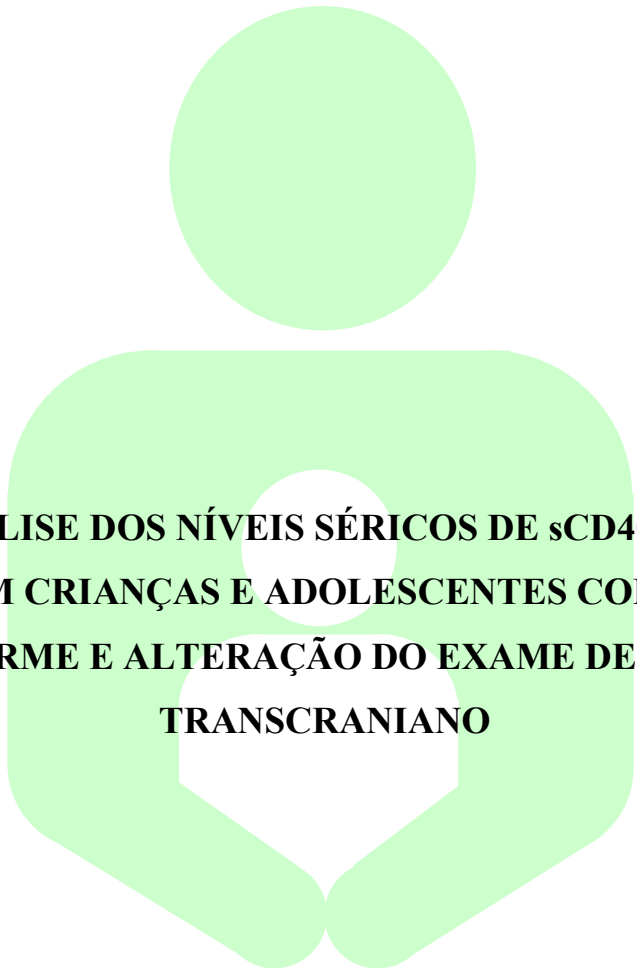


INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA (IMIP)

PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM SAÚDE INTEGRAL

DINTER EM SAÚDE INTEGRAL IMIP/UNIVERSIDADE ESTADUAL DE

CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS (UNCISAL)



**ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40L, sCD40 e
sCD62P EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA
FALCIFORME E ALTERAÇÃO DO EXAME DE DOPPLER
TRANSCRANIANO**

CINTHYA PEREIRA LEITE COSTA DE ARAÚJO

Recife, 2018

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA

PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM SAÚDE INTEGRAL

DINTER EM SAÚDE INTEGRAL IMIP/UNCISAL

ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40L, sCD40 e sCD62P EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME E ALTERAÇÃO DO EXAME DE DOPPLER TRANSCRANIANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) como requisito para obtenção do grau de Doutor em Saúde Integral.

Doutoranda: Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo

Orientadora: Prof^a Dra. Leuridan Cavalcante Torres

Co-orientadores: Profa. Dra. Maria do Carmo M. B. Duarte

Prof. Dr. Paulo José Medeiros de S. Costa

Linha de Pesquisa: Mecanismos celulares e moleculares da imunidade, inflamação e infecção.

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP
Ficha Catalográfica BAB-011/2019
Elaborada por Túlio Revoredo CRB-4/2078

A663a Araújo, Cinthya Pereira Leite Costa de

Análise dos níveis séricos de sCD40L, sCD40 e sCD62P em crianças e adolescentes com anemia falciforme e alteração do exame de doppler transcraniano / Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo. Orientadora: Leuridan Cavalcante Torres. Coorientadores: Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte ; Paulo José Medeiros de Souza Costa – Recife: Do Autor, 2018.

90 f.: il.

Tese (Doutorado Interinstitucional em Saúde Ingetral) – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira / Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, 2018.

1. Anemia falciforme. 2. Acidente vascular cerebral. 3. Antígenos CD40. I. Torres, Leuridan Cavalcante: orientadora. II. Duarte, Maria do Carmo Menezes Bezerra: coorientadora. III. Costa, Paulo José Medeiros de Souza. IV. Título.

CDD 616.1527

ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40L, sCD40 e sCD62P EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME E ALTERAÇÃO DO EXAME DE DOPPLER TRANSCRANIANO

Tese de Doutorado em Saúde Integral do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), submetida à defesa pública e aprovada pela banca examinadora em 28 de maio de 2018.

MEMBROS

Prof.^a. Dr.^a. Leuridan Cavalcante Torres
INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA

Profa. Dr.^a. Ariani Impieri de Souza
INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA

Prof. Dr. José Roberto da Silva Júnior
INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA

Prof. Dr. Roberto Cordeiro de Andrade Teixeira
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS

Profa. Dr.^a. Rosana Quintella Brandão Vilela
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

DEDICATÓRIA

A minha família, especialmente as minhas filhas Gabriela e Laís, e minha neta Sofia, minhas razões de viver e as verdadeiras fontes de inspiração e coragem para seguir em frente.....

A meu pai Meroveu, meu grande HERÓI e amigo, exemplo de ser humano e profissional da medicina... meu TUDO....

A minha mãe (in memoriam), eterna AURORA da minha vida....

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, foram os responsáveis pela conclusão dessa tese.

As minhas queridas orientadoras, Leuridan e Carminha, sem palavras para agradecer tudo que vocês fizeram por mim durante esses quatro anos de convívio e aprendizado.

A você Leuridan, para mim um grande exemplo de pesquisadora e ser humano, que tive o grande privilégio de conviver todo esse período. Que soube me acolher nos momentos difíceis e também me dar aqueles puxões de orelha, que tanto me fizeram crescer! Jamais esquecerei todos os seus ensinamentos em imunologia e rotina laboratorial. Confesso que em muitos momentos senti medo de não conseguir, porém você, com suas próprias histórias de superação me deixaram mais confiante em chegar ao final dessa caminhada. Obrigada por não ter desistido de mim, apesar da distância e de todas as dificuldades!

A Dr^a Maria do Carmo, que carinhosamente aprendi a chamar de Carminha, minha segunda orientadora e, em muitos momentos difíceis, minha confidente! Você, sem perceber, foi para mim um exemplo de força e coragem. Serei eternamente grata pelas suas orientações, dedicação e impressionante organização e experiência em elaborar um trabalho científico. Que seu caminho seja sempre de muita luz, saúde e sucesso!

A toda a equipe do Laboratório de pesquisa translacional do IMIP responsável pelas minhas análises, que sempre me acolheram de braços abertos e que deixaram

meus momentos em Recife sempre mais felizes e descontraídos. A Marcela, que diretamente se dedicou as análises da minha pesquisa, um agradecimento especial.

Ao Laboratório de HLA do Hemoal, em especial as técnicas de laboratório Saízia e Jeane, que apesar de toda a rotina de um laboratório de referência em transplantes do estado de Alagoas, não mediram esforços em me ajudar a preparar e armazenar todas as minhas amostras.

A Direção do Hemoal, em nome da minha amiga Verônica, que abriu as portas do Hemocentro de Alagoas para que minha pesquisa fosse realizada e a todos os colaboradores da recepção, coleta, hematologia e equipe de enfermagem do Hemoal, em especial a Cícera, Anas e Rita, que foram muito importantes na captação e coleta de sangue dos pacientes. A todos vocês o meu carinhoso obrigado!

Ao Laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário - HUPAA, que realizou a coleta e os hemogramas das crianças controle saudáveis, meu muito obrigado.

Ao Dr. Camilo Vieira, que apesar de residir em Salvador, foi o responsável pela realização do Doppler Transcraniano (DTC) de todos os pacientes com anemia falciforme no Hemoal e que, independente da minha pesquisa, possibilitou ao Hemocentro de Alagoas o início da prevenção primária do AVC para esses pacientes.

A David e Kledson pela constante e carinhosa ajuda na formatação da minha pesquisa, um obrigado especial.

A minha querida psicóloga e amiga Beatriz, peça fundamental para que eu, apesar das dificuldades, nunca desistisse dos meus objetivos, meu carinho verdadeiro e especial!

A todos os pequeninos e grandes pacientes com anemia falciforme do Hemoal, que de forma voluntária, foram os grandes e valiosos personagens dessa pesquisa. É em nome de Sidney, presidente da APHAL, que dedico essa tese e é, por vocês, que continuarei à procura de novas descobertas na área, com o objetivo de poder amenizar o sofrimento e proporcionar uma melhor qualidade de vida.

A toda a minha família e amigos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. As minhas filhas Gabriela e Laís e minha neta Sofia, minhas grandes incentivadoras a não desistir aos desafios. Amo muito vocês! A Raul, que sempre cuidou de todos em casa durante as minhas repetidas viagens a Recife. A minha irmã Alice e ao meu genro Manzito, pelo carinho e “dengo” constantes nos momentos difíceis de saúde, que com o amor de vocês aprendi a superar. A minha amiga Denise, companheira de trabalho e de vida, obrigada pelo apoio, palavras de carinho e incentivo nessa jornada.

