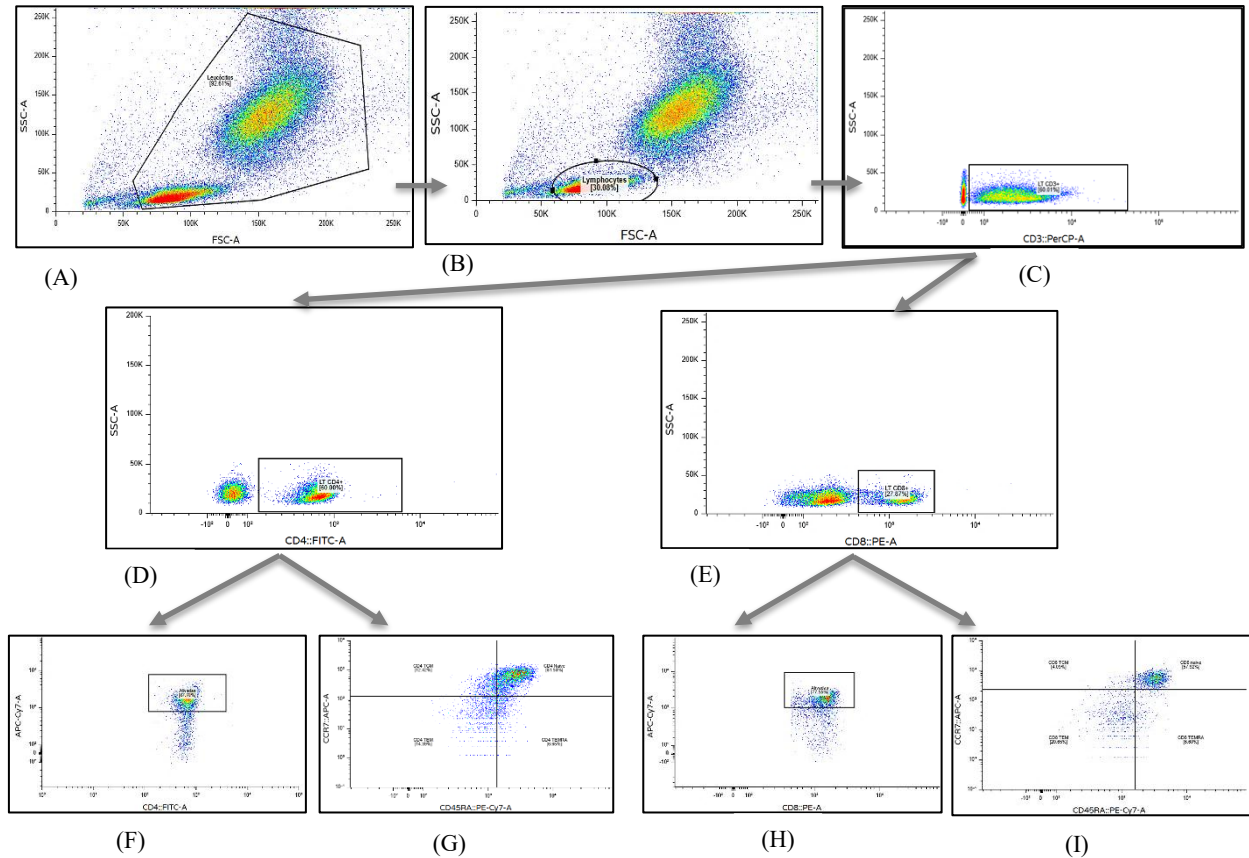
Quadro 2: Painel de anticorpos conjugados aos respectivos fluorocromos, e seus valores aplicados nos tubos para cada paciente.

Tubos	Célula	Anticorpo
1	Controle Negativo	-
2	Linfócitos T	Anti-CD3 (PC5.5)
		Anti-CD8 (PE)
		Anti-45RA (PE-Cy7)
		Anti-CD27 (APC-H7)
		Anti-CCR7 (APC)
		Anti-CD4 (FITC)
3	Linfócito B	Anti-IgD (FITC)
		Anti-CD19 (PE)
		Anti-CD38 (PC 7)
		Anti-HLA-DR (PE-Cy7)
		Anti-IgM (APC)
		Anti-CD27 (APC-H7)

A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo *FACSCanto II* da BD, localizado no laboratório de marcadores celulares da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. A análise dos dados gerados foi realizada pelo software FlowJo v.10.8 para marcação das *gates* e identificação das populações celulares. Os valores percentuais foram armazenados no banco de dados para posterior análise estatística. Os leucócitos foram separados primeiramente com base nos parâmetros de *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC), onde posteriormente foram eliminadas as hemácias não lisadas, com base no pequeno tamanho e complexidade.

Posteriormente, foi empregada uma gate diferente para cada subpopulação de célula. Finalmente, a análise dos respectivos marcadores de superfície foi realizada dentro das subpopulações de T ativada (CD3+CD8+/CD4+CD27+), T *naive* (CD3+CD8+/CD4+CCR7+CD45RA+), Célula T de memória central-TCM (CD3+CD8+/CD4+CCR7+CD45RA-), Célula T de memória efetora-TEM (CD3+CD8+/CD4+CCR7-CD45RA-) e Célula T de memória terminalmente efetora-TEMRA (CD3+CD8+/CD4+CCR7-CD45RA+), conforme apresentado no diagrama abaixo.

Figura 4. Estratégia de *gating* para identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de Linfócitos T por citometria de fluxo.

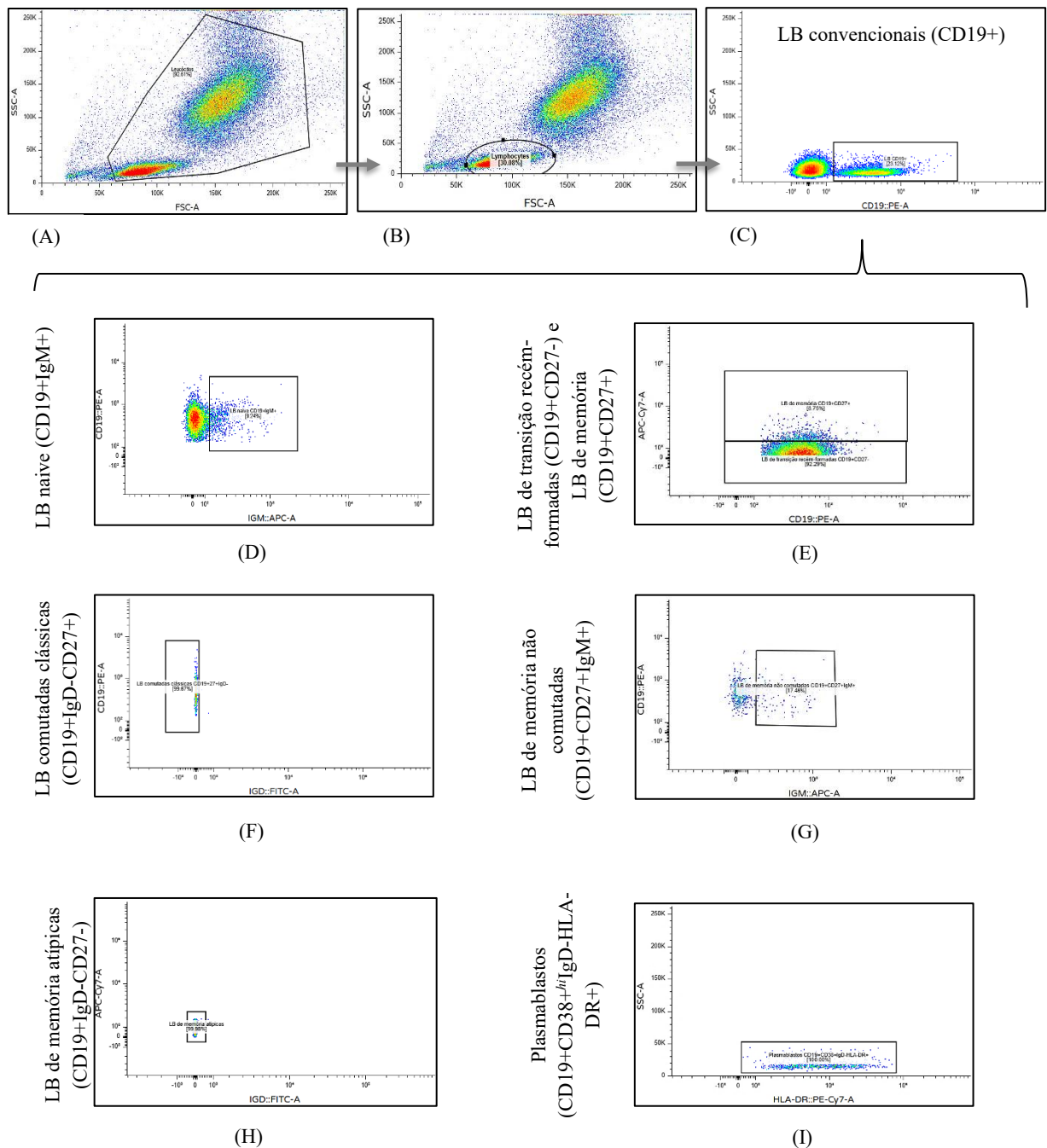


Legenda: Os eventos celulares foram inicialmente selecionados com base nos parâmetros FSC-A e SSC-A para definição da população leucocitária e exclusão de *debris* (A), seguida do *gating* de linfócitos (B). A população de linfócitos T foi então identificada pela expressão de CD3 (C). A partir das células CD3⁺, foram definidas as subpopulações T CD4⁺ (D) e T CD8⁺ (E). Dentro de cada subpopulação, foram caracterizadas as células T ativadas (CD27⁺, F e H) e os fenótipos de diferenciação com base na expressão combinada de CCR7 e CD45RA (G e I), permitindo a identificação de células T *naïve* (CCR7⁺CD45RA⁻), memória central – TCM (CCR7⁺CD45RA⁻), memória efetora – TEM (CCR7⁻CD45RA⁻) e memória terminalmente efetora – TEMRA (CCR7⁻CD45RA⁺), conforme ilustrado no diagrama.

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram classificados em subpopulações *naïve*, memória central, memória efetora e TEMRA com base na expressão de CD45RA e CCR7. A expressão de CD27 foi utilizada para análise adicional do grau de diferenciação dentro dos compartimentos de memória.

Para os linfócitos B, foram marcados os linfócitos B convencionais (CD19⁺), linfócitos B virgens (CD19⁺IgM⁺), células B de transição recém-formadas (CD19⁺CD27⁻), células B de memória (CD19⁺CD27⁺), linfócitos B de memória não comutadas (CD19⁺IgM⁺CD27⁺), e comutadas clássica (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) e atípica (CD19⁺IgD⁺CD27⁻), plasmablastos (CD19⁺CD38^{hi}IgD⁺HLA-DR⁺). A estratégia de *gating* utilizada está descrita na **Figura 5**. A análise de linfócitos B ainda passa por uma revisão na análise para compor o produto final da tese.

Figura 5. Estratégia de *gating* para identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de Linfócitos B por citometria de fluxo



Legenda: Para a caracterização de linfócitos B, os eventos celulares foram inicialmente selecionados com base nos parâmetros FSC-A e SSC-A para definição da população leucocitária e exclusão de *debris* (A), seguida do *gating* de linfócitos (B). A população de linfócitos B foi então identificada pela expressão de CD19 (C). A partir das células CD19+, foram definidas as subpopulações B naíve (D) e linfócitos B de transição recém-formadas e de memória (E). A partir dessas caracterizações foram observadas também as células B de memória comutadas (F) e células B de memória não comutadas (G). Seguida da caracterização de linfócitos B de memória atípicas (H) e Plasmablastos (I). CD: *Cluster* de diferenciação; LB: Linfócitos B; IgM: Imunoglobulina do tipo M; IgD: Imunoglobulina do tipo D; HLA: Antígeno Leucocitário Humano; FSC: *Forward Scatter*; SSC: *Side Scatter*.

4.10. Dosagem de citocinas

O perfil de citocinas foi avaliado através da técnica de *Luminex Multiplex Assay* utilizando o kit *Cytokine Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay*, seguindo as recomendações do fabricante, da empresa *Bio-rad*, para dosar 27 moléculas de sinalização de células de citocinas e quimiocinas em eventos extracelulares complexos e vias de sinalização, que inclui no painel as seguintes moléculas: FGF básico, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF. A aquisição dos resultados ocorreu no equipamento *Luminex 200 System*, localizado no laboratório de Instituto René Rachou (FIOCRUZ/MG). Para determinar a concentração de cada molécula, foi utilizado o software *Bio-Plex Manager*, para posterior armazenamento no banco de dados para análise estatística.

Essas moléculas foram dosadas pela técnica de Luminex, que emprega *beads* magnéticas com diferentes intensidades de fluorescência, conjugadas a anticorpos específicos para cada molécula analisada. Os valores das concentrações foram utilizados para o armazenamento dos dados e posterior análise estatística.

4.11. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram organizados e tabulados no software *Microsoft Excel* e, em seguida, foram transferidos para o programa *GraphPad Prism v.9.0*, que foi empregado para conduzir as análises estatísticas. Antes de escolher o plano estatístico adequado, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados. Foi criada uma tabela com os dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais, além dos imunizantes dos pacientes (**Tabela 1**). Em relação aos dados hematimétricos, os hemogramas foram analisados e conforme o teste de normalidade foi atribuído assim o conjunto de dados não-paramétricos. Logo, foi utilizado o teste de Mann-Whitney nesses dados.

5. RESULTADOS

Ao finalizar o período de coletas, e aplicação dos critérios estabelecidos na literatura, foram incluídos neste estudo 73 pacientes. Entre estes, 73 pacientes são de doença falciforme com genótipo SS, distribuídos entre estado estacionário (EE, n=27) e crise vaso-oclusiva (CVO, n=23). Enquanto que 23 são de pacientes com S/ β -talassemia, distribuídos em EE (n=11) e CVO (n=13).

Na Tabela 1, foram categorizados as variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes SS e S/ β talassêmicos, onde foi apresentado a mediana dos grupos distribuídos entre os pacientes. A idade mediana dos grupos foi de 23 a 28 anos, sendo mais prevalente o público feminino, autodeclarados pardos, com a prevalência de residência na capital do Amazonas, Manaus. O tipo sanguíneo mais prevalente foi o “O” positivo.

Tabela 1: Variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com doença falciforme.

Variável	SS (n=50)		S β (n=23)	
	EE (n=27)	CVO (n=23)	EE (n=11)	CVO (n=12)
Idade, mediana [IIQ]	23 [17-35]	23 [18-38]	23 [17-37]	28 [17-38]
Sexo, n (%)				
Masculino	13	6	4	6
Feminino	14	17	7	6
Cor de pele autodeclarada, n				
Pardo	22	17	10	9
Preto	3	3	-	2
Branco	2	2	1	1
Amarelo	-	1	-	-
Local de residência, n				
Manaus	16	17	7	5
Interior do Amazonas	7	3	1	4
Outro estado	4	2	3	3
Outro país	-	1	-	-
Tipo sanguíneo, n				
O+	13	17	7	5
O-	-	1	2	2
A+	4	3	1	2
A-	1	2	-	-
B+	4	-	-	2
AB+	2	-	1	-
Sem registro*	3	-	-	1

Legenda: EE: Estado Estacionário; CVO: Crise vaso-oclusiva; n: Quantitativo de pacientes; SS: Genótipo homozigoto para hemoglobina SS; S/ β : genótipo heterozigoto para hemoglobina S com beta-talassemia; *Sem registros de tipo sanguíneo no banco de dados da Fundação.

Na tabela 2, onde apresenta o status vacinal dos pacientes, é observado que a maior parte dos participantes deste estudo tomaram as vacinas contra a COVID-19, sendo a maior

prevalência o comprometimento maior com o esquema vacinal de duas doses, em comparação com as quatro doses. Além disso, os pacientes, majoritariamente não apresentaram reações pós-vacina.

Tabela 2: Status Vacinal dos pacientes com doença falciforme.

Variável	SS (n=50)		Sβ (n=23)	
	EE (n=27)	CVO (n=23)	EE (n=11)	CVO (n=12)
Imunizantes da COVID-19, n				
Duas doses	26	16	11	11
Quatro doses	5	4	6	2
Reações após a vacina, n				
Sim	11	15	2	4
Não	15	6	8	6

Legenda: EE: Estado Estacionário; CVO: Crise vaso-oclusiva; EE: Estado Estacionário; CVO: Crise vaso-oclusiva; n: Quantitativo de pacientes; SS: Genótipo homozigoto para hemoglobina SS; Sβ: genótipo heterozigoto para hemoglobina S com beta-talassemia.