A meu pai Meroveu, meu exemplo de VIDA, de profissionalismo, dignidade e AMOR! Obrigada por sempre acreditar em mim e me amar incondicionalmente....

RESUMO

Introdução: a anemia falciforme (AF) é a hemoglobinopatia hereditária de maior prevalência no Brasil, determinada pela homozigose da hemoglobina “S”, sendo resultante de uma mutação no gene da beta globina. O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma complicação grave e catastrófica da AF, sendo uma das principais causas de morbimortalidade em crianças e adultos jovens. Pacientes com AF que apresentam risco elevado para AVC são monitorados por meio do Doppler transcraniano (DTC), sendo esse método usado para predizer risco para AVC. As plaquetas possuem a capacidade de promover eventos vaso-oclusivos e também de regular a resposta imune através de mediadores inflamatórios. As plaquetas ativadas expressam grandes quantidades do ligante CD40 (CD40L) e de CD62P (P-selectina). Essas moléculas têm sido consideradas como marcadores de ativação plaquetária na AF, no entanto não está descrito na literatura o potencial dessas moléculas como biomarcadores preditivos de risco para AVC em pacientes pediátricos com AF. **Objetivo:** avaliar os níveis séricos de sCD40L, sCD40 e sCD62P em crianças e adolescentes com anemia falciforme e alteração do exame de DTC. **Métodos:** estudo translacional, de corte transversal e grupo de comparação interno, desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Foram incluídos 48 pacientes com AF com idade de 2 a 16 anos, acompanhados no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Alagoas (HEMOAL, Brasil). O grupo de controles saudáveis foi constituído por 26 crianças e adolescentes saudáveis (de 2 a 13 anos) hospitalizados para realização de cirurgias eletivas de pequeno porte no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (UFAL, Brasil). Os pacientes foram divididos em 03 grupos, de acordo com as características clínicas da doença: Grupo 1: AF com DTC normal e sem AVC (n=24); Grupo 2: AF com DTC anormal e sem AVC (n=16); Grupo 3: AF com AVC (n=8). A dosagem de sCD40 e sCD40L livre no plasma foi realizada por *enzyme immunosorbent assay* (ELISA) e a de sCD62P por citometria de fluxo. Para testar as diferenças entre os grupos utilizaram-se os testes *t* e de Mann-Whitney para análise de médias e medianas, respectivamente, enquanto que para a correlação entre as variáveis foi usado o coeficiente de correlação de Spearman. Foram considerados significativos valores de $p < 0.05$. Para análise estatística foi utilizado o *GraphPadPrism v6.0*. **Resultados:** os níveis de sCD40L foram

significativamente mais elevados nos grupos G1, G2 e G3, quando comparado aos controles ($p=0,0001$; $p<0,0002$ e $p=0,008$, respectivamente). Entre os pacientes com AF evidenciou-se níveis mais elevados de sCD40L no grupo G3 (median =1.330 pg/ml; range= 872-2550), com relação ao grupo G2 (mediana=1.003; $p =0,03$). Na análise de sCD40, não houve diferença significativa entre os quatro grupos. Na análise do sCD62P, os pacientes do G3 apresentaram níveis elevados, quando comparado ao G1 ($p=0,0001$); G2 ($p= 0,03$) e controles ($p=0,01$), e G2 também apresentou níveis elevados, quando comparados com os do G1 ($p=0,04$). Os pacientes do G1 apresentaram índice mais elevado na relação sCD40L/sCD62P, quando comparado ao do grupo G2 ($p=0,003$) e aos controles ($p<0,0001$). Os índices de sCD40L/sCD40 foram 7,1; 6,1 e 7,7 vezes mais elevados nos pacientes dos grupos G1, G2 e G3, respectivamente, quando comparado aos controles ($p<0,0001$, $p<0,008$ e $p=0,002$, respectivamente), porém não houve diferença significativa entre os G1, G2 e G3. Não houve correlação nos níveis de sCD40L vs sCD62P, sCD40 vs sCD40L, e de sCD40 vs sCD62P. **Conclusão:** a combinação da anormalidade do DTC associado ao aumento dos níveis de sCD40L e sCD62P ou diminuição da relação sCD40L/sCD62P podem contribuir para uma melhor avaliação do risco para AVC em pacientes pediátricos e adolescentes com AF.

Palavras chave: anemia falciforme; acidente vascular cerebral; plaquetas, antígeno CD40; inflamação.

ABSTRACT

Introdução: sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent hereditary hemoglobinopathy in Brazil, determined by homozygous hemoglobin "S", resulting from a mutation in the beta globin gene. Cerebral Vascular Accident (CVA) is a serious and catastrophic complication of PA, being one of the main causes of morbidity and mortality in children and young adults. Patients with SCA, who are at high risk for stroke, are monitored by transcranial Doppler (TCD), and this method is used to predict risk for stroke. Platelets have the capacity to promote vaso-occlusive events and also to regulate the immune response through inflammatory mediators. Activated platelets express large amounts of the CD40 (CD40L) and CD62P (P-selectin) linker. These molecules have been considered as markers of platelet activation in SCA, but it is not described in the literature whether these molecules have potential as predictive biomarkers of stroke risk in pediatric patients with SCA. **Objective:** to evaluate the serum levels of sCD40L, sCD40 and sCD62P in children and adolescents with sickle cell anemia and abnormal Transcranial Doppler examination. **Methods:** A translational study, cross-sectional and an internal comparison group, was carried out in the Translational Research Laboratory of the Institute of Integral Medicine Prof. Fernando Figueira (IMIP). We included 48 patients with SCA aged 2 to 16 years old, who were followed up at the Hematology and Hemotherapy Center of Alagoas (HEMOAL, Brazil). The group of healthy controls consisted of 26 healthy children and adolescents (2 to 13 years old) hospitalized for small elective surgeries at the Federal University of Alagoas Hospital (UFAL, Brazil). Patients were divided into 3 groups, according to the clinical characteristics of the disease: Group 1: AF with normal TCD and without stroke (n = 24); Group 2: AF with abnormal TCD and without stroke (n = 16); Group 3: SCA with stroke (n = 8). Plasma free sCD40 and sCD40L were measured by enzyme immunosorbent assay (ELISA) and sCD62P by flow cytometry. To test the differences between the groups, the t and Mann-Whitney tests were used for the analysis of means and medians, respectively, while for the correlation between the variables the Spearman correlation coefficient. Values of $p < 0.05$ were considered significant. For statistical analysis, was used GraphPadPrism v 6.0 **Results:** The levels of sCD40L were significantly higher in the G1, G2 and G3 groups when compared to controls ($p = 0.0001$, $p < 0.0002$ and $p = 0.008$, respectively). Among patients with SCA, higher

levels of sCD40L in the G3 group (median = 1,330 pg / mL; range = 872-2550) were observed in relation to the G2 group (median = 1.003; p = 0.03). In the sCD40, there was no significant difference between the groups. In the sCD62P analysis, G3 patients presented high levels when compared to G1 (p = 0.0001); G2 (p = 0.03) and controls (p = 0.01), and G2 also had high levels when compared to G1 (p = 0.04). G1 patients had a higher sCD40L / sCD62P ratio when compared to G2 (p = 0.003) and controls (p <0.0001). The indices of sCD40L / sCD40 were 7.1; 6,1 and 7,7 times higher levels in patients G1, G2 and G3 respectively, when compared with controls (p <0.0001, p <0.008 and p = 0.002, respectively), but there was no significant difference between the groups (G1, G2 and G3) the G1, G2 and G3. There was no correlation in the levels of sCD40L vs sCD62P, sCD40 vs sCD40L, and sCD40 vs sCD62P. **Conclusion:** the combination of DTC abnormality associated with increased levels of sCD40L and sCD62P or decreased sCD40L / sCD62P ratio may contribute to a better assessment of the risk for stroke as well as relapse in cerebrovascular disease in pediatric patients with SCA.