Dentro das variáveis laboratoriais, onde foi categorizado em eritrograma, leucograma e plaquetograma. Foi observado no eritrograma uma redução significativa do parâmetro de eritrócitos totais no estado estacionário menor de pacientes com anemia falciforme em comparação com S/β talassêmicos ($p=0.0178$). Pacientes com S/β talassemia em EE e CVO apresentaram HCM ($c: 0,0108$; $d: 0,0175$) e VCM ($c: 0.0070$; $d: 0.0175$) reduzidos em comparação com pacientes com anemia falciforme.

No leucograma, foi possível observar uma leucocitose ($0,0114$) e neutrofilia ($0,0035$) em pacientes com anemia falciforme em crise em comparação com o estado estacionário do mesmo grupo. No plaquetograma, foi observado uma redução no tamanho das plaquetas de pacientes em EE S/β talassemia em comparação com EE de AF ($0,03546$).

Tabela 3: Variáveis laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme e S/β talassêmicos.

Variáveis, média [DP]	SS (n=50)		Sß (n=23)		Valor de p
	EE (n=26*)	CVO (n=23)	EE (n=11)	CVO (n=12)	
Eritrograma					
RBC (x10 ⁶ /µL)	2,42 [0.53]	2,37 [0,33]	3,0 [0,71]	2,6 [0,61]	a: 0.4628 b: 0.1864 c: 0.0178* d: 0.1352
Hemoglobina (g/dL)	8,0 [1,41]	7,874 [1,07]	8,25 [1,05]	7,48 [1,12]	a: 0.6069 b: 0,1053 c: 0,6866 d: 0,3227
Hematócrito (%)	24,53 [4,22]	23,59 [2,86]	25,45 [2,90]	22,98 [3,38]	a: 0,3717 b: 0,0748

					c: 0,5157 d: 0,5745
HCM (pg)	33,24 [5,9]	33,27 [10,75]	28,36 [4,95]	29,4 [5,36]	a: 0,9781 b: 0,6362 c: 0,0108* d: 0,0175*
VCM (f/L)	100,9 [13,11]	100.1 [3,73]	87,36 [13,13]	89,84 [13,7]	a: 0.8179 b: 0.6630 c: 0.0070** d: 0.0175*
CHCM (g/dL)	32,82 [1,52]	33,32 [0,84]	32,6 [1,33]	32,72 [1,59]	a: 0.1680 b: 0.8516 c: 0.6819 d: 0.1484
RDW (%)	20,16 [2,34]	20,91 [3,60]	20,53 [2,10]	20,22 [2,04]	a: 0.3890 b: 0.7236 c: 0.6586 d: 0.5442
HDW (g/dL)	4,14 [0,71]	3,83 [0,74]	4,11 [0,49]	4,35 [0,46]	a: 0.1404 b: 0.2570 c: 0.9089 d: 0.0360*
Leucograma					
WBC (x10 ³ /μL)	9,73 [2.68]	12,61 [4,76]	8,68 [2,90]	10,59 [4,20]	a: 0,0114* b: 0.2246 c: 0.2985 d: 0.2272
Neutrófilo (x10 ³ /μL)	4,54 [1.98]	7,36 [4,18]	4,62 [1,86]	5,85 [3,98]	a: 0.0035** b: 0.3644 c: 0.9062 d: 0.3081
Linfócito (x10 ³ /μL)	3,54 [1,12]	3,77 [1,31]	2,85 [1,15]	3,06 [1,66]	a: 0.5091 b: 0.7281 c: 0.0999 d: 0.1750
Monócito (x10 ³ /μL)	0,74 [0,31]	0,81 [0,25]	0,65 [0,27]	0,693 [0,35]	a: 0.4163 b: 0.7842 c: 0.4167 d: 0.2470
Eosinófilo (x10 ³ /μL)	0,52 [0,63]	0,25 [0,26]	0,23 [0,21]	0,62 [1,221]	a: 0.0651 b: 0.3124 c: 0.1500 d: 0.1729
Basófilo (x10 ³ /μL)	0,054 [0,03]	0,0452 [0,028]	0,061 [0,041]	0,057 [0,050]	a: 0.2953 b: 0.8257 c: 0.5407 d: 0.3623
Plaquetograma					
PLT (x10 ³ /μL)	373.8 [144.5]	403 [132,5]	334,7 [208,9]	357,7 [134,8]	a: 0.4673 b: 0.7553 c: 0.5153 d: 0.3463
VPM (f/L)	8.14 [0.70]	8,34 [0,68]	7,61 [0,54]	8,0 [0,57]	a: 0.3186 b: 0.1170 c: 0.0354* d: 0.1467

Legenda: EE: Estado Estacionário; CVO: Crise vaso-oclusiva; DP: Desvio Padrão; RBC: Eritrócitos totais; HGB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; HCM: Média Corpuscular de hemoglobina; VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de distribuição dos eritrócitos;

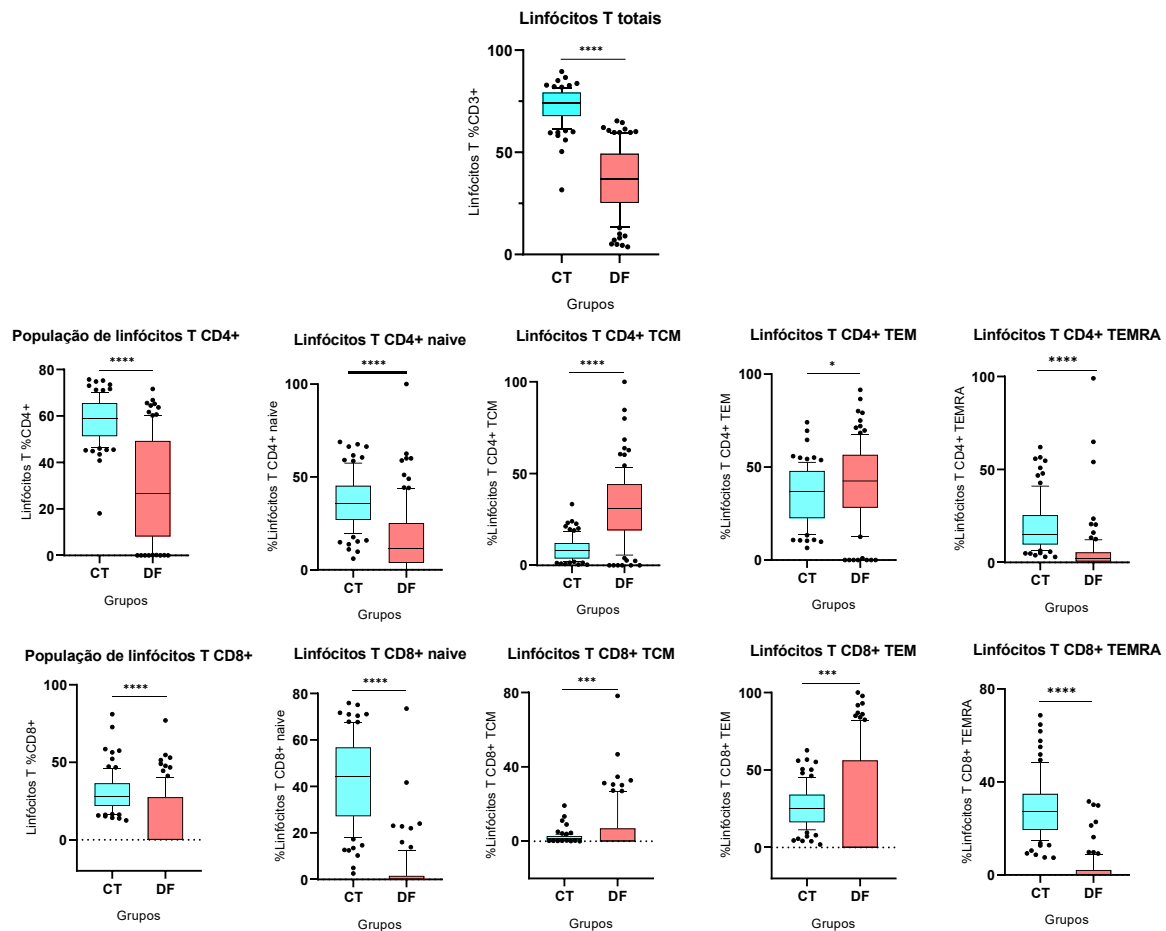
HDW: Amplitude de distribuição de Hemoglobina. a: SS – EE vs CVO; b: S β – EE vs CVO; c: SS, S β – EE; d: SS, S β – CVO; *Um indivíduo não apresentou os resultados do hemograma.

A imunidade celular adaptativa dos linfócitos são fundamentais para a resposta imunológica e no contexto geral, ao avaliarmos essa população de células (**Figura 6**) os linfócitos T totais (CD3⁺), observou-se uma redução significativa na frequência de linfócitos T totais no grupo DF em comparação ao grupo controle. A frequência total de linfócitos T CD4⁺ encontra-se significativamente reduzida no grupo DF em relação ao grupo controle (GC).

Em relação às subpopulações de células T CD4⁺, as populações *naive* e TEMRA apresentaram uma redução significativa em comparação com o grupo controle (GC), sugerindo diminuição da reserva imunológica e possível envelhecimento ou ativação precoce do sistema imune e alterações no processo de diferenciação celular terminal. Enquanto que a população de células de memória central (TCM) e células de memória efetora (TEM), foi observado um aumento significativo que pode ser decorrente de antígenos recorrentes e um perfil de ativação imunológica persistente.

De forma semelhante ao observado para as células T CD4⁺, a população total de linfócitos T CD8⁺ encontra-se significativamente reduzida no grupo DF quando comparada ao grupo controle, indicando um impacto da doença também sobre o perfil citotóxico. Quando observamos as subpopulações *naive* que se apresentam reduzidas no grupo dos pacientes pode reforçar uma exposição contínua a antígenos, sugerindo uma diferenciação maior dessas células. Outros perfis como TCM, TEM e TEMRA, apresentam redução significativa comparada ao grupo controle, que pode sugerir uma transição acelerada das células de memória central (TCM) para perfis mais diferenciados, enquanto que um caráter mais citotóxico ativado, característico de inflamação crônica decorrente da doença pode explicar a redução das células de memória efetora (TEM) e também uma exaustão imunológica na diferenciação terminal das células CD8⁺ (TEMRA).

Figura 6. População de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suas subpopulações: *naive*, TEM, TCM e TEMRA nos pacientes com Doença falciforme e o grupo controle



Legenda: População e subpopulações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ distribuídas por imunofenótipo de virgens – *naive* (CD45RA+CCR7+), células T de memória central - TCM (CD45RA-CCR7+), células T de memória efetora - TEM (CD45RA-CCR7-) e células T terminalmente efetora - TEMRA (CD45RA+CCR7-). Foi utilizado o Teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos, sendo o grupo controle (CT) representado pela cor azul e grupo falciforme (DF) representados pela cor vermelho. As medianas e quartis, além de outliers estão sendo expressos por gráficos de *dot plot*. * equivale a $p < 0,05$, ** equivale a $p < 0,01$, *** equivale a $p < 0,001$ e **** equivale a $p < 0,001$; % percentual da população ou subpopulação de células;

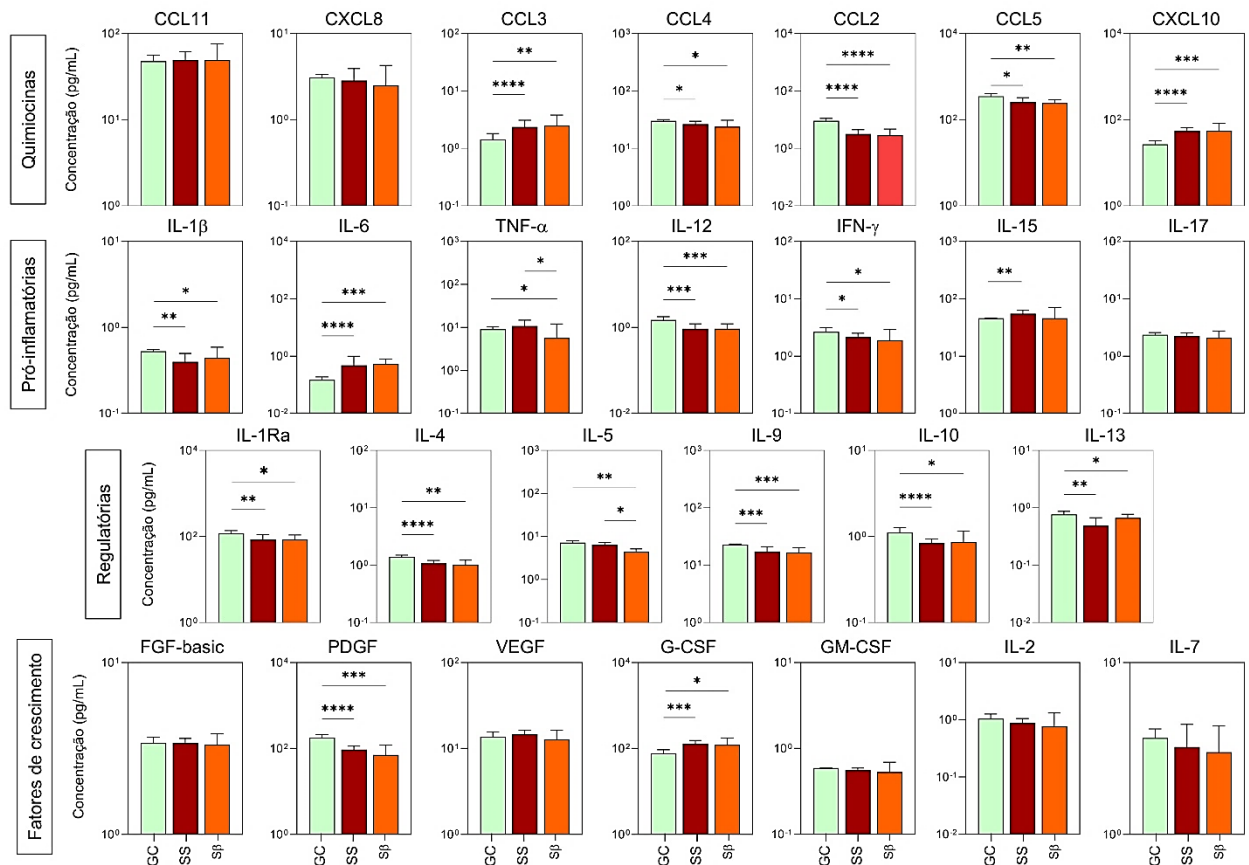
Ao analisarmos as moléculas envolvidas na doença falciforme (**Figura 7**), foi atribuído um grupo controle de indivíduos clinicamente saudáveis para servir como referência. Sendo assim, foram analisadas 27 moléculas de contextos pró e anti-inflamatórias (regulatórias), quimiocinas e fatores de crescimento.

Entre as quimiocinas – a CCL3 e a CXCL10 se apresentaram elevadas em comparação com o grupo controle (GC), enquanto que a CCL4, CCL2 e CCL5 já apresentam uma queda em comparação com o GC. A CCL11 e a CXCL8 não apresentaram diferenças significativas em relação ao GC.

Nas citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-12, IFN- γ e TNF- α apresentaram-se reduzidas em ambos os grupos de pacientes (SS e S β) em comparação com o GC, enquanto que IL-6 se apresentou elevada em ambos os grupos em comparação com GC. A IL-15 apresentou-se elevada somente no grupo SS em comparação com GC, enquanto a IL-17 não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

Nas moléculas regulatórias, IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 apresentaram alterações, sendo o grupo de pacientes apresentando uma concentração reduzida em todas as moléculas em comparação com GC.

Os fatores de crescimento também apresentaram distinção em suas concentrações, sendo o PDGF reduzido no grupo de pacientes em comparação com o GC e o G-CSF elevado no grupo de pacientes em comparação com GC. FGF-basic, VEGF, GM-CSF, IL-2 e IL-7 não apresentaram diferenças significativas em relação ao GC.