Keyword: sickle cell anemia; cerebral vascular accident; platelets; CD40 antigen; inflammation

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	04
1.1	Doença falciforme – Aspectos gerais e classificação.....	04
1.2	Epidemiologia da doença falciforme.....	04
1.3	Anemia falciforme.....	05
1.4	Manifestações cérebro vasculares na AF.....	06
1.5	Fisiopatologia da anemia falciforme.....	09
1.6	As plaquetas e a imunopatogênese na anemia falciforme.....	14
1.7	Biomarcadores de ativação plaquetária.....	16
1.8	Marcadores inflamatórios de plaquetas em pacientes com AF e manifestações cerebrovasculares.....	19
II.	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
III.	MÉTODO.....	24
3.1	Desenho do estudo.....	24
3.2	Local do estudo.....	24
3.3	Período do estudo.....	24
3.4	População do estudo e amostra.....	24
3.4.1	População de estudo.....	24
3.4.2	Amostra.....	25
3.5	Crterios de elegibilidade.....	26
3.5.1	Crterios de inclusão.....	26
3.5.2	Crterios de exclusão.....	26
3.6	Procedimentos para captação dos participantes da pesquisa.....	27
3.7	Definição e operacionalização dos termos.....	29
3.8	Coleta de sangue e preparação das amostras.....	30
3.9	Testes laboratoriais.....	31
3.9.1	Dosagem da concentração de sCD62P.....	31
3.9.2	Dosagem da concentração de sCD40L e sCD40.....	31

3.9.3	Determinação dos valores de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos, reticulócitos e plaquetas.....	32
3.10	Controle da qualidade das informações.....	33
3.11	Análise estatística.....	34
3.12	Aspectos éticos.....	34
IV.	RESULTADOS.....	35
V.	CONCLUSÕES	49
5.1	Impacto institucional.....	50
VI.	RECOMENDAÇÕES PARA A PESQUISA.....	51
VII.	REFERÊNCIAS	52
VIII.	APÊNDICES	58
	APÊNDICE I – Formulário.....	58
	APÊNDICE II – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)....	60
	APÊNDICE III – Termo de assentimento.....	64
	ANEXO 1 Aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos do IMIP.	67
	ANEXO 2 Carta de anuência HEMOAL.....	68
	ANEXO 3 Autorização Institucional HUPAA/UFAL.....	69
	ANEXO 4 Preparação do manuscrito.....	70
	ANEXO 5 Submissão do manuscrito.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF: Anemia falciforme

APCs: Células apresentadoras de antígeno

AS: Traço falciforme- forma heterozigótica

AVC: Acidente vascular cerebral

CVO: Crise vaso-oclusiva

DF: Doença falciforme

DNA: Ácido desoxiribonucleico

DTC: Doppler transcraniano

ELISA: do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FVW: Fator de Von Willebrand

HbF: Hemoglobina fetal

HbS: Hemoglobina anômala “S”

HEMOAL: Hemocentro de Alagoas

HUPAA/UFAL/EBSERH: Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes/Universidade Federal de Alagoas/Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

ICS: do inglês *Ischemic silent injury*

IL: Interleucina

IMIP: Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

LPS: Lipopolissacarídeos

MBL: do inglês *mannose-binding lectin*

MCP-1: do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MHz: Megahertz

ML: Mililitro

µL: Microlitro

NK: do inglês *Natural Killer*

NO: do inglês *Nitric Oxide*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

PPP: Plasma pobre em plaqueta

QI: Quociente de inteligência

RANTES: do inglês *Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*

sCD: do inglês *soluble Cluster of Differentiation*

sCD40L: do inglês *soluble CD40 ligand*

SS: Forma homozigótica da HbS

STOP: do inglês “*Stroke prevention trial in sickle cell disease*”

TA: Temperatura ambiente

TIA: do inglês *Transient ischemic attack*

TLR: do inglês *Toll Like Receptor*

TNF α : do inglês *Tumor necrosis factor alpha*

TNFSF: do inglês *Tumor necrosis factor super family*

VFSC: Velocidade de fluxo sanguíneo cerebral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da anemia falciforme	10
Figura 2. Inflamação e vaso-oclusão na anemia falciforme.....	12
Figura 3. Interações entre plaquetas e endotélio	17
Figura 4. Fluxograma de captação de pacientes e procedimentos.....	28

I. INTRODUÇÃO

1.1 Doença falciforme – Aspectos gerais e classificação

O termo doença falciforme (DF) se aplica a um grupo de anemias hemolíticas hereditárias em que há a presença da hemoglobina “S” nas hemácias. A forma em homozigose (SS) é chamada de Anemia Falciforme (AF) e caracteriza-se por uma evolução clínica mais severa. Ocorre também em heterozigose, associada a outras hemoglobinas variantes (HbSC, HbSD, etc) ou com as talassemias (S/ β^+ talassemia, S/ α talassemia)¹. O traço falciforme é uma condição benigna e relativamente comum, em que o indivíduo herda de um dos pais o gene da hemoglobina normal “A” e do outro o gene para a hemoglobina “S”. Os indivíduos com HbAS são geralmente assintomáticos, sem nenhuma anormalidade física e com expectativa de vida semelhante ao da população em geral. A sobrevivência das hemácias é normal e não existe anemia^{1,2,3}.

1.2 Epidemiologia da doença falciforme

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), 5% da população mundial é portador do gene responsável pela hemoglobinopatia e a cada ano, nascem aproximadamente 300.000 crianças com DF². Em 2009, a OMS estimou que na África nascessem aproximadamente 268 mil crianças/ano com DF, sendo a Nigéria o país líder no *ranking* com 86 mil novos casos anuais².

No Brasil, dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) obrigatório em todos os Estados desde 2001, nascem cerca de 200.000 crianças/ano com o traço falciforme, representando 2 a 8% da população brasileira e 3.500 novos casos/ano de AF, com um total de casos estimados na população entre 25.000 a 30.000

indivíduos com a forma homozigótica e grave da doença, sendo considerada a doença hereditária monogênica mais prevalente no país¹⁻⁸. A incidência da DF é maior nas regiões norte e nordeste do Brasil, sendo a Bahia o estado com maior número de casos (1/650 nativos)¹.

Em Alagoas, dados do Programa Estadual de Triagem Neonatal revelam que foram triadas 8.720 crianças nascidas vivas no período de 2009 a julho de 2017, com uma incidência de traço falciforme de 3,3% (Comunicação pessoal: Serviço de Triagem Neonatal do Estado de Alagoas - Casa do Pezinho).

1.3 Anemia falciforme

A AF ou HbSS em homozigose é uma hemoglobinopatia hereditária autossômica recessiva, causada por uma mutação pontual no gene da beta-globina, que leva a substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia beta, produzindo uma hemoglobina anômala, chamada hemoglobina S (HbS)⁹⁻¹¹. A hemoglobina “S” quando desoxigenada e em elevada concentração, apresenta redução da solubilidade com formação de estruturas paracristalinas, alterações estruturais do eritrócito (em forma de “foice” ou “meia lua”) com acentuada elevação da viscosidade sanguínea^{10,12,13}.

A alteração genética teve origem no continente africano e como consequência da migração populacional foi distribuída amplamente em diversas regiões do mundo, com incidência mais elevada na África equatorial, Arábia, Índia, Israel, Turquia, Grécia e Itália e Brasil, sendo por isso considerada uma das doenças hereditárias mais comuns no mundo^{14,15}.

Existe uma grande variabilidade de manifestações clínicas na AF, causadas por uma fisiopatologia multifatorial complexa, associada a uma heterogeneidade de características genéticas dos indivíduos e a fatores ambientais e sociais^{8,16-18}.

A AF caracteriza-se clinicamente por anemia hemolítica crônica, crises vaso-oclusivas recorrentes (crises dolorosas) e aumento da susceptibilidade a infecções, além de outras manifestações, como a crise aplásica, de sequestração esplênica, complicações neurológicas, alterações do crescimento e desenvolvimento, e lesões crônicas de múltiplos órgãos^{14,17}. Dentre essas complicações a crise vaso-oclusiva dolorosa é a manifestação clínica mais frequente e ocorre devido a obstrução do fluxo sanguíneo na microvasculatura e consequente hipóxia tecidual, causada inicialmente pela rigidez das hemácias falcizadas, sendo uma das principais causas de morbidade da doença.^{19, 20}

1.4 Manifestações cérebro vasculares na AF

A doença neurológica acomete aproximadamente 30% dos pacientes com AF. O AVC é uma das complicações mais graves e catastróficas da AF, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade na sua evolução^{21,22}. O AVC isquêmico é a forma mais comum na infância, representando 53% dos casos das complicações cérebro vasculares na AF, com um pico maior de incidência entre os dois e nove anos de idade, sendo resultado de infarto em áreas irrigadas pelas artérias cerebrais do polígono de Willis⁸. Por outro lado, o AVC hemorrágico é mais comum em adultos (3ª a 4ª década de vida), representando 5% dos casos e apresenta elevada morbimortalidade. É geralmente decorrente da ruptura de pequenos vasos da circulação colateral, após lesões isquêmicas, denominadas “moyamoya” ou aneurismas^{23,24}.

Estudo realizado na Universidade Federal de Alagoas em 2013 avaliou o risco de desenvolvimento de AVC entre crianças e adolescentes com DF, e encontrou uma

frequência de 17,14% de casos com resultados anormais do DTC. Além disso, observou-se uma frequência em 94,4% dos pacientes com velocidade de fluxo sanguíneo cerebral (VFSC) maior que 200 cm/s, principalmente naqueles pacientes com a forma homozigótica “SS” da doença e na faixa etária de dois a nove anos. Os autores concluíram que a alta prevalência dessa alteração no estado de Alagoas, demonstra o alto risco para AVC e reforça a necessidade de medidas enérgicas e contínuas que garantam a continuidade do programa de triagem e apoio aos pacientes de maior risco para essa complicação.

Complicações da AF, como o AVC, a insuficiência renal, crise vaso-oclusiva e a síndrome torácica aguda são capazes de reduzir de 25 a 30 anos a expectativa de vida desses pacientes, em comparação com a população sadia sem a doença^{25,26}. Na ausência de tratamento do AVC, a recorrência do AVC ocorre em 2/3 dos pacientes, podendo chegar a 93% dos casos. As lesões cerebrais são progressivas e as sequelas neurológicas e/ou cognitivas acontecem em cerca de 60% dos pacientes, demonstrando a gravidade do quadro e a diminuição na qualidade de vida^{27,28}.

No contexto das manifestações cérebro vasculares, destaca-se também a lesão isquêmica silenciosa (ICS), onde ocorrem alterações de ressonância magnética, sem manifestações clínicas de deficiência neurológica. A ICS ocorre em 17 a 22% dos pacientes com AF com faixa etária até os 20 anos e pode levar a várias deficiências cognitivas, com dificuldades de aprendizagem e redução do quociente de inteligência (QI). As crianças estão sob risco de progressão da doença neurológica, de ICS para AVC isquêmico, principalmente se associado ao aumento das velocidades de fluxo sanguíneo cerebral detectado pelo *Doppler*^{23,28}.

Em 1998, o estudo *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Disease* (STOP) definiu a importância da detecção precoce da doença cerebrovascular por meio do

Doppler Transcraniano (DTC) e o valor do regime de transfusão crônica para crianças com risco elevado, com velocidade de fluxo sanguíneo cerebral (VFSC) ≥ 200 cm/s²⁹.

Por meio de uma metodologia relativamente simples, não invasiva, que utiliza a técnica de ultrassom para medir indiretamente o fluxo nas porções proximais das principais artérias intracranianas (pertencentes ao polígono de Willis), o DTC oferece informações dinâmicas da circulação cerebral. O STOP confirmou o valor preditivo do DTC para AVC nos pacientes pediátricos e reduziu a ocorrência de AVC de 10% para menos de 1% nos casos avaliados. Além disso, o estudo estabeleceu parâmetros próprios para a definição de anormalidade no DTC nessa coorte de pacientes:

- DTC normal – VFSC < 170 cm/s
- DTC condicional baixo – VFSC de 170 a 184 cm/s
- DTC condicional alto – VFSC de 185 a 199 cm/s
- DTC anormal – VFSC de 200 a 219 cm/s
- DTC anormal alto – VFSC ≥ 200 cm/s^{29,30}.

O estudo STOP II (2005) avaliou crianças que normalizaram o DTC após transfusões regulares de sangue e com RNM sem alterações. O grupo incluído no estudo foi dividido em dois braços: um manteve a transfusão de concentrado de hemácias e outro não. Esse estudo teve seu término antecipado, pois foi evidenciado que após dois anos de seguimento no grupo sem transfusão, 35% das crianças voltaram a apresentar alto risco para AVCI agudo, com alteração do DTC e duas crianças apresentaram AVCI agudo, enquanto no grupo que manteve o esquema de transfusão, nenhum evento agudo cerebral foi evidenciado. O estudo confirmou a importância da manutenção do esquema de hipertransfusão, devendo ser mantidas indefinidamente nesse grupo de pacientes³¹.

Nas últimas décadas, a melhor opção disponível de tratamento para os pacientes com AF e AVC ou DTC alterado é o esquema de hipertransfusão de concentrado de

hemácias, que pode acarretar reações adversas relacionadas ao uso contínuo desse hemocomponente, como: reações hemolíticas pela produção de anticorpos anti-eritrocitários; contaminação por doenças transmitidas pelo sangue; aumento do acúmulo de ferro nos tecidos, além de dificuldades de acesso venoso, principalmente em crianças menores, o que leva a uma menor aceitação do tratamento por parte dos pais e pacientes, podendo culminar com a interrupção do esquema terapêutico e, conseqüentemente, com a evolução da doença cerebrovascular^{25,29,31}.

1.5 Fisiopatologia da anemia falciforme

A falcização das hemácias na AF resulta inicialmente em dois mecanismos fisiopatológicos: vaso-oclusão mediada por ciclos de isquemia e reperfusão, e anemia hemolítica. Ambos levam a um aumento da inflamação vascular e ativação da coagulação, sendo relevantes para o aparecimento das complicações da doença^{15,19,32}. A Figura 1 apresenta de forma esquemática a fisiopatologia da AF³³.

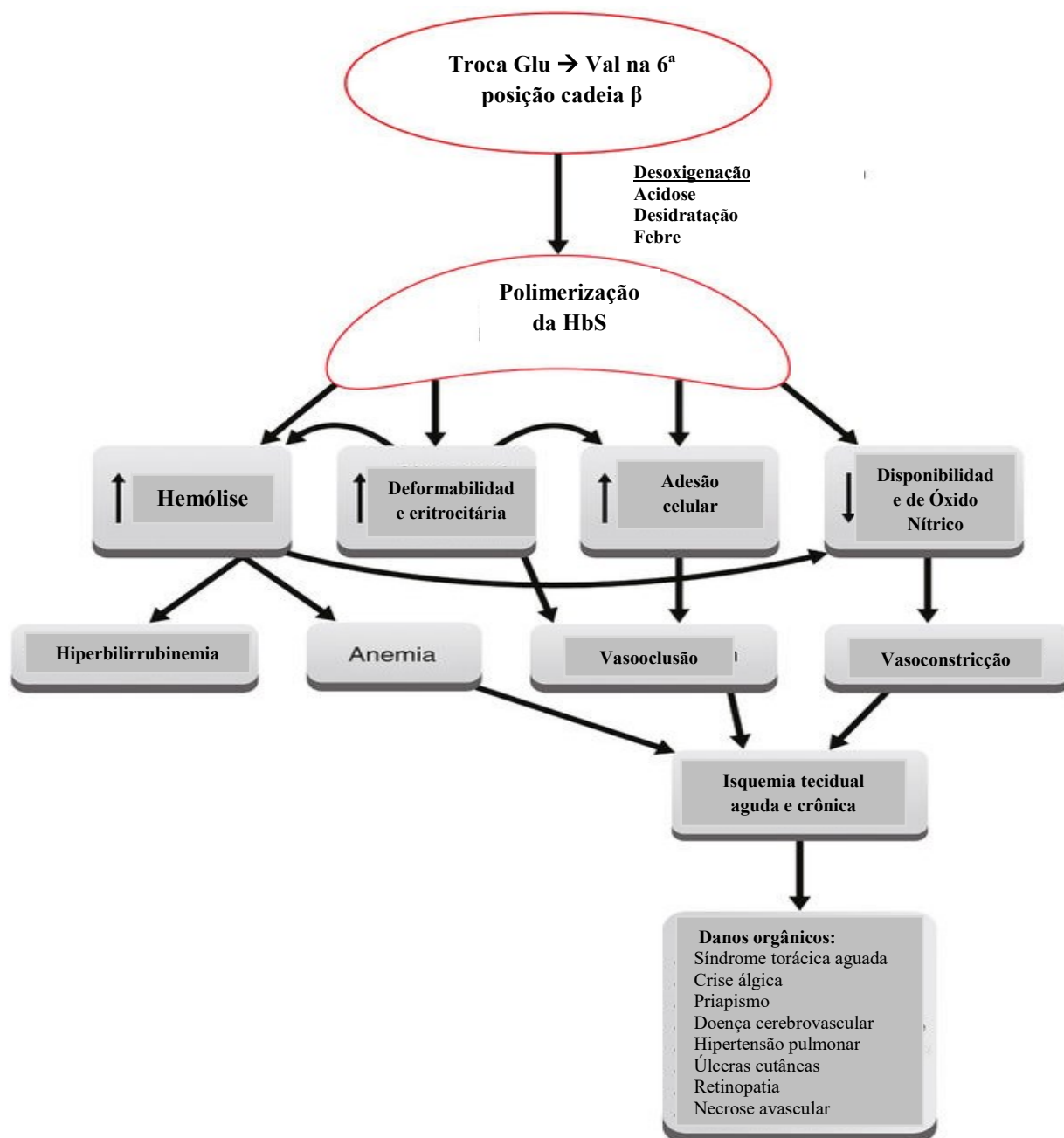


Figura 1: Fisiopatologia da anemia falciforme. A fisiopatologia é complexa e é decorrente da polimerização das hemácias que ocorre em estados de hipoxemia, desidratação, acidose e febre. Polímeros de hemoglobina S (HbS) causam alteração estrutural dos eritrócitos e levam a hemólise, deformabilidade anormal, adesão celular e diminuição da disponibilidade do óxido nítrico. Essas alterações resultam em anemia, vaso-oclusão e vasoconstrição, que são a causa da doença e do dano tecidual. Adaptado Meier, 2017³³.