Figura 7: Perfil dos Mediadores Imunológicos Séricos na Doença Falciforme

Legenda: Os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias e fatores de crescimento foram quantificados a partir de amostras de soro, e comparadas de acordo com os grupos: GC (Grupo Controle), SS (pacientes com Doença Falciforme com características fenotípicas semelhantes ao genótipo SS) e Sβ (pacientes com Doença Falciforme com características fenotípicas semelhantes ao genótipo Sβ). A medição dos mediadores foi realizada pela plataforma Luminex *Bio-plex*, descrita em Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados em gráficos de barras expressando os valores medianos de cada grupo. As análises foram realizadas empregando o teste de *Mann-Whitney* e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os níveis de significância foram representados por * e indicadas da seguinte forma: * equivale a $p < 0,05$, ** equivale a $p < 0,01$, *** equivale a $p < 0,001$ e **** equivale a $p < 0,001$. As análises foram realizadas de acordo com as seguintes comparações: GC vs SS, GC vs Sβ, e SS vs Sβ.

Na **Figura 8**, dentro do perfil das quimiocinas, para CCL11, nota-se que o grupo AF se apresentou mais elevado durante o perfil EE e reduzido em crise em comparação com o EE. Já para o CXCL8, apresentou-se elevado em SS-EE e SS-CVO reduzido em comparação com GC e SS-EE. O grupo de Sβ-CVO apresentou-se reduzido em comparação com SS-EE. Na quimiocina CCL3, temos um aumento considerável em todos os grupos de pacientes com AF e Sβ em comparação com o grupo GC.

O CCL4, dentro do grupo de crise (SS-CVO e Sβ-CVO) se apresentou se apresentaram reduzidos em comparação com GC e SS-EE. No perfil de CCL2, os grupos de pacientes tanto de AF quanto de Sβ se apresentaram reduzidos em comparação com GC, e os pacientes em SS-

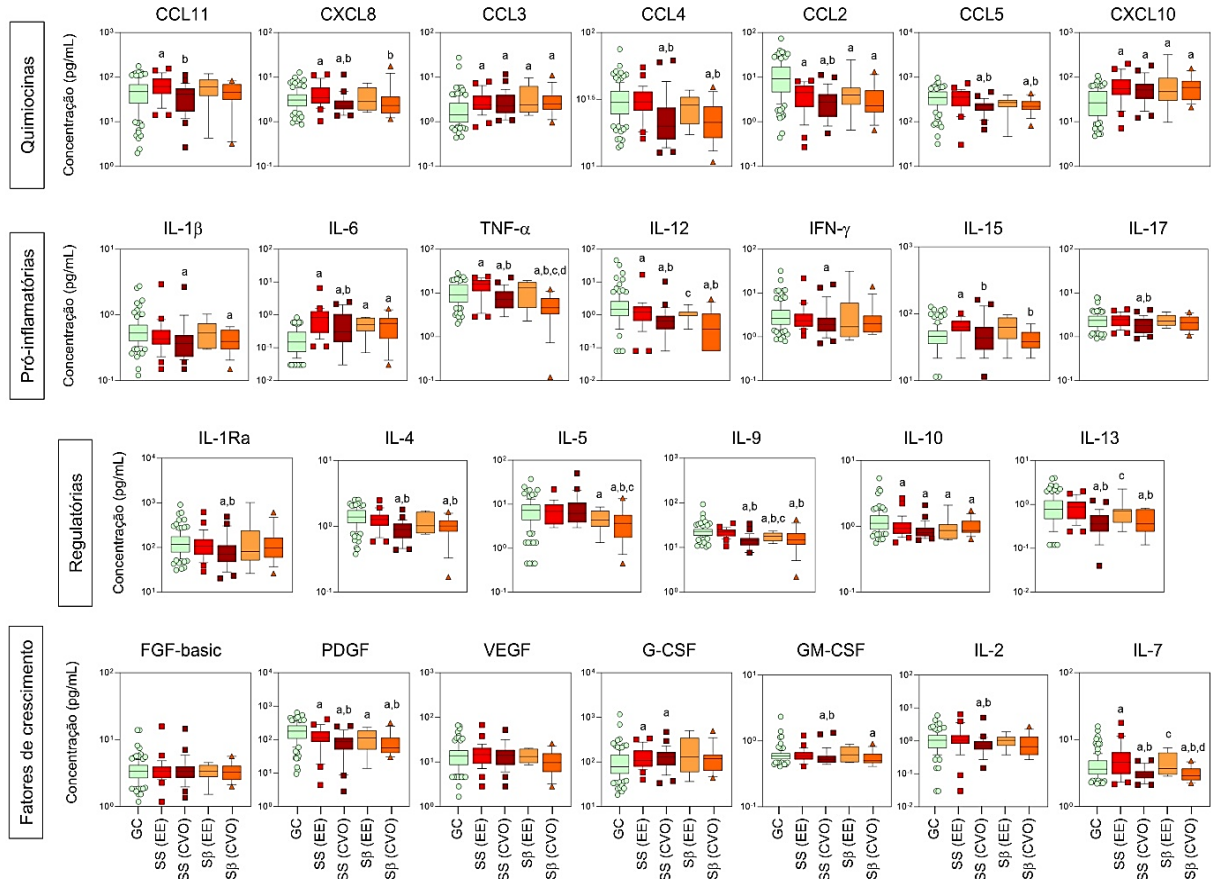
CVO reduzidos em comparação com o SS-EE. No CCL5, os pacientes em crise (SS-CVO e S β -CVO) e apresentaram reduzidos em comparação com o grupo GC e o grupo SS-EE. Já o perfil de CXCL10, foi observado um aumento da concentração em todos os grupos de pacientes em comparação com GC.

Na crise da AF (SS-CVO), IL-1 beta, TNF-alfa, IL-12, IFN-gama e IL-17 apresentaram redução significativa comparado com GC. Na IL-6, tanto os pacientes com AF e S β em EE e CVO apresentaram um aumento significativo comparado com GC. E em AF, IL-6, IL-12 e TNF-alfa os pacientes em CVO demonstraram uma redução em comparação com o perfil EE. O TNF, o grupo em S β -CVO apresentou redução significativa em comparação com todos os grupos: GC, SS-EE, SS-CVO e S β -EE.

Enquanto isso IL-12 apresentou um aumento significativo quando comparação S β -EE com SS-CVO. E os pacientes em S β -CVO apresentaram uma redução significativa comparada com os pacientes com AF. Os pacientes em CVO (SS e S β) apresentaram uma redução de IL-15 em comparação com o perfil de SS-EE. Enquanto esse grupo (SS-EE) apresenta-se elevado em comparação com GC. E para o perfil de IL-17, o grupo de SS-CVO apresentou redução em comparação com GC e SS-EE.

Nas citocinas regulatórias, IL-1RA e IL-4 apresentou reduzida em SS-CVO em comparação com SS-EE e GC, e para IL-4, em S β -CVO reduzida com a mesma característica. Na IL-5, o grupo de S β foi que apresentaram maior alteração sendo características de redução em comparação com o grupo GC, SS-EE e SS-CVO. Em IL-9, foi observado uma concentração reduzida nos grupos: SS-CVO e S β -EE e S β CVO. O perfil de IL-10, apresentou uma queda em todos os grupos de pacientes em comparação com GC. Enquanto que IL-13 também estava reduzido no grupo de pacientes.

Para os fatores de crescimento, PDGF apresentou redução em todos os grupos de pacientes comparado com os controles, enquanto que o G-CSF apresentou aumento em pacientes SS em comparação com GC. GM-CSF, IL-2 e IL-7 apresentaram em SS-CVO redução significativa comparado com GC. Em IL-7, o grupo SS-EE foi observado um leve aumento comparação com GC, enquanto que nos grupos S β (S β -EE), foi observado um leve aumento em comparação com SS-CVO, e reduzindo no período de crise (S β -CVO).

Figura 8: Perfil dos Mediadores Imunológicos Séricos de acordo com Gravidade Clínica

Legenda: Os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, regulatórias e fatores de crescimento foram analisados de acordo com a gravidade clínica da população de estudo. A quantificação dos mediadores foi realizada pela plataforma Luminex *Bio-plex*, descrita em Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados em gráficos de *box plot*, representando a distribuição dos valores de cada mediador em cada grupo. A linha central do *box* (caixa) indica a mediana (2º quartil); as extremidades da caixa correspondem ao primeiro e terceiro quartis; os “whiskers” (linhas verticais acima da caixa), foram definidos como percentis 10 e 90, representando a dispersão central dos dados; e os pontos ou *plots* (círculos, quadrados e triângulos) isolados, indicam valores fora dos percentis 10 e 90, ou seja, possíveis outliers. As comparações entre os grupos foram realizadas empregando o teste de *Mann-Whitney* e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As diferenças consideradas estatisticamente significantes foram representadas por letras, de acordo com as seguintes comparações: ^acomparações vs GC; ^bcomparações vs SS (EE); ^ccomparações vs SS (CVO); ^dcomparações vs S β (EE).

A análise das variações relativas (“*fold change*”) dos mediadores imunológicos séricos (**Figura 9**), foi utilizado como valor basal considerado como referência 1,0, indicando ausência de diferença relativa em relação ao GC (grupo controle). Assim, valores superiores a 1,0 refletem aumento e valores inferiores a 1,0 indicam redução relativa. Os pacientes com genótipo SS apresentaram aumento marcado em diversos mediadores inflamatórios. Entre os mediadores com maior magnitude de elevação destacam-se CCL3, CXCL10, IL-6, IL-15 e G-CSF, que

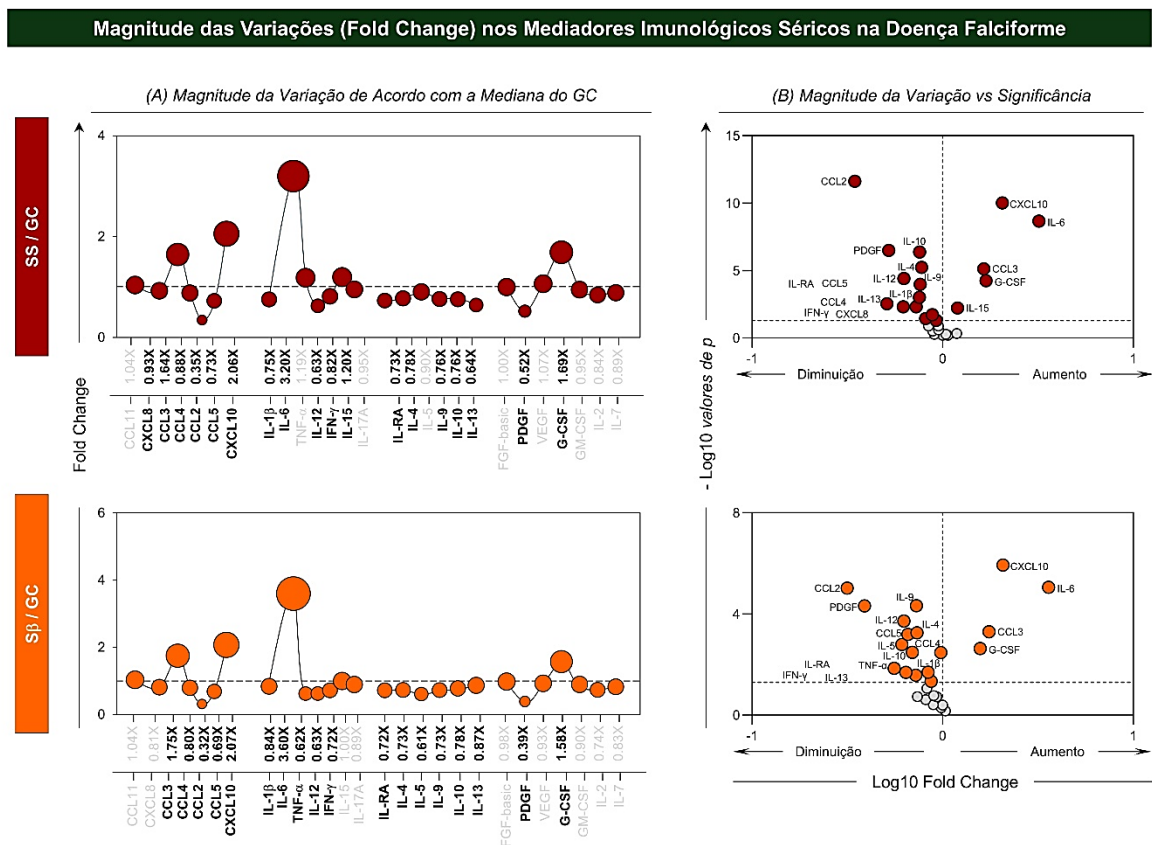
exibiram *fold change* entre 1-2 vezes, chegando em alguns casos perto de 4 vezes (IL-6) os valores observados no GC.

O *volcano plot* confirma esses achados, com CCL3, CXCL10, IL-6, IL-15 e G-CSF posicionando-se no quadrante superior direito, o que denota aumento expressivo associado a significância estatística ($p < 0,05$).

De maneira semelhante ao observado no grupo SS, pacientes com genótipo S β também exibiram elevação consistente de múltiplos mediadores inflamatórios. IL-6 novamente apresentou uma das maiores variações relativas, ultrapassando um *fold change* de aproximadamente 4 vezes em relação ao GC. Outros mediadores com elevação destacada incluem CCL3, CXCL10 e G-CSF, todos com *fold change* acima de 1,0.

O *volcano plot* deste grupo mostra que CXCL10, IL-6, CCL3 e G-CSF são os mediadores de maior relevância, localizando-se no quadrante superior direito, indicando simultaneamente alta magnitude de aumento e significância estatística.

Figura 9: Magnitude das Variações (*Fold change*) nos Mediadores Imunológicos Séricos na Doença Falciforme



Legenda: A variação relativa ou “*fold change*” de cada mediador em cada grupo, foi calculada empregando a mediana de cada molécula observada no grupo GC. Os valores são apresentados como variação relativa em cada grupo, refletindo a magnitude da diferença em relação a mediana do GC. A análise considerou o valor basal de variação relativa igual a 1,0 como referência, sendo $<1,0$ indicativo de redução e $>1,0$ indicativo de aumento. Os gráficos de “*fold change*” estão representados por plots e linhas suavizadas. Gráficos de *Volcano plot* foram elaborados para representar a relação entre a variação relativa dos mediadores imunológicos e a significância estatística ($p < 0,05$), obtida para cada molécula em cada grupo. A significância estatística representada nos gráficos foi derivada da análise comparativa onde empregou-se o teste de Mann-Whitney. O eixo X representa o valor de $\log_{10}$ *Fold change* e indica a magnitude da diferença de cada mediador em relação ao HC, enquanto o eixo Y - $\log_{10}$ valores de p, representa a significância estatística dessa diferença. Dessa forma, mediadores com elevada variação relativa ou “*fold change*” positivo e alta significância estatística localizam-se no quadrante superior direito, enquanto aqueles com elevada variação relativa ou “*fold change*” negativo e alta significância estatística situam-se no quadrante superior esquerdo. Mediadores com variação relativa $\leq 1,0$ e sem diferença estatística significativa estão destacados em cinza.

Dessa forma, quando foi realizado a análise utilizando como marcador de gravidade clínica (**Figura 10**) os aspectos: estacionário e crise, foi observado que pacientes SS em estado estacionário apresentaram elevação significativa de diversos mediadores inflamatórios. O maior aumento foi observado para IL-6, com *fold change* acima de 5 vezes em relação ao GC, seguido de elevações em CCL11, CXCL8, CXCL3, CXCL10, TNF- α , IL-15, todos com valores $>1,5-2,0$.

O *volcano plot* mostrou que IL-6, CXCL10, CCL3, IL-15, CXCL8, TNF- α , CCL11, G-CSF e IL-7, concentram-se no quadrante superior direito, indicando alta magnitude de aumento acompanhada de significância estatística ($p < 0,05$). Durante a CVO, observou-se um aumento expressivo em IL-6 e CXCL10 destacaram-se com *fold change* elevado, além de CCL3 e IL-10. No *volcano plot*, IL-6 aparece como o mediador mais destacado, com significativa magnitude de aumento e forte significância estatística. CXCL10, CCL3 e G-CSF também foram relevantes.

A comparação entre CVO e EE no genótipo SS revelou diferenças relacionadas ao estado inflamatório. A maioria dos mediadores apresentou *fold changes* próximos de 1,0, e com alta significância no *volcano plot* para os parâmetros de IL-9, TNF- α e IL-7 representando uma diminuição dessas moléculas.

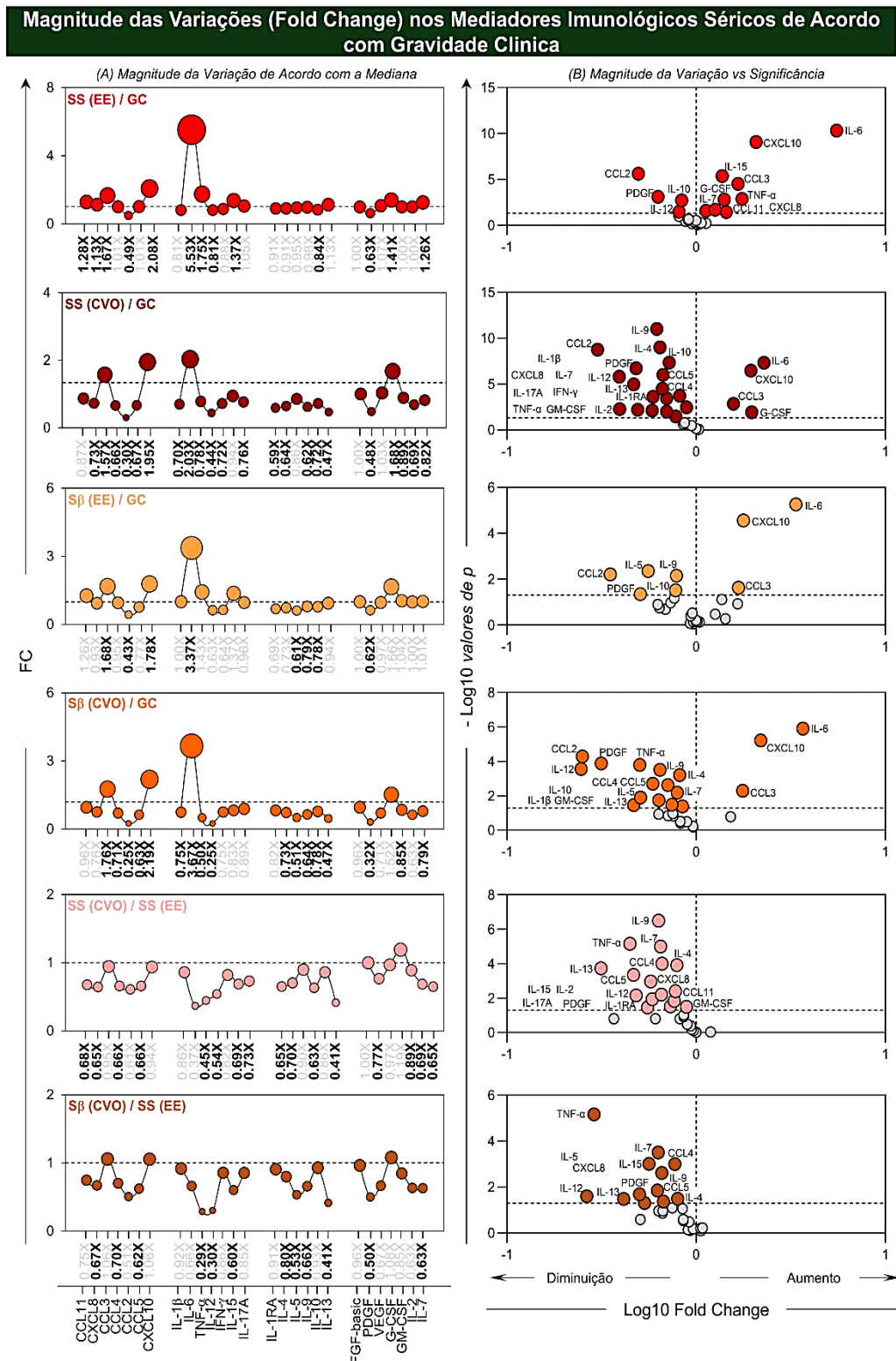
Ao observar o genótipo S β em EE, os pacientes S β em estado estacionário apresentaram perfil inflamatório semelhante ao genótipo SS, porém com menor intensidade global. Os maiores aumentos foram observados em IL-6, CCL3 e CXCL10, com valores entre 1,5 e 3,5 vezes o GC. No *volcano plot*, mediadores como IL-6, CXCL10, CCL3 apresentaram significância estatística relevante.

Durante a CVO, mediadores como IL-6, CXCL10 e CCL3 exibiram aumentos mais acentuados, chegando a magnitudes acima de 1–3 vezes, evidenciando que a crise exerce impacto inflamatório mais pronunciado nesse genótipo. No *volcano plot*, IL-6, CCL3 e

CXCL10 novamente se destacam como os mediadores mais elevados e estatisticamente significativos, reforçando seu papel central na resposta inflamatória aguda.

A comparação entre estados clínicos no genótipo S β revelou reduções relativas semelhantes ao genótipo SS. Foram observados: Redução de TNF- α , IL-5, IL-7, CCL4 e CXCL8, entre outras. O *volcano plot* mostra TNF- α como principal mediador diferencial entre CVO e EE, com significância estatística consistente.

Figura 10: Magnitude das Variações (*Fold change*) nos Mediadores Imunológicos Séricos de Acordo com Gravidade Clínica



Legenda: A variação relativa (“*fold change*”) de cada mediador em cada grupo foi calculada utilizando inicialmente a mediana das concentrações observadas no grupo GC, e depois, utilizando a mediana das concentrações observadas em SS (EE) e S β (EE) em cada subgrupo. Os valores são apresentados como variação relativa, refletindo a magnitude da diferença em relação à mediana do GC, SS (EE) e S β (EE). Considerou-se o valor de referência igual a 1,0, sendo valores <1,0 indicativos de redução e valores >1,0 indicativos de aumento. Os gráficos de “*fold change*” são apresentados como plots com linhas suavizadas. Foram produzidos gráficos do tipo *Volcano plot* para representar a relação entre a variação relativa dos mediadores imunológicos e a significância estatística ($p < 0,05$) obtida para cada molécula em cada grupo. A significância apresentada nos gráficos deriva de análises comparativas conduzidas com o teste de Mann-Whitney. O eixo X representa o valor em Log10 *Fold change* da magnitude da diferença de cada mediador em relação a sua respectiva comparação, enquanto o eixo Y, correspondente a -Log10 valores de p , expressa a significância dessa diferença. Assim, mediadores com variação relativa elevada (*fold change* positivo) e alta significância estatística posicionam-se no quadrante superior direito, enquanto aqueles com variação relativa elevada, porém negativa, e alta significância situam-se no quadrante superior esquerdo. Já os mediadores com variação relativa $\leq 1,0$ e sem diferença estatística significativa aparecem destacados em cinza.

A **Figura 11** apresenta uma análise integrada do perfil de mediadores imunológicos séricos em diferentes grupos avaliados: controles saudáveis (HC), anemia falciforme (SS), talassemia com HbS (S β). Para o gráfico de proporção de Indivíduos Acima da Mediana Global mostra que para cada citocina/quimiocina/fator de crescimento, a proporção de indivíduos em cada grupo que apresentou valores acima da mediana global. O HC predominantemente concentrações menores, sendo pontos mais próximos à faixa cinza inferior. O SS apresenta os maiores percentuais acima da mediana, indicando um estado inflamatório mais acentuado e o S β apresenta um padrão intermediário entre HC e SS.

Abaixo deste gráfico citado acima, há um painel de assinatura ascendente destacando os grupos. Os mediadores mais prevalentes entre HC são: IL-6, IL-15, CXCL10, CCL3, G-CSF, VEGF, CCL11, TNF- α , FGF-*basic*, destacando uma redução dessas moléculas de caráter inflamatório e um aumento das citocinas regulatórias e fatores de crescimento. O padrão mostra uma assinatura menos inflamatória.

Dentro do grupo SS — Anemia Falciforme, os mediadores com maior ascensão incluem: Elevações marcantes em VEGF, CCL11, TNF- α , IL-15, G-CSF, CCL3, IL-6, CXCL10. Com uma característica de assinatura mais intensa, compatível com inflamação crônica e ativa, marcada por: citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α) e quimiocinas de recrutamento celular (CCL2, CCL3, CXCL8).

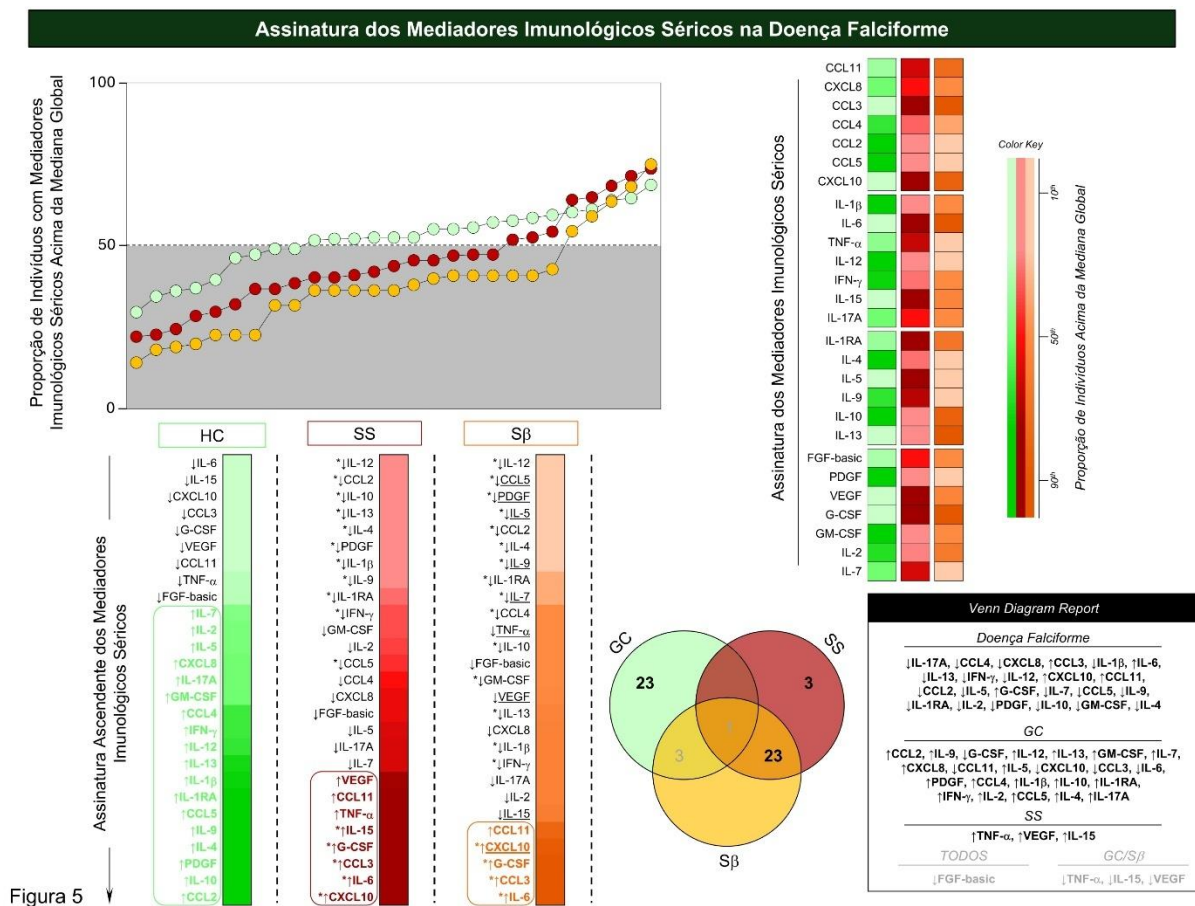
Já no grupo S β — Talassemia com HbS, apresentam mediadores intermediários, mas com alguns marcadores notavelmente elevados: CCL11, CXCL10, G-CSF, CCL3 e IL-6. O padrão sugere um estado inflamatório moderado, misto entre resposta Th1/Th2.

O heatmap (canto superior direito) organiza os mediadores em ordem e mostra o gradiente de proporção de indivíduos acima da mediana global. Sendo os tons verdes (HC), vermelho (SS) e laranja (S β), com o gradiente de coloração se intensificando em relação ao

aumento e apassivar em relação a diminuição. Os mediadores mais intensamente alterados em todos os grupos doentes são: CCL3, CXCL10, IL-6, IL-15, IL-1RA, VEGF e G-CSF, indicando ativação inflamatória sistêmica.

O diagrama de *Venn* compara quais mediadores se destacam especificamente em cada grupo e os que são compartilhados. Mediadores exclusivos de HC (23 mediadores): Relacionados a equilíbrio imunológico e menor inflamação. Os exclusivos de SS (3 mediadores): ↑ IL-15, ↑ VEGF e ↑ TNF- α , esses marcadores sugerem processo inflamatório persistente e ativação endotelial. E a interseção SS e S β (23 mediadores): Grande sobreposição mostra que ambos têm assinatura inflamatória semelhante, porém SS é mais intenso.

Figura 11: Assinatura dos Mediadores Imunológicos Séricos na Doença Falciforme



Legenda: As concentrações de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias e fatores de crescimento foram analisadas pela plataforma Luminex Bio-plex, conforme descrito em Materiais e Métodos. A Mediana Global foi calculada e utilizada como ponto de corte ou “cutt-off”, para representar a porcentagem de indivíduos em cada grupo (GC, SS e S β) que apresentaram valores superiores ao ponto de corte definido. A área sombreada em cinza destaca a faixa abaixo de 50%. Assim, o símbolo $\circ$ representa a assinatura ascendente dos mediadores no grupo GC, o símbolo $\bullet$ representa a assinatura ascendente do grupo SS, e o símbolo $\bullet$ representa a assinatura ascendente do grupo S β . A Assinatura Ascendente de Mediadores Imunológicos foi realizada utilizando a proporção de indivíduos acima do ponto de corte, e as setas indicam um aumento ou diminuição de cada molécula em relação ao ponto de corte. O teste de Chi-square foi utilizado para analisar diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação das proporções acima da mediana global analisadas em cada grupo vs GC, e vs SS. Os

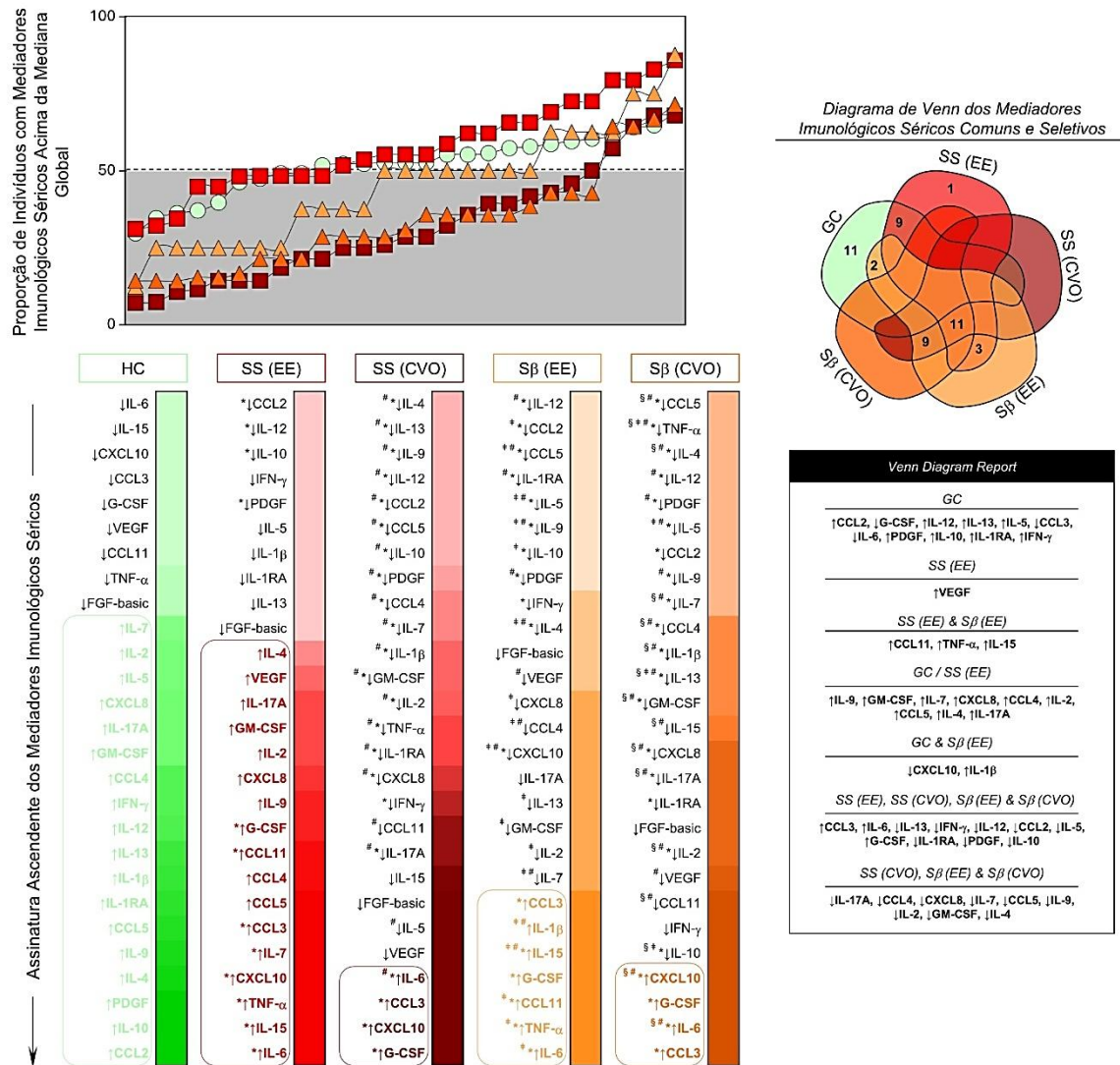
mediadores destacados com * são aqueles que apresentaram $p < 0,05$ nas comparações vs GC, e os mediadores que estão sublinhados, são aqueles que apresentaram $p < 0,05$ nas comparações vs SS. Colormaps classificados por mediador imunológico foram elaborados para ilustrar as proporções acima do ponto de corte em cada grupo. A análise por Diagrama de Venn foi realizada para identificar os mediadores imunológicos acima do ponto de corte, destacando aqueles compartilhados entre os grupos e os exclusivos de cada um.