A patogênese da oclusão vascular é muitas vezes desencadeada pelo processo inflamatório e está relacionada a vários fatores relativos à injúria vascular e ao envolvimento de células endoteliais, leucócitos e plaquetas. O *status* inflamatório favorece a vaso-oclusão, isquemia e, conseqüentemente, ao dano tecidual^{15,34}

A presença de hemácias falcizadas ativa o endotélio vascular com aumento da expressão de moléculas de adesão do endotélio (VCAM, P-selectina e E-selectina) que se ligam a moléculas de adesão dos eritrócitos e leucócitos, contribuindo para o aumento do processo vaso-oclusivo³⁵. Estudo realizado por Setty *et al.*, 2012 demonstrou níveis elevados desses biomarcadores de ativação endotelial em pacientes com AF, quando comparados a controles saudáveis³⁶.

Em condições normais, os eritrócitos possuem pouca ou nenhuma molécula de adesão em sua superfície, porém o estímulo da medula óssea devido a hemólise que ocorre na AF, libera uma maior quantidade de células jovens na circulação (reticulócitos), que expressam altos níveis dessas moléculas, como as integrinas 4 β 1 e CD36, o que facilita a interação dos reticulócitos com moléculas de adesão do endotélio e dos leucócitos^{15,37,38}.

A adesão das integrinas do endotélio vascular com os leucócitos leva a recorrentes eventos vaso-oclusivos, com ciclos de isquemia e reperfusão, causando estresse oxidativo e conseqüente lesão de múltiplos órgãos. A ativação de polimorfonucleares (PMN) e dos monócitos, também contribuem para o *stress* oxidativo

na AF pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são compostos químicos resultantes da ativação ou redução de oxigênio molecular.^{15, 38-40}

Na AF, os níveis de polimorfonucleares estão elevados e quando ativados também liberam uma maior quantidade de L-selectina (CD62L) para o plasma e diminuição da expressão de CD62L na superfície da célula. Os monócitos ativados nesses pacientes produzem IL-1 β e TNF α , além de induzir a expressão de ICAM, VCAM e E-selectina nas células endoteliais (interação monócito-célula endotelial), contribuindo com o processo vaso-oclusivo e as complicações clínicas dos pacientes^{42,43}. Esse processo de inflamação e vaso-oclusão que ocorre na AF está representado na Figura 2³⁰.

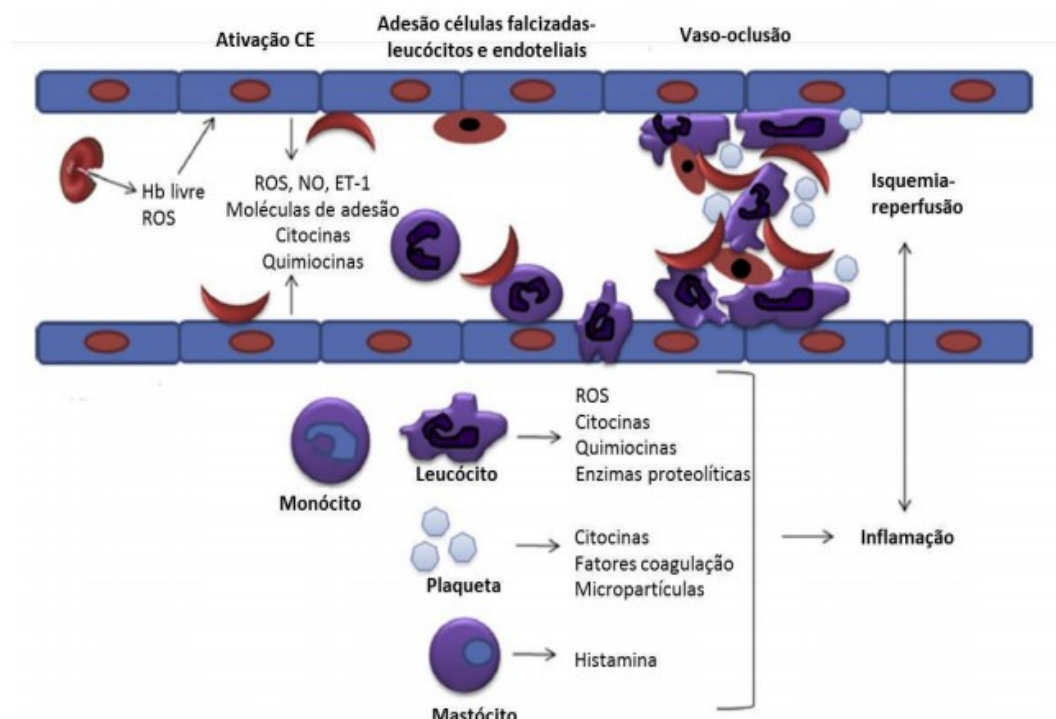


Figura 2. Inflamação e vaso-oclusão na anemia falciforme. CE: célula endotelial, Hb: hemoglobina, ROS: espécies reativas de oxigênio, NO: óxido nítrico, ET-1: endotelina-1. Adaptado Hoppe, 2014⁴¹

A hemólise intravascular é outro mecanismo central no processo de vaso-occlusão na AF^{44,45}. Nos pacientes com AF, a hemoglobina livre no plasma consome o óxido nítrico (NO) e libera arginase, que degrada a L-arginina. A L-arginina é o substrato para a produção endotelial de NO e está deficiente nos estados de isquemia-reperfusão, como ocorre nas crises vaso-oclusivas da AF, sendo mais um fator que contribui para a diminuição desse gás e aumentando a vaso-occlusão^{46,47}. Estudo realizado por Scavella, 2010, verificou níveis significativamente mais baixos de L-arginina em pacientes com AF, mesmo sem crise vaso-oclusiva, quando comparados a controles saudáveis, demonstrando ser a deficiência de L-arginina um fator importante na fisiopatologia da vaso-occlusão⁴⁸.

A redução dos níveis de NO associado ao aumento de mediadores inflamatórios e fatores pró-coagulante na circulação contribuem para a vasoconstricção e induzem a ativação do endotélio vascular, facilitando a adesão de hemácias, leucócitos e plaquetas, levando a obstrução do fluxo sanguíneo e diminuição da passagem de células na microcirculação. Esse fluxo mais lento expõe as hemácias a condições de hipóxia, com aumento da polimerização da HbS e consequentemente perpetua a vaso-occlusão^{33,49-51}.

Ainda no contexto de uma doença de patologia multifatorial, estudos sugerem que o estado de hipercoagulação na AF contribui diretamente na fisiopatologia da doença, evidenciado pelo aumento do fator tissular. Esse fator é derivado do endotélio vascular, que ativa a via extrínseca da coagulação, associado à ativação plaquetária, mesmo em estado de não crise vaso-oclusiva, favorecendo as complicações clínicas presentes nesses pacientes^{36,51,52}.

Outro aspecto importante na fisiopatologia da AF é a ocorrência de infartos intraesplênicos repetitivos, associados a deficiências das vias alternativas do

complemento e alterações da função leucocitária que os pacientes podem apresentar. Essas alterações predisõem os pacientes com AF a maior susceptibilidade a infecções, principalmente por bactérias encapsuladas. A infecção, por sua vez, é um desencadeador de crises vaso-oclusivas, o que pode piorar o quadro vascular, devido ao aumento da produção de citocinas inflamatórias, expressão das moléculas de adesão endoteliais e adesão das hemácias falciformes e dos neutrófilos no endotélio vascular, fator importante de agravamento das manifestações clínicas nesses pacientes^{17,53-57}.

Em suma, os pilares fisiopatogênicos da vaso-oclusão na AF são: fenômeno da falcização das hemácias, maior interação entre células endoteliais, leucócitos, e plaquetas, a vasculopatia, o estado inflamatório crônico e de hipercoagulabilidade^{8,58}

1.6 As plaquetas e a imunopatogênese na anemia falciforme

O sistema imune é composto por várias células presentes nos compartimentos corpóreos, na circulação sanguínea, e na linfa. As principais células do sistema imune são: monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos B, linfócitos T, células NK, entre outras. Dentre as células do sistema imune, temos também as plaquetas, que possuem um papel fundamental na hemostasia primária⁵⁹.