Abordando o contexto de gravidade clínica com os mediadores imunológicos (**Figura 12**), é possível observar que existe uma proporção crescente dos mediadores que demonstra uma diferença marcante entre os grupos doentes e os controles. Os indivíduos SS-CVO apresentaram o maior número de mediadores acima da mediana, seguidos por SS-EE, S β -CVO e S β -EE, enquanto GC apresentou os menores valores. As flechas ao lado de cada painel indicam se cada molécula está aumentada ou diminuída em relação ao ponto de corte, permitindo visualizar padrões distintos de ativação imunológica. Os grupos SS-CVO e S β -CVO exibem um conjunto mais amplo de mediadores com significância estatística, reforçando o papel da inflamação sistêmica exacerbada durante a crise vaso-oclusiva.

O grupo GC apresenta a menor quantidade de mediadores acima da mediana global, refletindo um perfil imunológico basal e pouco inflamatório. Enquanto pacientes com AF (SS-EE) demonstram uma assinatura inflamatória já elevada mesmo em estado estacionário, com aumento de citocinas como IL-4, VEGF, IL-17A, GM-CSF entre outros, além de quimiocinas associadas ao recrutamento celular. Já na crise mostram uma assinatura mais intensa entre todos os grupos, com mediadores pró-inflamatórios, quimiocinas e fatores de crescimento amplamente elevados. Há destaque para aumentos em IL-6, CCL3, CXCL10, G-CSF, sinalizando hiperativação imunológica durante a crise.

Nos pacientes com S β dentro do perfil EE apresentam um perfil intermediário, com aumento moderado de citocinas como CCL3, IL-1 β , IL-15 entre outros, sugerindo ativação inflamatória mais branda em comparação aos pacientes SS. Na crise (S β -CVO) exibe elevação significativa de mediadores como IL-6, CCL3, CXCL10, G-CSF, mostrando que indivíduos S β também experimentam intensificação inflamatória durante a crise, embora com um padrão distinto de SS-CVO.

O diagrama de *Venn* apresenta os mediadores acima do ponto de corte que são compartilhados ou exclusivos, dentro do grupo GC: 11 mediadores exclusivos, representando um perfil imunológico de baixa ativação. SS-EE: 1 mediador exclusivo (VEGF). Os mediadores compartilhados entre todos os grupos doentes sugerem eixos inflamatórios centrais da fisiopatologia falciforme, enquanto os exclusivos de cada condição revelam potenciais marcadores de gravidade clínica.

Figura 12: Assinatura dos Mediadores Imunológicos Séricos de Acordo com Gravidade Clínica

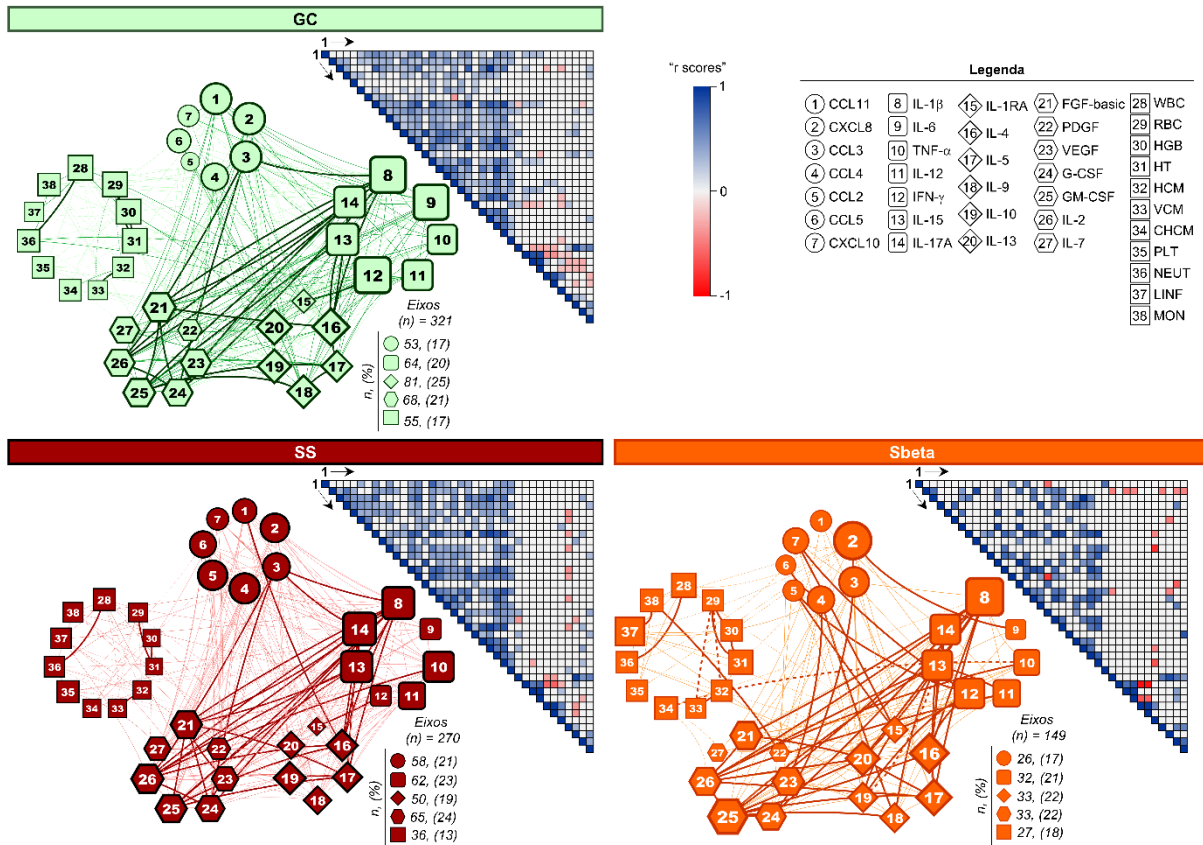
Legenda: As concentrações de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias e fatores de crescimento foram analisadas pela plataforma Luminex Bio-plex, conforme descrito em Materiais e Métodos. A Mediana Global foi calculada e utilizada como ponto de corte ou “cutt-off”, para representar a porcentagem de indivíduos em cada subgrupo (GC, SS (EE), SS (CVO), Sβ (EE), Sβ (CVO) que apresentaram valores superiores ao ponto de corte definido. A área sombreada em cinza destaca a faixa abaixo de 50%. Assim, o símbolo ● representa a assinatura ascendente dos mediadores no grupo GC, o símbolo ■ representa a assinatura ascendente do grupo SS (EE), o símbolo ■ representa a assinatura ascendente do grupo SS (CVO), o símbolo ▲ representa a assinatura ascendente do grupo Sβ (EE) e o símbolo ▲ representa a assinatura ascendente do grupo Sβ (CVO). A Assinatura Ascendente de Mediadores Imunológicos foi realizada utilizando a proporção de indivíduos acima do ponto de corte, e as setas indicam um aumento ou diminuição de cada molécula em relação ao ponto de corte. O teste de Chi-square foi utilizado para analisar diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação das proporções acima da mediana global analisadas em cada grupo versus GC. Os mediadores destacados com * são aqueles que apresentaram $p < 0,05$ nas comparações vs GC; # são aqueles que apresentaram $p < 0,05$ nas comparações vs SS (EE); † são aqueles que apresentaram $p < 0,05$ nas comparações vs SS (CVO); § são aqueles que apresentaram $p < 0,05$ nas comparações vs Sβ (EE). A análise por Diagrama de Venn foi realizada para identificar os mediadores imunológicos acima do ponto de corte, destacando aqueles compartilhados entre os grupos e os exclusivos de cada um.

Na **Figura 13**, onde é demonstrado redes e matrizes integrativas de mediadores solúveis e hemograma, é segregado em três grupos, sendo o GC (verde), SS (vermelho) e S β (laranja). No grupo GC, é possível observar um padrão de correlações equilibrado e moderado. A matriz triangular mostra predominância de correlações positivas (em azul) com intensidade fraca a moderada. A rede de interação revela uma organização compartimentalizada, onde os diferentes tipos de biomarcadores mantêm conexões independentes. Os nodos apresentam tamanhos semelhantes, indicando distribuição homogênea do número de correlações entre os parâmetros. As conexões são predominantemente de intensidade fraca a moderada, sugerindo um sistema imunológico em homeostase, sem hiperativação ou supressão significativa de vias específicas.

Os pacientes com genótipo SS demonstram um padrão alterado em relação ao GC. A matriz de correlação exibe maior densidade de correlações significativas, com presença de correlações tanto positivas quanto negativas. A rede de interação é mais complexa e interconectada, com múltiplos nodos de tamanho aumentado, indicando que determinados biomarcadores estabelecem conexões com numerosos outros parâmetros. Observam-se conexões mais espessas e intensas, representando correlações fortes entre diversos mediadores. Este perfil indica um estado inflamatório crônico com ativação sistêmica pronunciada, característico da fisiopatologia mais grave da Doença Falciforme no genótipo SS.

Enquanto que nos pacientes com S β apresenta características intermediárias entre o GC e o SS, porém com diferenças distintas. A matriz de correlação mostra densidade de interações aumentada em relação ao controle, mas menor que o grupo SS. A rede de interação revela vários nodos centrais de tamanho aumentado, indicando mediadores que funcionam como pontos de convergência na resposta imunológica. As conexões apresentam intensidade variável, com presença de correlações fortes, moderadas e fracas. A distribuição das conexões sugere ativação inflamatória significativa, porém com menor magnitude ou diferentes vias predominantes em comparação ao SS.

Figura 13: Matrizes e redes integrativas de mediadores solúveis e hemograma de acordo com genótipo da doença falciforme



Legenda: Matrizes de correlação abrangentes foram montadas com base nos escores de Spearman “r” entre quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias, fatores de crescimento e hemograma de pacientes com Doença Falciforme, posteriormente classificados de acordo com os genótipos SS e S β , e grupo de controles saudáveis. Visões gerais panorâmicas de correlação são mostradas como matrizes de modelo triangulares com cada interseção de quadrado representando o escore de correlação “r” entre pares de atributos, considerando correlações significativas ($p < 0,05$), escalonados de 1 a -1 com um gradiente para cores positivas (azul) e negativas (vermelho). Os quadrados cinzas representam correlações não significativas. As redes foram construídas usando um layout circular e agrupadas de acordo com os parâmetros analisados baseado em correlações significativas: quimiocinas (círculo, ○), citocinas pró-inflamatórias (quadrado com bordas arredondadas, □), citocinas regulatórias (losango, ◇), fatores de crescimento (hexágono, ⬡) e hemograma (quadrado com bordas finas, □). As linhas de conexão ilustram correlações fracas (0,1 a 0,35), moderadas (0,36 a 0,68) e fortes ($> 0,68$), a força da correlação é representada pela espessura e pela intensidade da cor. Correlações negativas são sublinhadas por linhas tracejadas. Os tamanhos dos atributos são proporcionais ao número de correlações. As redes são ilustradas nas cores do seu respectivo grupo.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelaram características sociodemográficas e laboratoriais importantes em pacientes com doença falciforme acompanhados na Fundação HEMOAM. A mediana de idade de 22,5 a 23 anos entre os grupos estudados e estes dados corroboram com a literatura nacional, com predominância feminina na população do Amazonas com DF, com atendimentos em centros com atenção especializada e referências na área hemoterápica (Brasil; Saúde; Urgência, 2015; Cesar et al., 2019). Entretanto, essa maior frequência feminina pode estar relacionada a maior adesão às consultas ambulatoriais e busca por atendimento médico, padrão observado em diversos serviços de saúde brasileiros (Cobo; Cruz; Dick, 2021).

A autodeclaração predominante como pardo reflete a miscigenação da população brasileira, especialmente na região Norte, onde a prevalência da doença falciforme está diretamente relacionada à ancestralidade africana (Piel; Steinberg; Rees, 2017b). A concentração de pacientes residentes em Manaus evidencia a centralização do atendimento especializado na capital amazonense, criando desafios de acesso para populações do interior do estado (Brasil; Saúde; Urgência, 2015; Cardoso et al., 2021; Cesar et al., 2019).

Quanto ao perfil vacinal, a alta adesão à vacinação contra COVID-19 demonstra conscientização sobre a vulnerabilidade deste grupo. Estudos demonstram que pacientes com doença falciforme apresentam risco aumentado de complicações graves por COVID-19, incluindo síndrome torácica aguda e crises vaso-oclusivas (Abdulrahman et al., 2021; Clift et al., 2021). A menor adesão ao esquema completo de quatro doses pode refletir barreiras de acesso ou desconhecimento sobre a importância das doses de reforço nesta população imunocomprometida.

Alguns fatores que podem ser considerados para a taxa estar reduzida no índice vacinal de 4 doses na população SS é a falsa percepção de redução de risco associado a normalização do estado CVO para o estado EE, enquanto que pacientes em S β por apresentarem um curso clínico mais brando, podem ter maior mobilidade e oportunidades de buscar ativamente a imunização. No grupo SS, especialmente em estado estacionário, 17 dos 28 pacientes vacinados (60,7%) completaram as quatro doses, enquanto no grupo em crise vaso-oclusiva, 10 dos 25 pacientes (40%) alcançaram o esquema completo. Já nos pacientes S β , a adesão às quatro doses foi consideravelmente menor: 6 dos 11 pacientes em estado estacionário (54,5%) e apenas 2 dos 13 pacientes em crise vaso-oclusiva (15,38%). Esta discrepância sugere que, apesar da maior adesão inicial, o grupo S β apresentou menor engajamento com o esquema de reforços, o

que pode refletir uma percepção equivocada de menor vulnerabilidade à COVID-19 ou menor orientação médica específica sobre a importância das doses de reforço nesta população.

Este achado é preocupante considerando que estudos demonstram que pacientes com hemoglobinopatias, apresentam comprometimento imunológico que pode afetar tanto a magnitude quanto a durabilidade da resposta vacinal (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019; Rodrigues Chagas et al., 2019). A literatura mostra que cerca de 85% dos pacientes com hemoglobinopatias desenvolvem resposta de anticorpos neutralizantes após a vacinação contra COVID-19, porém esta resposta é notavelmente heterogênea e influenciada pela história de infecção prévia e pelo número de doses administradas. Dado que a maioria dos pacientes com anemia falciforme é categorizada como imunocomprometida devido ao estado hipoesplênico e à inflamação crônica, a completude do esquema vacinal com doses de reforço é fundamental para garantir proteção adequada e duradoura (Han; Saraf; Gordeuk, 2023b; Mucalo et al., 2021; Varelas et al., 2022d).

As alterações hematológicas observadas são consistentes com a fisiopatologia da doença. A redução significativa de eritrócitos totais em pacientes SS-EE comparados aos S β -EE reflete a maior gravidade da anemia no genótipo homozigoto, onde há produção exclusiva de hemoglobina S (Ware et al., 2017b). Os valores reduzidos de HCM e VCM em pacientes S β -talassemia em comparação com SS refletem a influência da talassemia beta na síntese de hemoglobina, característica microcítica e hipocrômica típica desta condição (Costa; Conran; Fertrin, 2013b).

A leucocitose e neutrofilia observadas durante crises vaso-oclusivas no grupo SS confirmam o estado inflamatório agudo característico destes eventos. A hemólise intravascular libera hemoglobina livre e heme, reconhecidos como DAMPs que ativam neutrófilos e promovem liberação de NETs, perpetuando o ciclo inflamatório e vaso-oclusivo (Kato et al., 2018b; Kato; Steinberg; Gladwin, 2017b).

A análise imunofenotípica revelou alterações de linfócitos T em pacientes com doença falciforme. A redução significativa de linfócitos T CD3⁺ totais, CD4⁺ e CD8⁺ em comparação ao grupo controle confirma achados prévios de linfopenia característica desta população (Balandya et al., 2016b; Daltro et al., 2020b).

A depleção acentuada de células T CD4⁺ e CD8⁺ naive (CCR7⁺CD45RA⁺) observada neste estudo sugere envelhecimento imunológico precoce, fenômeno descrito por Vingert et al. (2015b) em pacientes politransfundidos. A exposição crônica a antígenos, incluindo produtos da hemólise, transfusões sanguíneas repetidas e infecções recorrentes, promove diferenciação acelerada de células naive em células de memória e efectoras (Estipona, 2020).

O aumento significativo de células T CD4⁺ TCM (memória central, CCR7⁺CD45RA⁻) e TEM (memória efetora, CCR7⁻CD45RA⁻) em pacientes com doença falciforme reflete ativação imunológica crônica. Estas subpopulações expandidas mantêm capacidade de resposta rápida a antígenos previamente encontrados, mas sua predominância sobre células T naïve reduz a diversidade do repertório imunológico e a capacidade de responder a novos patógenos, o que consequentemente pode gerar aberturas para uma resposta mais diversificada (de Azevedo; Malmegrim, 2020b).

A redução das células TEMRA (CCR7⁻CD45RA⁺) tanto em CD4⁺ quanto CD8⁺ representam o estágio terminal de diferenciação com capacidade citotóxica e efetora na mediação de mediadores imunológicos imediata e comprometida em comparação com os níveis de TEM e TCM. Balandya et al., (2017b) demonstraram resultados contrários em que foi observada alterações em todas as subpopulações de linfócitos T, incluídas neste estudo, em pacientes com doença falciforme, estão mais elevados em comparação com um grupo controle em crianças de 1 a 6 anos na Tanzânia.

A redução de células T CD8⁺ TCM observada sugere transição acelerada para fenótipos mais diferenciados, compatível com o estado pró-inflamatório crônico. A diminuição concomitante de CD8⁺ TEM, TCM e TEMRA pode indicar exaustão imunológica, caracterizada pela expressão aumentada de receptores inibitórios como PD-1 e CTLA-4, fenômeno descrito em condições de estimulação antigênica persistente (Vingert et al., 2015b).

A análise do perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento revelou um padrão inflamatório complexo e desregulado em pacientes com doença falciforme. A elevação marcante de CCL3 e CXCL10 em todos os grupos de pacientes comparados aos controles reflete ativação persistente de vias inflamatórias. CCL3 está envolvida no recrutamento de monócitos, células T e NK, enquanto CXCL10 é uma quimiocina associada à resposta Th1 e recrutamento de linfócitos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

A redução de CCL4, CCL2 e CCL5 durante crises vaso-oclusivas, pode indicar que apesar do estado inflamatório, pode refletir consumo tecidual destas quimiocinas nos sítios de lesão vascular, ou regulação negativa compensatória. Silva-Junior et al. (2021) demonstraram que durante eventos agudos, há redistribuição de mediadores inflamatórios do compartimento circulante para os tecidos afetados.

A elevação consistente de IL-6 em todos os grupos de pacientes, com elevações maiores durante crises vaso-oclusivas (*fold change* >4-5x), confirma seu papel central na fisiopatologia da doença falciforme. IL-6 é uma citocina que promove resposta de fase aguda, ativa endotélio vascular e contribui para o estado pró-trombótico característico da doença (Ataga; Orringer,

2003; Gladwin; Kato, 2008b). Níveis elevados de IL-6 correlacionam-se com maior frequência de crises e pior prognóstico.

A redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IFN- γ durante crises vaso-oclusivas, em contraste com a elevação de IL-6, sugere padrões distintos de ativação imunológica. Enquanto IL-6 é produzida por múltiplas fontes celulares em resposta a DAMPs como heme livre, outras citocinas podem sofrer regulação negativa por mecanismos compensatórios ou exaustão celular (Kato et al., 2018b).

A redução generalizada de citocinas regulatórias (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-1RA) em pacientes comparados a controles indica comprometimento dos mecanismos anti-inflamatórios endógenos. IL-10 é particularmente importante na modulação da resposta inflamatória excessiva, e sua deficiência pode contribuir para a perpetuação do estado inflamatório crônico (de Azevedo; Malmegrim, 2020b).

O aumento de G-CSF em pacientes com doença falciforme reflete estimulação medular compensatória em resposta à anemia hemolítica crônica. G-CSF promove proliferação e diferenciação de neutrófilos, que desempenham papel dual na doença: participam da defesa contra infecções, mas também contribuem para lesão vascular através da liberação de NETs e enzimas proteolíticas (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019; Gladwin; Kato, 2008b).

A redução de PDGF em todos os grupos de pacientes sugere comprometimento de processos de reparo vascular, o que pode contribuir para complicações crônicas como úlceras de membros inferiores e vasculopatia cerebral (Czarkowska-Paczek; Bartłomiejczyk; Przybylski, 2006). A análise de *fold change* e *volcano plots* confirma que IL-6, CXCL10, CCL3 e G-CSF são os mediadores mais alterados, representando potenciais biomarcadores de atividade inflamatória na doença falciforme.

Comparando estados clínicos (EE vs CVO), observa-se que a transição para crise amplifica seletivamente mediadores específicos (IL-6, CXCL10, CCL3), enquanto reduz outros (IL-1 β , TNF- α , IL-7, IL-9), sugerindo reprogramação imunológica. Este perfil bifásico pode refletir diferentes estágios de ativação celular e mecanismos regulatórios adaptativos.

A análise de redes integrativas revelou arquiteturas distintas de correlações entre mediadores imunológicos e parâmetros hematimétricos nos diferentes grupos estudados. O grupo controle apresentou padrão equilibrado com correlações moderadas e distribuição homogênea, refletindo homeostase imunológica. Em pacientes SS, a rede mais complexa e densamente interconectada, com múltiplos nodos centrais de tamanho aumentado, indica ativação sistêmica pronunciada. Esta hiperconectividade sugere que alterações em um único parâmetro podem ter efeitos em cascata sobre múltiplos outros, explicando a variabilidade

clínica e complicações observadas na prática clínica (Kato et al., 2018b; Kato; Steinberg; Gladwin, 2017b; Ware et al., 2017b).

O padrão intermediário observado em pacientes S β , com densidade de interações aumentada, mas inferior ao grupo SS, reflete fisiopatologia menos grave (Driscoll, 2007). A presença de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina A residual em alguns pacientes S β confere proteção parcial contra polimerização e hemólise, modulando a intensidade da resposta inflamatória (Piel; Steinberg; Rees, 2017b).

As correlações fortes entre parâmetros inflamatórios (citocinas, quimiocinas) e hematimétricos (leucócitos, neutrófilos, plaquetas) confirmam a interconexão entre hemólise, inflamação e vaso-oclusão - os três pilares fisiopatológicos da doença falciforme. Gladwin; Kato, (2008b) demonstraram que produtos da hemólise agem como DAMPs que ativam leucócitos e plaquetas, perpetuando o ciclo inflamatório.

A análise por genótipo e gravidade clínica revelou que a transição de estado estacionário para crise vaso-oclusiva envolve reorganização substancial da arquitetura de rede, com aparecimento de novas correlações e desaparecimento de outras. Esta plasticidade sugere que mecanismos fisiopatológicos distintos predominam em diferentes contextos clínicos, com implicações para estratégias terapêuticas que devem ser adaptadas ao estado clínico do paciente (Kato et al., 2018b; Piel; Steinberg; Rees, 2017b).

O presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Primeiramente, o delineamento transversal do estudo não permitiu o acompanhamento longitudinal dos pacientes antes e após a vacinação, o que limita conclusões sobre a dinâmica temporal da resposta imunológica induzida pela vacina contra a COVID-19. A ausência de coletas pareadas (pré e pós-vacinação) em todos os participantes representa uma restrição metodológica relevante para a inferência de causalidade entre a imunização e os parâmetros imunológicos observados.

Em segundo lugar, os 73 participantes vacinados receberam quatro imunizantes de plataformas tecnológicas distintas — CoronaVac (vírus inativado), AstraZeneca/Fiocruz (vetor viral recombinante), Pfizer/BioNTech (mRNA) e Janssen (vetor viral) —, em proporções desiguais, sendo 27 (37%), 18 (24,7%), 27 (37%) e 1 (1,4%), respectivamente. Dado que cada plataforma vacinal induz perfis e magnitudes de resposta imune distintos, a não estratificação das análises por tipo de vacina pode constituir uma variável de confusão nos resultados. Estudos futuros com maior poder amostral são necessários para avaliar o impacto diferencial de cada plataforma vacinal na resposta imunológica de pacientes com Doença Falciforme.

Por fim, embora o protocolo de imunofenotipagem tenha contemplado marcadores para linfócitos T e B, a análise funcional das células B — incluindo a avaliação da produção de anticorpos específicos anti-Spike — não foi realizada neste estudo, o que limita a compreensão integral da resposta humoral induzida pela vacinação nesta população.

7. CONCLUSÃO

Este estudo apresentou uma caracterização abrangente do perfil imunológico de pacientes com doença falciforme no contexto da vacinação contra COVID-19, revelando alterações complexas que refletem o estado inflamatório crônico característico desta hemoglobinopatia. A análise do perfil clínico e laboratorial demonstrou que pacientes com genótipo SS apresentam manifestações mais graves da doença, evidenciadas por maior anemia, leucocitose e neutrofilia durante crises vaso-oclusivas. A alta adesão à vacinação contra COVID-19 observada indica conscientização desta população vulnerável sobre os riscos da infecção, embora a adesão completa ao esquema de quatro doses ainda seja um fator a considerar para ser trabalhado, onde é observado uma necessidade de estratégias de educação em saúde.

A caracterização imunofenotípica revelou alterações de linfócitos T, com redução significativa de células T CD4⁺ e CD8⁺ totais, depleção acentuada de células naive e expansão de subpopulações de memória central e efetora. Este perfil sugere imunossenescência precoce e ativação crônica do sistema imune, com potenciais implicações para a capacidade de resposta a novos antígenos vacinais e suscetibilidade a infecções. Todavia, estudos mostraram que a resposta além da resposta celular, a via humoral continua a atuar na proteção contra a infecção por SARS-CoV-2 (Varelas et al., 2022e). A redução concomitante de células TEMRA pode indicar exaustão imunológica resultante da estimulação antigênica persistente característica da doença falciforme, pois apesar da ação imediata, possui capacidade proliferativa reduzida (D'Asaro et al., 2006).

O perfil de mediadores solúveis demonstrou padrão inflamatório desregulado, com elevação marcante de IL-6, CCL3 e CXCL10, acompanhada de redução de citocinas regulatórias como IL-10 e IL-4. A magnitude das alterações foi particularmente evidente durante crises vaso-oclusivas, com IL-6 apresentando aumentos superiores a 4-5 vezes em relação aos controles saudáveis. A redução generalizada de citocinas anti-inflamatórias indica comprometimento dos mecanismos regulatórios, contribuindo para o estado inflamatório crônico.

A análise integrativa de redes revelou arquiteturas distintas de correlações entre mediadores imunológicos e parâmetros hematimétricos, com pacientes SS apresentando maior complexidade e densidade de interconexões, refletindo ativação sistêmica. Esta hiperconectividade sugere que intervenções terapêuticas direcionadas a mediadores-chave podem ter efeitos em cascata sobre múltiplos parâmetros inflamatórios.

Em conjunto, os resultados demonstram que pacientes com doença falciforme apresentam um perfil imunológico caracterizado por ativação crônica, depleção de compartimentos celulares virgens, inflamação sistêmica desregulada e comprometimento de mecanismos regulatórios. Estas alterações podem impactar a qualidade e duração da resposta vacinal contra COVID-19.

Os achados deste estudo contribuem para melhor compreensão dos mecanismos imunológicos na doença falciforme e fornecem bases para desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais personalizadas. A identificação de biomarcadores inflamatórios específicos (IL-6, CXCL10, CCL3) abre perspectivas para monitoramento da atividade inflamatória e avaliação de resposta terapêutica. Estudos futuros devem avaliar a correlação entre estes parâmetros imunológicos e os títulos de anticorpos anti-*Spike*, bem como a durabilidade da resposta vacinal nesta população.

Conclui-se que a caracterização do perfil imunológico de pacientes com doença falciforme é essencial para otimização de estratégias de imunização e desenvolvimento de abordagens terapêuticas imunomoduladoras que possam atenuar o estado inflamatório crônico e suas complicações clínicas.

8. EQUIPE DE PESQUISA

Nº	Integrante	Instituição	Formação	Função
01	Evilázio Cunha Cardoso	UFAM/ HEMOAM	Enfermeiro, MsC.	Aluno de doutorado
02	Adriana Malheiro Alle Marie	UFAM/ HEMOAM	Bióloga, Dr.	Pesquisadora, orientadora do projeto.
03	Erich Vinicius de Paula	UNICAMP	Médico, Dr.	Pesquisador, coorientador do projeto
04	Andréa Monteiro Tarragô	HEMOAM	Farmacêutica, Dr.	Pesquisadora, colaboradora do projeto.
05	Allyson Guimarães da Costa	UFAM/ HEMOAM	Enfermeiro, Dr.	Pesquisador, colaborador do projeto e nas análises estatísticas.
06	Nelson Abraham Fraiji	HEMOAM	Médico, Dr.	Colaborador na análise dos dados e interpretação dos resultados
07	Alexander Leonardo Silva Junior	UFAM/ HEMOAM	Biomédico, MSc.	Colaborador do projeto, auxiliar na coleta das amostras e nas análises estatísticas.
08	Nara Caroline Toledo Belezia	UEA/ HEMOAM	Biomédica, Esp.	Colaboradora no recrutamento e aquisição das amostras
09	Lucas da Silva Oliveira	UFAM/ HEMOAM	Biomédico, MSc.	Colaborador do projeto, auxiliar na coleta das amostras e nas análises estatísticas.
10	Stephanny Dias Leite Mendonça	UEA/ HEMOAM	Farmacêutica, MSc.	Colaboradora no recrutamento e aquisição das amostras
11	Mayara Costa Batista Façanha	UEA/ HEMOAM	Biomédica, Esp.	Colaboradora no recrutamento e aquisição das amostras
12	Suelen Cristina Teixeira Farias	UFAM/ HEMOAM	Biomédica, Esp.	Colaborador no recrutamento e aquisição das amostras
13	Jonatas Alencar Castro Campelo	HEMOAM	Farmacêutico	Colaborador no recrutamento e processamento das amostras
14	Luiz Carlos Rodrigues Lisboa	HEMOAM	Aluno de graduação	Colaborador no recrutamento e processamento das amostras
15	Nathacha Lima Azevedo	HEMOAM/UEA	Biomédica, Esp.	Colaborador no recrutamento e processamento das amostras
16	Geyse Adriana da Silva Soares	HEMOAM/UFAM	Biomédica, MSc.	Colaborador do projeto, auxiliar na coleta das amostras e nas análises estatísticas.
17	Wivian da Conceição Costa-da-Silva	HEMOAM/UFAM	Biomédica, MSc.	Colaborador do projeto, auxiliar na coleta das amostras e nas análises estatísticas.

9. CRONOGRAMA

Atividade	2022		2023		2024		2025
	1º Sem	2º Sem	1º Sem	2º Sem	1º Sem	2º Sem	1º Sem
Submissão ao CEP-HEMOAM	R						
Revisão de literatura	R	R	R	R	R	R	R
Compra de materiais	R						
Coleta de material biológico e recrutamento		R	R	R	R		
Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo		R	R	R	R		
Qualificação						R	
Dosagem dos anticorpos						R	
Dosagem das moléculas						R	
Análise de resultados				R	R	R	R
Produção bibliográfica/tecnológica				R	R	R	R
Apresentação e defesa da tese							R

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. [s.l.] Elsevier, 2019.