As plaquetas são células sanguíneas derivadas do citoplasma de megacariócitos. Apesar de serem anucleadas e desprovidas de ácido desoxirribonucleico (DNA), as plaquetas possuem em seu citoplasma grande quantidade de ribossomas e podem retranscrever RNA, usando o “spliceosome” e com isso apresentar muitas características funcionais de células completas, como a habilidade em sintetizar proteínas após ativação^{34,60}.

Classicamente as plaquetas estão relacionadas ao processo de coagulação. Quando ativadas aderem ao endotélio vascular lesado e liberam mediadores solúveis

intracelulares que recrutam e ativam novas plaquetas. Assim se forma o agregado plaquetário, que por sua vez ativa o sistema de coagulação⁶¹.

Durante a ativação plaquetária também ocorre maior afinidade das glicoproteínas da membrana plaquetária ao fator de Von Willebrand (FVW) e fibrinogênio, aumentando o estado coagulante e conseqüentemente o processo oclusivo. As plaquetas estimuladas pelas citocinas inflamatórias durante a resposta imune liberam multímeros de FVW, trombospondina e fibronectina, e os ligantes entre endotélio e células do sistema imune^{17, 53}.

Pacientes com AF tem maior concentração de multímeros do FVW no sangue, provavelmente por aumento da resistência a proteólise pela metaloprotease ADAMTS-13. Esses multímeros permanecem ancorados ao endotélio vascular, aumentando a agregação plaquetária e o estado permanente de hipercoagulabilidade, favorecendo os fenômenos trombóticos. Dessa forma, os multímeros do FVW devem contribuir com os fenômenos vaso-oclusivos e geração de marcadores trombogênicos de superfície do endotélio vascular, sendo alvo de estudos com drogas anti-coagulantes na tentativa de melhorar as complicações relacionadas a esses fenômenos^{15, 62}.

Apesar de estudos relatarem que a ativação da coagulação contribua de forma importante com as manifestações clínicas da AF, evidências apontam que a hipercoagulação, associada aos fenômenos inflamatórios crônicos está diretamente relacionada às complicações da doença⁶³.

Estudos mais recentes têm demonstrado a importância das plaquetas nos processos inflamatórios, contribuindo ativamente como moduladoras da imunidade inata e adaptativa, assim como da angiogênese^{34,64,65}. Durante o processo de ativação, as plaquetas expressam e secretam vários mediadores inflamatórios de seus grânulos,

como o CD40L, que são capazes de induzir resposta inflamatória em leucócitos e células endoteliais³⁴.

1.7 Biomarcadores de ativação plaquetária

O CD40L é uma proteína transmembrana de 33 kDa pertencente a superfamília do fator de necrose tumoral (TNFSF). É expressa em várias células, porém principalmente pela ativação de linfócitos T e plaquetas. Sua forma solúvel sCD40L encontrada no plasma é derivada em mais de 95% de plaquetas ativadas^{53, 66}.

Os receptores CD40L, quando clivados, geram uma forma solúvel desse receptor que se ligam as moléculas CD40 presentes na superfície de células B, monócitos, macrófagos, células dendríticas e do endotélio vascular, promovendo a ativação da resposta imune com produção de citocinas inflamatórias^{39,67,68}. Essa interação foi descrita na inflamação sistêmica vista no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), na aterosclerose, leucemia linfocítica aguda e doença inflamatória intestinal^{53,69}. Além disso, a forma solúvel do CD40L também promove atividade protrombótica por se ligar às integrinas IIb/IIIa presentes na superfície das plaquetas e atividade pró-coagulante através do aumento do fator tecidual⁵³.

Como descrito anteriormente, as células endoteliais inflamadas desencadeiam o mecanismo de ativação endotelial, com liberação de ROS, exposição do FvW e aumento da expressão das moléculas de adesão como as selectinas P (CD62p) e integrina $\alpha\beta 3$ e ICAM-1, na superfície do endotélio. As plaquetas são recrutadas ao

local da inflamação e começam a rolar sobre a camada de células endoteliais, e, conseqüentemente aderem aos ligantes protéicos. A adesão das plaquetas ao endotélio é mediada pela ativação da integrina α IIb β 3 e CD40L presentes nas plaquetas, as quais se ligam a integrina α v β 3 ou ICAM-1 das células endoteliais. As plaquetas, quando ativadas e aderidas ao endotélio, secretam IL-1 β , que resulta na ativação do NF- κ B endotelial, o qual induz a expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, selectinas P e E e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8) presente nas células endoteliais conforme ilustrado na Figura 3.

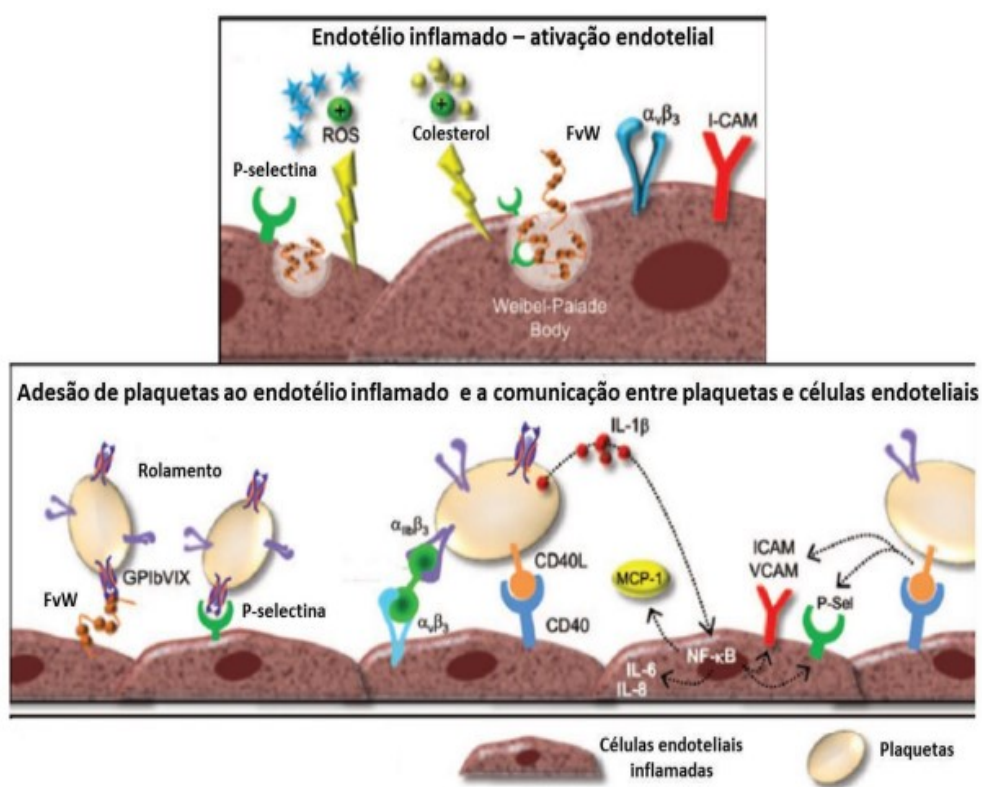


Figura 3. Interações entre plaquetas e endotélio. Adaptado Kaplan, ZS & Jackson SP, 2011⁷⁰.

Estudos sobre reações adversas a hemocomponentes em pacientes receptores de concentrado de plaquetas demonstraram que o aumento de mediadores bioativos, principalmente o CD40L, liberado pelas plaquetas ativadas durante a sua estocagem

seria o principal responsável pela reação inflamatória febril não hemolítica apresentada pelos pacientes, comprovando a importância da plaqueta no processo inflamatório.^{60,71}

Lee *et al.*, observaram elevadas concentrações plasmáticas de sCD40L em pacientes com AF na ausência e também na presença da crise vaso-oclusiva, comparados aos controles saudáveis, assim como uma correlação positiva com o aumento do fator tecidual e expressão da molécula de adesão intercelular ICAM-1 via interação com o CD40⁵³.

Estudos destacam a função do sCD40L como um importante biomarcador inflamatório nos pacientes com AF, potencialmente causador de oclusão vascular, contribuindo para o estado de hipercoagulabilidade e trombose, assim como para o aumento da inflamação característica da vasculopatia presente nessa doença. Por ser a plaqueta a principal fonte de sCD40L acredita-se ser a sua ativação crônica, a principal responsável pelo aumento desse marcador na AF, sugerindo a importância da plaqueta na patogênese da doença, assim como, a possibilidade de um “alvo terapêutico” para interromper esse processo nesses pacientes^{53,72}.

Alguns estudos na área da cardiologia também evidenciaram que o sCD40L estimula a expressão de fator tecidual em monócitos e células endoteliais, e induz a disfunção endotelial com diminuição da síntese de NO e aumento do stress oxidativo. Esses dois eventos contribuem para a injúria endotelial e aterogênese, podendo o CD40L ter um papel na fisiopatologia das doenças coronarianas agudas, o que corrobora com os achados nos pacientes com a hemoglobinopatia SS^{51,60, 73- 75}.

A interação CD40-CD40L com o endotélio induz a proliferação, diferenciação e ativação de várias células, a qual é caracterizada pela liberação de diversas citocinas como IL-1 β , IL-2, TNF- α e interferon- γ , e de fatores de crescimento que exercem efeitos pró e anti-inflamatórios. Essa interação também resulta na expressão de

moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, P-selectina (CD62P), e das quimiocinas *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) e *Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted* (RANTES), que regulam a migração de diferentes tipos celulares^{76,77}.

Além do CD40L, as plaquetas ativadas na AF expressam maior quantidade de CD62P, que favorece a ligação das plaquetas com o endotélio e neutrófilos. Essa molécula é um dos componentes da membrana plaquetária e também de seus grânulos α e densos. Durante a ativação e adesão das plaquetas, os grânulos α são mobilizados para que CD62P se distribua na superfície celular e posteriormente seja liberada para o plasma^{76,79,80}.

Marcadores de ativação plaquetária como CD62P, FP4, β -Thromboglobulina e micropartículas plaquetárias estão aumentados em pacientes com AF, na presença e na ausência de crise vaso-oclusiva⁷². CD62P juntamente com o CD40L induzem rapidamente a expressão de FT em plaquetas e monócitos de pacientes AF, contribuindo para o processo vaso-oclusivo e complicações clínicas encontradas nesses pacientes^{15, 42,51}.

1.8 Marcadores inflamatórios de plaquetas em pacientes com AF e manifestações cerebrovasculares

Devido à alta prevalência de doença cerebrovascular em crianças e adolescentes com AF, associado à elevada morbimortalidade e piora significativa na qualidade de vida dos pacientes, novas pesquisas têm sido desenvolvidas. Entre elas, destacam-se os estudos sobre fatores de risco relacionados, novos métodos diagnósticos de predição de

formas graves da doença, bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, substitutivas da transfusão⁸¹⁻⁸⁴.

Nesse sentido, alguns estudos têm evidenciado uma relação das proteínas do complemento com o desenvolvimento do AVC. O gene *MBL2*, que codifica a lecitina ligadora de manose (MBL), tem sido associado às modificações na progressão de doenças inflamatórias vasculares. Níveis séricos elevados de TNF- α foram detectados na AF e o polimorfismo na região promotora do gene TNF- α , tem sido também associado com presença de AVC em crianças com AF^{82,84,85}.

Outros estudos avaliaram a relação entre AVC e os haplótipos do cluster da beta globina, na tentativa de encontrar marcadores de risco para a doença cerebrovascular na AF, porém os resultados ainda são discordantes^{27,87,88}. Rodrigues *et al*, encontraram uma alta incidência de AVC em crianças com AF do sexo M, sendo o haplótipo Bantu (CAR) identificado em 82,9% desses pacientes, porém sem relação estatisticamente significativa com o AVC, sugerindo novas pesquisas para verificar o papel desses fatores genéticos na doença cerebral em crianças com AF⁸⁹.

Estudo realizado por Asare *et al.*, onde foram avaliados simultaneamente vários mediadores inflamatórios, como as citocinas interleucina (IL) 1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e as quimiocinas RANTES, MCP-1, entre outras. Os autores demonstraram que a interleucina 1 β foi um fator protetor independente no desenvolvimento de AVC em crianças com AF com DTC anormal e bom preditor de AVC (área sob a curva ROC de 0,852). O uso de níveis plasmáticos de IL-1 β em combinação com medidas de DTC, pode melhorar a avaliação do risco de AVC em pacientes com HbSS, por identificação precoce daqueles que necessitam de intervenções profiláticas intensivas. Os autores descrevem que outros estudos sejam realizados, para que o possível mecanismo protetor da IL-1 β seja melhor investigado⁸⁴.

Inwald *et al.*, analisaram 24 crianças, sendo 12 com AF e sequelas neurológicas e 07 crianças AF com crises dolorosas recorrentes, e encontraram evidências de ativação plaquetária (níveis elevados de CD40L e CD62P no grupo de pacientes) e predisposição a eventos vaso-oclusivos, quando comparados aos controles saudáveis. No entanto, o estudo não evidenciou associação significativa entre esses marcadores e complicações neurológicas⁸⁵.

Estudo realizado em 50 indivíduos nos Estados Unidos, com 18 pacientes com AF e AVC ou DTC alterado e estenose intracraniana; 07 pacientes com AVC ou DTC alterado sem estenose; 13 pacientes sem AVC ou DTC alterado e 12 controles saudáveis, demonstrou a importância da ativação plaquetária através do aumento significativo da expressão de CD62P na superfície das plaquetas nos pacientes AF com AVC ou DTC anormal e na presença de estenose intracraniana, quando comparado aos outros grupos. Ademais, os autores sugerem a necessidade de novas pesquisas, na tentativa de investigar a real função das plaquetas na fisiopatologia das lesões cerebrovasculares nos pacientes com AF⁸⁶.

Estudos sobre fisiopatologia da AF e as complicações clínicas associadas a vaso-oclusão, como as cérebro-vasculares, são relevantes, pois o AVC é uma doença grave e prevalente, com elevada morbimortalidade e de grande impacto na qualidade de vida dos pacientes.

Desse modo, diante da escassez de estudos nas bases de dados pesquisadas (SCIELO, LILACS e PUBMED) e considerando-se que a AF é uma doença inflamatória crônica, associada a estados permanentes de ativação plaquetária, com um maior risco de manifestações trombóticas e processos inflamatórios, achou-se oportuno e relevante à realização desse estudo, através da análise dos mediadores inflamatórios

oriundos das plaquetas e do endotélio que possam, associado ao exame de Doppler transcraniano, melhor avaliar o risco de AVC em pacientes com AF.

Portanto, a hipótese de pesquisa foi que mediadores inflamatórios oriundos da ativação plaquetária e endotelial, tais como sCD40, sCD40L e sCD62P, fossem elevados nos pacientes com AF com DTC anormal e AF com AVC, quando comparados aos controles saudáveis. O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis séricos de sCD40L, sCD40 e sCD62P em crianças e adolescentes com anemia falciforme e alteração do exame de Doppler Transcraniano, como fator de risco para acidente vascular cerebral nesse grupo de pacientes.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis séricos de sCD40L, sCD40 e sCD62P em crianças e adolescentes com anemia falciforme e anormalidade do exame de Doppler Transcraniano

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros hematológicos como hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e frações, plaquetas e reticulócitos;
- Determinar as concentrações séricas de sCD62P, sCD40L, sCD40;
- Avaliar a associação dos achados laboratoriais entre as formas clínicas de AF e alteração do DTC, com o grupo controle saudável;
- Correlacionar os níveis séricos entre sCD62P e sCD40L, sCD40 e sCD40L e sCD62P e sCD40 dos pacientes;
- Analisar e comparar os índices de sCD40L/sCD62P e sCD40L/sCD40 entre os grupos dos pacientes, com os dos indivíduos controles saudáveis.

III. MÉTODO

3.1 Desenho do estudo

Estudo translacional, de corte transversal e grupo de comparação interno.

3.2 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Os pacientes com AF foram captados no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Alagoas (HEMOAL), e o grupo controle saudável (de comparação) na enfermaria de Cirurgia Pediátrica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA/UFAL/EBSERH).

3.3 Período do estudo

A coleta de dados foi realizada no período de novembro de 2014 a dezembro de 2016. A pesquisa foi desenvolvida na Pós-graduação *stricto sensu* do IMIP no Programa DINTER IMIP/UNCISAL, visando atender aos objetivos propostos.

3.4 População de estudo e amostra

3.4.1 População de estudo

Casos: crianças e adolescentes de dois a 16 anos com diagnóstico de AF (Hb “SS”), acompanhados no ambulatório de hemoglobinopatias do HEMOAL.

Controles saudáveis: crianças e adolescentes saudáveis, entre dois e 16 anos internados para cirurgia eletiva na enfermaria de clínica cirúrgica pediátrica do HUPAA/UFAL/EBSERH.

3.4.2 Amostra

Devido à ausência de estudos semelhantes em humanos, não foi possível calcular previamente o tamanho da amostra. Por se tratar de estudo exploratório, obtivemos uma amostra de conveniência onde foram avaliadas crianças e adolescentes com AF que preencheram os critérios de elegibilidade durante o período de tempo destinado à coleta de dados.

- **Pacientes:** foi incluído um total de 48 crianças e adolescentes com diagnóstico de AF com idade entre dois a 16 anos.