ABDULKARIM ABDULRAHMAN et al. COVID-19 and Sick Cell Disease in Bahrain. **Jornal Internacional de Doenças Infecciosas**, 2020.

ABDULRAHMAN, A. et al. Is sickle cell disease a risk factor for severe COVID-19 outcomes in hospitalized patients? A multicenter national retrospective cohort study. **eJHaem**, v. 2, n. 2, p. 167–174, 2021.

AL-ANSARI, R. Y. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in special groups: A single-center experience in sickle cell disease patients in Saudi Arabia. **Journal of Family and Community Medicine**, v. 29, n. 1, p. 71–78, 2022.

ARAF, Y. et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 5, p. 1825–1832, 2022.

ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 2017.

ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1469–1483, 2007.

ATAGA, K. I. et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. **haematologica/the hematology journal**, v. 93, 2008.

ATAGA, K. I.; ORRINGER, E. P. Hypercoagulability in sickle cell disease: A curious paradox. **American Journal of Medicine**, v. 115, n. 9, p. 721–728, 2003.

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, 2016a.

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, 2016b.

BALANDYA, E. et al. Increased memory phenotypes of CD4⁺ and CD8⁺ t cells in children with sickle cell anaemia in Tanzania. **Tanzania Journal of Health Research**, v. 19, n. 2, p. 1–12, 2017a.

BALANDYA, E. et al. Increased memory phenotypes of CD4+ and CD8+ T cells in children with sickle cell anaemia in Tanzania. **Tanzania Journal of Health Research**, v. 19, n. 2, 8 abr. 2017b.

BRASIL, M. DA S.; SAÚDE, S. DE A. À; URGÊNCIA, D. DE A. H. **Doença Falciforme - Diretrizes básicas da linha de cuidado**. Brasília: [s.n.]. . Acesso em: 9 jan. 2026.

CARDOSO, E. C. et al. Changes in heme levels during acute vaso-occlusive crisis in sickle cell anemia. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 16, n. 2, p. 124–132, 21 ago. 2021.

CESAR, P. et al. Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. **Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 12, n. 4, p. 204–210, 2019.

CHIATTONE, C. Vacinação Para Covid-19 Em Pacientes Com Doenças Hematológicas. **Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, p. 1–8, 2022.

CLIFT, A. K. et al. Sickle Cell Disorders and Severe COVID-19 Outcomes: A Cohort Study. <https://doi.org/10.7326/M21-1375>, v. 174, n. 10, p. 1483–1487, 20 jul. 2021.

COBO, B.; CRUZ, C.; DICK, P. C. Desigualdades de gênero e raciais no acesso e uso dos serviços de atenção primária à saúde no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 9, p. 4021–4032, 27 set. 2021.

COSTA, F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Anemia Falciforme. Em: ZAGO, M.; FALCAO, R.; PASQUINI, R. (Eds.). **Tratado de Hematologia**. 1a. ed. [s.l: s.n.]. p. 205–24.

COSTA, F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Anemia Falciforme. Em: ZAGO, M.; FALCAO, R.; PASQUINI, R. (Eds.). **Tratado de Hematologia**. 1a. ed. [s.l: s.n.]. p. 205–24.

CREECH, C. B.; WALKER, S. C.; SAMUELS, R. J. SARS-CoV-2 Vaccines. **Clinical Review & Education**, v. 325, n. 13, p. 2021–2023, 2021.

CZARKOWSKA-PACZEK, B.; BARTLOMIEJCZYK, I.; PRZYBYLSKI, J. The serum levels of growth factors: PDGF, TGF-beta and VEGF are increased after strenuous physical exercise. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 2006.

DALTRO, P. B. et al. CD4+T Cell Profile and Activation Response in Sickle Cell Disease Patients with Osteonecrosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020a.

DALTRO, P. B. et al. CD4+T Cell Profile and Activation Response in Sickle Cell Disease Patients with Osteonecrosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020b.

D'ASARO, M. et al. Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease. **Leukemia**, v. 20, n. 3, p. 545–547, 2006.

DE AZEVEDO, J. T. C.; MALMEGRIM, K. C. R. Immune mechanisms involved in sickle cell disease pathogenesis: current knowledge and perspectives. **Immunology Letters**, v. 224, n. May, p. 1–11, 2020a.

DE AZEVEDO, J. T. C.; MALMEGRIM, K. C. R. Immune mechanisms involved in sickle cell disease pathogenesis: current knowledge and perspectives. **Immunology Letters**, v. 224, n. May, p. 1–11, 2020b.

DE WIT, E. et al. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523–534, 2016.

DRISCOLL, M. C. Sickle Cell Disease. **Pediatrics In Review**, v. 28, n. 7, p. 259–268, 1 jul. 2007.

ESCANDÓN, K. et al. COVID-19 false dichotomies and a comprehensive review of the evidence regarding public health, COVID-19 symptomatology, SARS-CoV-2 transmission, mask wearing, and reinfection. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–47, 2021.

ESTIPONA, D. **A Guide to T Cell Markers | Biocompare: The Buyer's Guide for Life Scientists**. Disponível em: <<https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/569888-A-Guide-to-T-Cell-Markers/>>. Acesso em: 9 jan. 2026.

FITA, A. Z. et al. COVID-19 infection induced health complications among sickle cell disease patients in the eastern province of Saudi Arabia. **International Journal of Medicine in Developing Countries**, v. 8, n. 12, p. 3626–3626, 22 jan. 2024.

FRAZÃO, G. Governo Federal reforça necessidade do diagnóstico precoce da Doença Falciforme. **Ministério da Saúde**, p. 5–6, 2022.

FRIEDMAN, E. et al. COVID19 vaccination in adults with sickle cell disease is not associated with increases in rates of pain crisis. **Hematology (United Kingdom)**, v. 27, n. 1, p. 742–744, 2022.

GIATAGANTZIDOU, I. et al. Pb2236: Humoral Response To Sars-Cov-2 Vaccination With Bnt162B2 Covid-19 Mrna in Patients With Haemoglobinopathies. **HemaSphere**, v. 6, p. 2106–2107, 2022.

GLADWIN, M. T.; KATO, G. J. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: The plot (and blood) thickens! **Haematologica**, v. 93, n. 1, p. 1–3, 2008a.

GLADWIN, M. T.; KATO, G. J. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: The plot (and blood) thickens! **Haematologica**, v. 93, n. 1, p. 1–3, 2008b.

GUPTA, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 2020.

HAN, J.; SARAF, S. L.; GORDEUK, V. R. Vaccination in sickle cell disease: Immunocompromised or immunocompetent? **British Journal of Haematology**, v. 202, n. 5, p. 916–918, 2023a.

HAN, J.; SARAF, S. L.; GORDEUK, V. R. Vaccination in sickle cell disease: Immunocompromised or immunocompetent? **British Journal of Haematology**, v. 202, n. 5, p. 916–918, 2023b.

HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G.; NATH, K. A. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxis. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 4, p. 271–92, dez. 2009.

HIGUERA, D.; BRAVO, M.; GUERRERO, B. Hemostasis alterations in sickle cell syndrome. **Investigación clínica**, v. 55, n. 2, p. 173–84, 2014.

JAN, H. et al. COVID-19: Review of Epidemiology and Potential Treatments Against 2019 Novel Coronavirus. **Discoveries**, v. 8, n. 2, p. e108, 2020.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018a.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018b.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, jan. 2007.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017a.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017b.

LAUXMANN, M. A.; SANTUCCI, N. E.; AUTRÁN-GÓMEZ, A. M. The SARS-CoV-2 coronavirus and the COVID-19 outbreak. **International Braz J Urol**, v. 46, n. Suppl 1, p. 6–18, 2020.

LI, H. et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. **The Lancet**, v. 395, n. 10235, p. 1517–1520, 2020.

MEIER, E. R.; ABRAHAM, A.; FASANO, R. M. **Sickle cell disease and hematopoietic stem cell transplantation**. [s.l: s.n.].

MUCALO, L. et al. Comorbidities are risk factors for hospitalization and serious COVID-19 illness in children and adults with sickle cell disease. **Blood advances**, v. 5, n. 13, p. 2717–2724, 13 jul. 2021.

NAKAHARA, H. et al. Enhanced IgG immune response to COVID-19 vaccination in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 202, n. 5, p. 937–941, 2023.

NAQVI, A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, 2020.

NATH, K. A.; HEBBEL, R. P. Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. **Nature reviews. Nephrology**, v. 11, n. 3, p. 161–71, mar. 2015.

PANG, J. et al. Potential rapid diagnostics, vaccine and therapeutics for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): A systematic review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, 2020.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017a.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017b.

PRÜB, B. M. Variants of SARS CoV-2: mutations, transmissibility, virulence, drug resistance, and antibody/vaccine sensitivity. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 27, n. 2, 2022.

RADHWI, O. O. et al. Imunogenicidade das vacinas BNT162b2 COVID-19 mRNA e ChAdOx1 nCoV-19 em pacientes com hemoglobinopatias. **Vaccines**, p. 1–10, 2022.

RODRIGUES CHAGAS, S. et al. Vacinas e suas reações adversas: revisão. **PUBVET - Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 8, 2019.

SARVEPALLI, D. Coronavirus Disease 2019: A Comprehensive Review of Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Ongoing Clinical Trials. **Cureus**, v. 12, n. 5, 2020.

SAÚDE, M. DA. **Doença Falciforme**. , 2018.

SAÚDE, M. DA. **Conscientização sobre a Doença Falciforme é debatida no Hemoam.** [s.l: s.n.].

SAÚDE, M. DA. **Hemoglobinopatias.** [s.l: s.n.].

SAYAD, B.; KARIMI, M.; RAHIMI, Z. Sick cell disease and COVID-19: Susceptibility and severity. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 68, n. 8, p. 1–9, 2021.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: Current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–22, 2019.

SILVA FILHO, P. S. DA P. et al. Vacinas contra Coronavírus (COVID-19; SARS-COV-2) no Brasil: um panorama geral. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e26310817189, 2021.

SILVA-JUNIOR, A. L. et al. Immunological Hallmarks of Inflammatory Status in Vaso-Occlusive Crisis of Sick cell Anemia Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 559925, 11 mar. 2021.

SINGH, Y. et al. COVID-19 transmission through host cell directed network of GPCR. **Drug Development Research**, v. 81, n. 6, p. 647–649, 2020.

STYPULKOWSKI, J. B.; MANFREDINI, V. Changes in hemostasis in sick cell disease patients. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 1, 2010.

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020.

VARELAS, C. et al. Immune Response of Adult Sick cell Disease Patients after COVID-19 Vaccination: The Experience of a Greek Center. **Diário de Medicina Clínica**, v. 11, n. 937, 2022a.

VARELAS, C. et al. Immune Response of Adult Sick cell Disease Patients after COVID-19 Vaccination: The Experience of a Greek Center. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 4, 2022b.

VARELAS, C. et al. Pb2226: the Role of Complement in the Immune Response of Sick cell Disease Patients Afer Covid-19 Vaccination. **HemaSphere**, v. 6, p. 2096–2097, 2022c.

VARELAS, C. et al. Immune Response of Adult Sick cell Disease Patients after COVID-19 Vaccination: The Experience of a Greek Center. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 4, 2022d.

VARELAS, C. et al. Immune Response of Adult Sickle Cell Disease Patients after COVID-19 Vaccination: The Experience of a Greek Center. **Diário de Medicina Clínica**, v. 11, n. 937, 2022e.

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, 2015a.

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, 2015b.

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

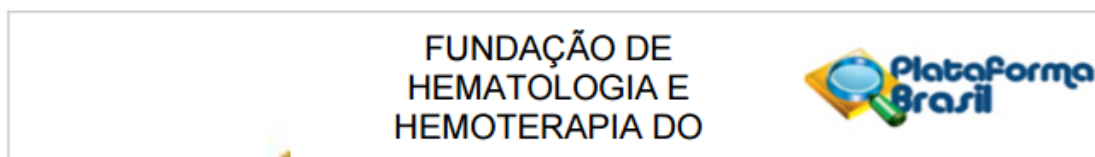
WARE, R. E. et al. Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, 2017b.

YANG, L. et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2020.

ZHOU, H. et al. Sensitivity to Vaccines, Therapeutic Antibodies, and Viral Entry Inhibitors and Advances To Counter the SARS-CoV-2 Omicron Variant. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 3, 2022.

APÊNDICES

Apêndice A: Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PÓS ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56756022.5.0000.0009

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.414.049

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1891291.pdf	05/05/2022 11:03:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	05/05/2022 11:03:04	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Outros	Questionario.doc	05/05/2022 11:01:46	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_ANUENCIA_pesquisadores_setores.pdf	05/05/2022 10:58:30	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_Doutorado.pdf	05/05/2022 10:54:18	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale.pdf	05/05/2022 10:53:41	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	05/05/2022 10:53:12	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_assinada.pdf	03/03/2022 18:06:23	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de concordância	Carta_Anuencia_Setores.pdf	03/03/2022 17:25:06	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Orçamento	Orcamento_Projeto.docx	03/03/2022 17:22:07	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Institucional_HEMOAM.pdf	03/03/2022 17:20:26	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto_V_3.docx	03/03/2022 17:19:45	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Apêndice B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do projeto: Avaliação da resposta imunológica após esquema de imunização contra COVID -19 em pacientes com Anemia Falciforme.

Coordenação da Pesquisa: Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie; Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula; Evilázio Cunha Cardoso.

NÚMERO DO CAAE: 56756022.5.0000.0009.

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) dessa pesquisa sobre a Anemia Falciforme. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo garantir seu direito como participante, é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com os pesquisadores. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA:

Anemia Falciforme (AF) é a hemoglobinopatia mais comum no mundo, decorrente de uma mutação no gene que codifica a cadeia beta da hemoglobina (Hb), e dá origem a uma variante estrutural da Hb conhecida como hemoglobina S (HbS). Do ponto de vista fisiopatológico, a AF é uma doença inflamatória, caracterizada pela ativação da imunidade inata, por consequência de dois elementos fisiológicos principais: vasoclusões repetidas e a hemólise crônica, na qual ativam e alimentam esse processo inflamatório

No Brasil estima-se a prevalência de 25 a 30 mil pessoas com AF, com nascimento de 1.000 a 1.200 novos casos por ano. Entre os estados, o Amazonas possui uma estimativa de prevalência de 300 a 320 de indivíduos com pelo menos um gene mutado em tratamento no hospital de referência para doenças hematológicas.

Grande parte dos pacientes com AF e com resultado positivo para COVID-19 podem desencadear graves complicações pulmonares, crise vaso-oclusiva e síndrome torácica aguda, mesmo na ausência de sintomas gripais. Estes sintomas são apresentações clínicas recorrentes nestes pacientes, advinda da própria AF, porém ainda não se sabe a interferência da COVID-19 no risco de agravamento e piora clínica nos pacientes falciformes em atendimento na Fundação HEMOAM.

As publicações mais recentes referem infecção e disfunção do endotélio vascular como eventos maiores que ocorrem principalmente no trato pulmonar, mas também podem estar presentes em outros órgãos. Esse dano ao endotélio também aparece em pacientes com AF, assim como uma tempestade de citocinas. Assim, há necessidade de classificar os pacientes com AF como uma população vulnerável às complicações do COVID-19, e compreender a eficácia do esquema de imunização contra COVID-19.

Nesse sentido, essa pesquisa visa investigar e avaliar a resposta imune ativa desencadeada pelo imunizante contra COVID-19 em pacientes com anemia falciforme, visto que ainda há poucos estudos a respeito do assunto. A identificação dos mecanismos imunológicos, assim como maior compreensão da temática pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e futuras pesquisas biotecnológicas nessa população.

2. PROCEDIMENTOS:

O paciente será recrutado ao longo de cada consulta ambulatorial de rotina realizado da Fundação HEMOAM. Nesse momento, e antes da consulta médica, será convidado a participar da pesquisa. Caso aceite participar, será acompanhado por 6 meses, com intervalo de 3 meses. As crises serão tratadas como visitas extras, e tratadas de forma diferencial.

Para este projeto de pesquisa, serão coletadas amostras nas consultas ambulatorial e/ou no momento das crises vaso-oclusivas, no atendimento de urgência e emergência por profissionais devidamente treinados da Fundação HEMOAM, por punção venosa ou cateter venoso central e cateter central inserção periférica (PICC), sendo que nestes dois últimos caso, um volume de 2ml será descartado.

A técnica utilizada será aquela descrita nos procedimentos operacionais padrão da instituição, observando o mínimo de garroteamento e traumas necessários. Estas amostras serão obtidas do Laboratório de Análises Clínicas da Fundação HEMOAM. Serão utilizadas 1 amostra coletada em tubos de EDTA, 1 em gel separador e 1 em citrato de sódio atendendo as seguintes especificações: 01 tubo de EDTA (4,0) ml para realização de hemograma, imunofenotipagem e pesquisa de biomarcadores moleculares, 01 tubo seco (4,0) ml para obtenção de soro e dosagens imunológicas e bioquímicas, e 01 tubo de Citrato de Sódio (4,0) ml para obtenção do plasma citratado e dosagem de microvesículas.

3. DESCONFORTOS E RISCOS:

Durante a coleta, você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da punção (hematoma). Para amenizar estes desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado. Cuidados locais serão tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames.

Este projeto apresenta um risco mínimo, de confidencialidade de dados, constrangimento e/ou desconforto. Para solucionar, os pesquisadores garantem que os pacientes serão tratados com sigilo e respeito, de forma ética e profissional, visando os anseios morais, físicos, psíquicos, social e afetivo dos participantes e seus responsáveis.

4. BENEFÍCIOS:

Não há benefícios diretos na participação neste estudo. Porém, você estará contribuindo para maior compreensão dos mecanismos imunológicos ligados à resposta dos pacientes com Anemia Falciforme, bem como ao atendimento e tratamento dos pacientes e obtermos dados para identificação de biomarcadores imunológicos voltados à soroconversão.

5. ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Após sua participação nesta pesquisa, você continuará seu tratamento em sua instituição, mesmo após o encerramento da pesquisa. Os resultados dos exames realizados nestes tubos não incluem exames utilizados para o seu tratamento, e serão usados apenas na análise desta pesquisa.

6. SIGILO E PRIVACIDADE:

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

7. RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante um atendimento médico. Caso você tenha que comparecer a sua instituição apenas devido a este estudo, você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

8. ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda com o armazenamento deste material. Caso seja realizado outro estudo com este material futuramente, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda ou não com a participação em outro estudo, que só será realizado após nova autorização do Comitê de Ética em pesquisa desta instituição.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
(Nome e telefone de uma pessoa a ser contatada).

9. CONTATO:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores listados abaixo:

- Profª. Dra. Adriana Malheiro - Hemoam - Contato:
- Profª. Erich Vinicius de Paula - Hemocentro da UNICAMP - Contato:
- Pesquisador: Evilazio Cunha Cardoso – Hemoam – Contato:

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

- Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOAM: Av. Constantino Nery, 3240 – Chapada CEP 69050-001, Manaus – AM; telefone (92) 3655-0014.

10. O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

11. OUTRAS INFORMAÇÕES:

1. O participante da pesquisa estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O participante poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que aparecerem durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica.

4. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em outro tratamento ou procedimento que possa necessitar em qualquer serviço de nosso hospital.
5. Caso você se sinta prejudicado ou de alguma forma lesionado, você tem o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

12. CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: () _____ e-mail (opcional): _____

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

13. DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução N° 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP da Fundação HEMOAM perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Manaus/AM, Data: ____/____/____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do (a) participante ou responsável

Apêndice C: Termo de Assentimento Livre Esclarecido

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - TALE

Título do projeto: Avaliação da resposta imunológica após esquema de imunização contra COVID -19 em pacientes com Anemia Falciforme.

Coordenação da Pesquisa Orientadora: Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie,
Coorientador: Profº Dr Erich Vinicius de Paula e pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso
NÚMERO DO CAAE: 56756022.5.0000.0009.

Você está sendo convidado (a) a participar como participante (a) dessa pesquisa sobre a Anemia Falciforme. Este documento, chamado Termo de Assentimento Livre e Esclarecido-TALE tem por objetivo garantir seu direito como participante, é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Leia com atenção e calma, aproveitando para fazer qualquer pergunta. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá fazê-las com os pesquisadores. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar.

Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

As informações contidas neste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – TALE, estão de acordo com as normas éticas contida na Resolução CNS Nº 466/12, envolvendo seres humanos e como anuência do participante criança e adolescente destinada a pesquisa da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você pode entrar em contato com os pesquisadores abaixo listados ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

- Profª. Dra. Adriana Malheiro - Hemoam - Contato:
- Profº. Erich Vinicius de Paula - Hemocentro da UNICAMP - Contato:
- Pesquisador: Evilazio Cunha Cardoso – Hemoam

A pesquisa tem objeto de investigar e a avaliar a resposta imune ativa desencadeada pela vacina contra COVID-19 em pacientes com anemia falciforme, visto que ainda há poucos estudos a respeito do assunto. A identificação dos mecanismos imunológicos, assim como maior compreensão da temática pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e futuras pesquisas biotecnológicas nessa população. Você só precisa participar da pesquisa se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A recusa não causará nenhum prejuízo na relação com os pesquisadores, e/ou instituição. As crianças que irão participar desta pesquisa têm de idade igual ou superior a 12 anos.

Todas as informações que serão obtidas são confidenciais, e serão armazenadas em um computador, ou seja, o seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem a garantia que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos

Não há despesas pessoais para o participante. Também não haverá compensação financeira relacionada à participação. Os dados coletados nesta pesquisa serão utilizados apenas para este estudo e artigos relacionados à própria pesquisa, não podendo ser utilizados para nenhuma outra pesquisa de outra ordem sem seu consentimento. A pesquisa será realizada na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas –HEMOAM.

PROCEDIMENTOS:

O paciente será recrutado ao longo de cada consulta ambulatorial de rotina realizado da Fundação HEMOAM. Nesse momento, e antes da consulta médica, será convidado a participar da pesquisa. Caso aceite participar, será acompanhado por 6 meses, com intervalo de 3 meses. As crises serão tratadas como visitas extras, e tratadas de forma diferencial.

Para este projeto de pesquisa, serão coletadas amostras nas consultas ambulatorial e/ou no momento das crises vaso-oclusivas, no atendimento de urgência e emergência por profissionais devidamente treinados da Fundação HEMOAM, por punção venosa ou cateter venoso central e cateter central inserção periférica, sendo que nestes dois últimos caso, um volume de 2ml será descartado.

A técnica utilizada será aquela descrita nos procedimentos operacionais padrão da instituição, observando o mínimo de garroteamento e traumas necessários. Estas amostras serão obtidas do Laboratório de Análises Clínicas da Fundação HEMOAM. Serão utilizadas 1 amostra coletada em tubos de EDTA, 1 em gel separador e 1 em citrato de sódio atendendo as seguintes especificações: 01 tubo de EDTA (4,0) ml para realização de hemograma, imunofenotipagem e pesquisa de biomarcadores moleculares, 01 tubo seco (4,0) ml para obtenção de soro e dosagens imunológicas e bioquímicas, e 01 tubo de Citrato de Sódio (4,0) ml para obtenção do plasma citratado e dosagem de microvesículas.

DESCONFORTOS E RISCOS:

Durante a coleta, você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da punção (hematoma). Para amenizar estes desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado. Cuidados locais serão tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames.

Este projeto apresenta um risco mínimo, de confidencialidade de dados, constrangimento e/ou desconforto. Para solucionar, os pesquisadores garantem que os pacientes serão tratados com sigilo e respeito, de forma ética e profissional, visando os anseios morais, físicos, psíquicos, social e afetivo dos participantes e seus responsáveis.

BENEFÍCIOS:

Não há benefícios diretos na participação neste estudo. Porém, você estará contribuindo para maior compreensão dos mecanismos imunológicos ligados à resposta dos pacientes com Anemia Falciforme, bem como ao atendimento e tratamento dos pacientes e obtermos dados para identificação de biomarcadores imunológicos voltados à soroconversão.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Após sua participação nesta pesquisa, você continuará seu tratamento em sua instituição, mesmo após o encerramento da pesquisa. Os resultados dos exames realizados neste tubo não incluem exames utilizados para o seu tratamento, e serão usados apenas na análise desta pesquisa.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante um atendimento médico. Caso você tenha que comparecer a sua

instituição apenas devido a este estudo, você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda com o armazenamento deste material. Caso seja realizado outro estudo com este material futuramente, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda ou não com a participação em outro estudo, que só será realizado após nova autorização do Comitê de Ética em pesquisa desta instituição.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
(Nome e telefone de uma pessoa a ser contatada).

CONTATO:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores listados abaixo:

- Profª. Dra. Adriana Malheiro - Hemoam - Contato:
- Profª. Erich Vinicius de Paula - Hemocentro da UNICAMP
- Pesquisador: Evilazio Cunha Cardoso – Hemoam

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

- Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOAM: Av. Constantino Nery, 3240 – Chapada CEP 69050-001, Manaus – AM; telefone (92) 3655-0014.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO:

Eu _____ aceito participar da pesquisa “Avaliação da resposta imunológica após esquema de imunização contra COVID -19 em pacientes com Anemia Falciforme”.

- ✓ Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer.
- ✓ Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir, que ninguém vai ficar com raiva de mim.
- ✓ Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.
- ✓ Recebi uma cópia deste termo de assentimento, li e concordo em participar da pesquisa.

Manaus/AM, ____/____/____.

Nome do (a) **participante**

Assinatura do (a) **responsável**

Apêndice D: Questionário sociodemográfico e clínico

Data: ____/____/____

QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL:

Projeto: “Avaliação da resposta imunológica pós esquema de imunização contra COVID-19 em pacientes com Doença Falciforme”

Nome: _____

Sexo: (M) (F) Data de Nascimento: _____ Idade: _____ anos

Local de Nascimento: _____ UF: _____

Cor de Pele: Branco () Pardo () Preto () Amarelo () Escolaridade: _____

Trabalha: _____ Profissão: _____

Estado Civil: Solteiro () Amigado () Casado () Divorciado () Separado () Viúvo () a quanto tempo () Possuem Filhos: Sim () Não () Quantos: _____

CPF: _____ N° do SUS: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Município: _____ UF: _____

Tipo Sanguíneo	Transfusões Sanguíneas	Uso de Medicamentos
O () A () AB () B () Rh: + () - ()	Quantas por ano (média) _____ Data da última transfusão: _____	Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()
	Reação Transfusional Sim () Não () Quantas vezes? _____	Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()
Pressão arterial: _____		Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()
Nível de oxigenação: _____ %	Data da última reação: _____	Medicamento: _____ A quanto tempo faz uso: _____ Já apresentou reação ao medicamento? Sim () Não ()

Alguma Comorbidades?	Tomou alguma vacina, além da COVID-19 nos últimos 6 meses?	Alcoolismo	Vacinação em dia?
Sim () Não () Qual (ais)? _____ _____ _____ _____	() Sim () Não Qual (ais)? _____ _____ _____	Sim () Não () Quanto/ Dia _____ Fumante Sim () Não () Quant. Tempo _____ Quant. Dia _____	() Sim () Não () Não sabe Vacina para gripe nos últimos 2 anos? () Sim () Não () Não sabe Profilaxia com penicilina até os 5 anos? () Sim () Não () Não sabe

Apresentou alguma síndrome gripal nos últimos 6 meses? ☐ Sim ☐ Não	Alguma doenças infecciosas? ☐ Sim ☐ Não Qual (ais)? _____ _____ _____	Usa alguma droga ilícita? Sim ☐ Não ☐ Tipo _____ Quant. Temp. _____ _____	Tomou a vacina para COVID-19? ☐ Sim ☐ Não Qual? _____ Data 1º dose: _____ Data 2º dose: _____ Qual? _____ Data 3º dose: _____ Data 4º dose: _____																
Já teve o diagnóstico da COVID-19? ☐ Sim ☐ Não Data do teste: ____/____/____ Teste utilizado: ☐ RT-PCR ☐ Teste rápido ☐ Antígeno Início dos sintomas: ____/____/____ Final dos sintomas: ____/____/____ Apresentou alguma reação à vacina do COVID-19? ☐ Sim ☐ Não Sinal e sintoma da reação: _____ _____		Caso já tenha tido COVID-19, favor assinalar quais sintomas você sentiu, e a intensidade de cada um em uma escala de 1 a 10* <table border="1"> <tr> <td>☐ Febre</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Tosse</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Dor de garganta</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Dor no corpo</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Náuseas</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Perda de olfato</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Perda de paladar</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> <tr> <td>☐ Diarreia</td> <td>☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10</td> </tr> </table> 1= Fraco; 10 = Intenso. Teve quadro de reinfecção? ☐ Sim ☐ Não		☐ Febre	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Tosse	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Dor de garganta	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Dor no corpo	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Náuseas	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Perda de olfato	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Perda de paladar	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10	☐ Diarreia	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
☐ Febre	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Tosse	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Dor de garganta	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Dor no corpo	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Náuseas	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Perda de olfato	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Perda de paladar	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		
☐ Diarreia	☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10																		

Sintomatologia	
Febre ☐ Sim ☐ Não	Crise Vaso-Oclusiva: Já teve? ☐ Sim ☐ Não Quantas? _____ Quando foi a última? _____
Dor de Cabeça ☐ Sim ☐ Não	Síndrome Torácica Aguda: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Dor nas articulações ☐ Sim ☐ Não	Hipertensão Pulmonar: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Fraqueza: ☐ Sim ☐ Não	Sequestro Esplênico: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Icterícia: ☐ Sim ☐ Não	Colelitíase: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Úlceras da Perna: ☐ Sim ☐ Não	Osteonecrose de cabeça de fêmur: Já teve? ☐ Sim ☐ Não
Infecção de pele e nas úlceras: ☐ Sim ☐ Não	Priapismo: Já teve? ☐ Sim ☐ Não

Apêndice E: Protocolo de Imunofenotipagem

FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS LABORATÓRIO MULTIDISCIPLINAR DE PESQUISA

Projeto Vacinação em Pacientes com Anemia Falciforme – HEMOAM

1. MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE

1.1. Fazer um pool para o tubo 2 (Linfócitos T):

- PBS-W – 5µL
- CD3 PC 5.5 – 1µL
- CD8 PE – 3µL
- CD45RA PE-Cy7 – 1µL
- CD27 APC-H7 – 2µL
- CCR7 APC – 2µL
- CD4 FITC – 6µL

Volume final para 1 amostra 20µL. Para 20 amostras, multiplicar por 20.

1.2. Fazer um pool para o tubo 3 (Linfócitos B)

- PBS-W – 2,5µL
- IgD FITC – 4µL
- CD19 PE – 4µL
- CD38 PE-Cy5 – 1µL
- HLA-DR PE-Cy7 – 0,5µL
- IgM APC – 6µL
- CD27 APC-H7 – 2µL

Volume final para 1 amostra 20µL. Para 20 amostras, multiplicar por 20.

1.3. Identificar e distribuir os anticorpos de superfície nos tubos de citometria conforme tabela abaixo.

Tubos	Células	Anticorpo (s)	Volume
1	Controle negativo	-	20µL (PBS-W)
2	Linfócitos T	Anti-CD3 (PC 5.5)	20µL do pool
		Anti-CD8 (PE)	
		Anti-CD45RA (PE-Cy7)	
		Anti-CD27 (APC-H7)	
		Anti-CCR7 (APC)	
		Anti-CD4 (FITC)	
3	Linfócito B	Anti-IgD (FITC)	20µL do pool
		Anti-CD19 (PE)	
		Anti-CD38 (PE-Cy5)	
		Anti-HLA-DR (PE-Cy7)	
		Anti-IgM (APC)	
		Anti-CD27 (APC-H7)	

1.4. Adicionar uma alíquota de 100 µL do sangue periférico total em cada tubo. – Vortexar;

- 1.5. Incubar a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 20 minutos;
- 1.6. Adicionar 2 mL da solução de lise 1x em cada tubo – Vortexar;
- 1.7. Incubar ao abrigo da luz por 5 minutos – Vortexar;
- 1.8. Centrifugar (5 minutos / 1.500 rpm);
- 1.9. Descartar o sobrenadante;
- 1.10. Adicionar 2 mL de PBS-W – Vortexar;
- 1.11. Centrifugar (5 minutos / 1.500 rpm);
- 1.12. Descartar o sobrenadante;
- 1.13. Adicionar 2 mL de PBS-W – Vortexar;
- 1.14. Centrifugar (5 minutos / 1.500 rpm);
- 1.15. Descartar o sobrenadante;
 - Se o fundo do tubo ainda estiver vermelho, repetir as etapas 1.10 até 1.15.
- 1.16. Ressuspender em 300µL de PBS-W – Vortexar.

Apêndice F: Figura suplementar 1

Colormaps classificados por mediador imunológico foram elaborados para ilustrar as proporções acima do ponto de corte em cada grupo