Os pacientes foram recrutados e divididos em três grupos, de acordo com o diagnóstico de imagem (DTC) e as características clínicas da doença:

- Grupo 1: Pacientes AF com DTC normal e sem AVC (n= 24);
- Grupo 2: Pacientes AF e DTC anormal e sem AVC (n= 16)
- Grupo 3: Pacientes AF com histórico clínico de AVC (n= 8).

- **Controles saudáveis** (Grupo 4): foram incluídos 26 controles saudáveis (idade de dois a 16 anos). Os indivíduos controles saudáveis foram pacientes recrutados sem história de AF ou de internamento nos últimos 30 dias, hospitalizados na enfermaria de clínica cirúrgica pediátrica do HUPAA/UFAL/EBSERH para realização de cirurgias eletivas de pequeno porte.

3.5 Critérios de elegibilidade

3.5.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com AF (Hb SS) com idade entre dois a 16 anos, com uma das seguintes formas clínicas: AF com DTC normal e sem histórico de AVC (grupo 1); AF com DTC alterado, sem AVC e fora de regime de hipertransfusão (grupo 2) e AF com histórico clínico de AVC (grupo 3).
- Controles saudáveis: indivíduos saudáveis com idade entre dois e 16 anos, sem hospitalização prévia nos últimos 30 dias que antecederam a coleta das amostras e sem AF, hospitalizados na enfermaria de cirurgia pediátrica do HUPAA para cirurgia eletiva.

3.5.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com as seguintes condições:

- Diagnóstico prévio de imunodeficiência primária ou secundária;
- Uso crônico de drogas imunossupressoras;
- Sinais clínicos de infecção nos últimos 30 dias;
- AF em crise vaso-oclusiva ou outras complicações agudas relacionadas à doença;
- AF em uso de hemocomponentes há menos de 21 dias da coleta;
- AF em uso de hidroxiuréia;
- Mulheres gestantes com AF

3.6 Procedimentos para captação dos participantes da pesquisa

Os participantes foram selecionados pela pesquisadora, segundo os critérios de elegibilidade. Para a identificação e recrutamento dos casos, foram revisados os prontuários dos pacientes com AF atendidos no ambulatório de hemoglobinopatias do HEMOAL. A partir da identificação dos casos e aceite em participar da pesquisa, foi solicitado aos responsáveis pelos pacientes menores de 12 anos, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; APÊNDICE 2). Para os pacientes com idade entre 12 a 16 anos, foi também solicitado a assinatura do Termo de Assentimento ao paciente (APÊNDICE 3). Após consentimento e assinaturas dos Termos, foi aplicado protocolo clínico, que incluiu os critérios de elegibilidade (APÊNDICE 1) e em seguida foram coletadas as amostras de sangue para os exames laboratoriais. Foi criado um livro de registro para cadastro de todos os participantes da pesquisa, preenchido de acordo com a data de coleta dos exames laboratoriais. O recrutamento dos indivíduos controle saudáveis seguiu o mesmo protocolo dos pacientes, porém foi realizado na enfermaria de cirurgia pediátrica do HUPAA. A aplicação do instrumento de coleta de dados, coleta de exames, bem como a conservação e processamento das amostras biológicas, seguiram o fluxograma proposto para a pesquisa (**Figura 4**).

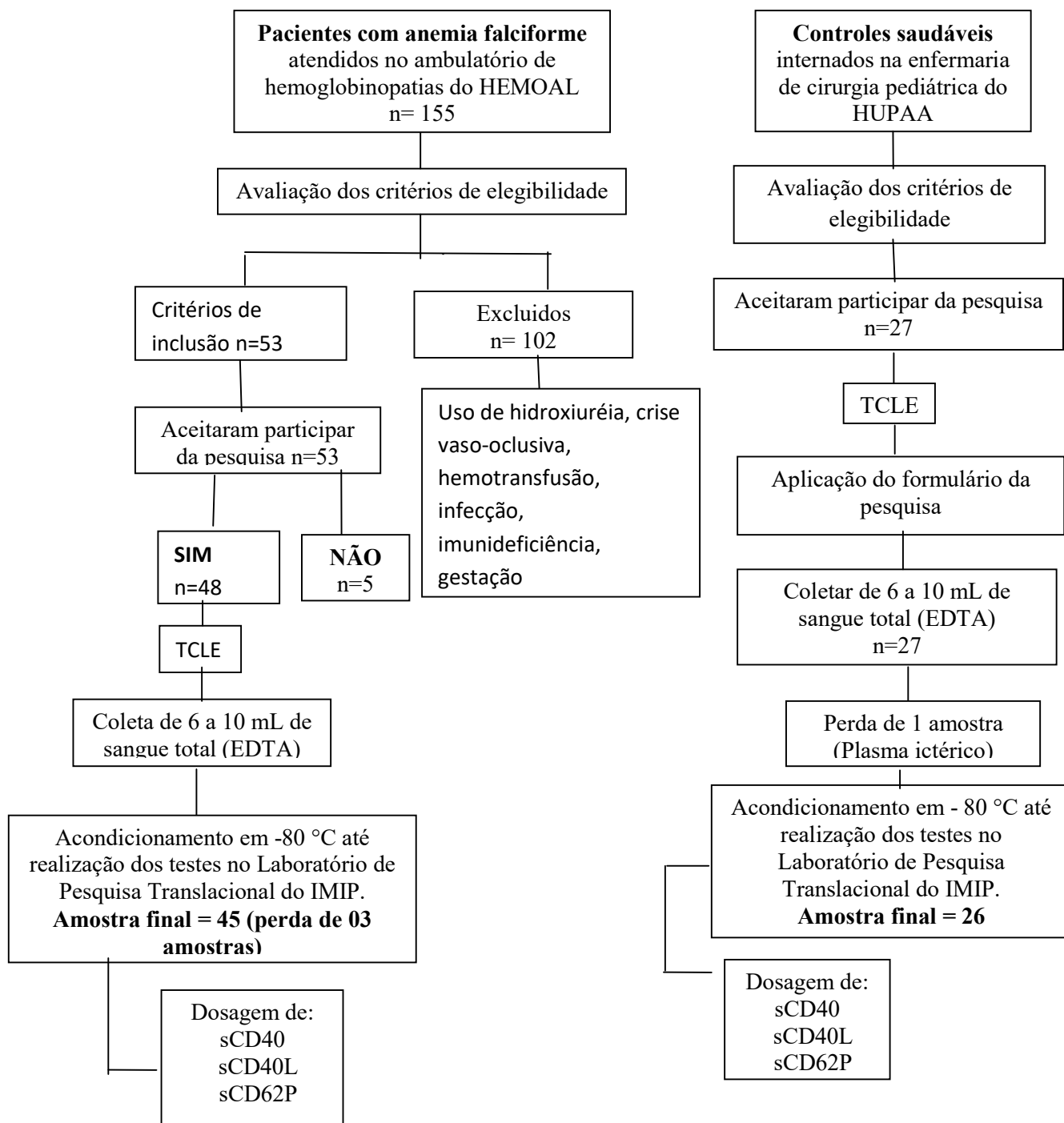


Figura 4: Fluxograma de captação de pacientes e dos controles saudáveis.

3.7 Definição e operacionalização dos termos

- **Anemia Falciforme:** doença genética decorrente da mutação no gene da beta globina, em homozigose, levando a uma substituição do ácido glutâmico pela valina na 6^a posição da cadeia beta, com consequente modificação físico-química da molécula da hemoglobina⁹.
- **Acidente vascular cerebral (AVC):** doença cérebro vascular decorrente da isquemia ou hemorragia dos vasos sanguíneos cerebrais, sendo uma das complicações mais graves da anemia falciforme²³.
- **Doppler transcraniano (DTC):** exame de imagem, onde utiliza uma técnica simples de ultrassom para medir indiretamente o fluxo sanguíneo nas porções proximais das principais artérias intracranianas pertencentes ao polígono de Willis. É utilizado como método preditor de doença cerebrovascular na DF. Considera-se o DTC anormal com VFSC de 200 a 219 cm/s e anormal alto VFSC ≥ 220 cm/s⁷⁸. No nosso estudo, O DTC foi realizado no Hemoal pelo Dr. Camilo Vieira, médico neurologista pediátrico do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, em todos os pacientes AF na faixa de risco para AVC (idade de dois a 16 anos), com exceção dos pacientes já com história prévia de AVC. O equipamento utilizado foi o Doppler modelo *Ezdop, Germany* que utiliza sonda de 02 megahertz (MHz). Foram medidas as velocidades do fluxo sanguíneo cerebral (VFSC) e velocidade média máxima calculada no tempo (MMCT) nas artérias cerebrais médias e carótida interna.

3.8 Coleta de sangue e preparação das amostras

As amostras de sangue foram coletadas logo após a realização do DTC ou sempre anterior ao início do esquema de hipertransusão de concentrado de hemácias, nunca ultrapassando 30 dias após a realização do exame. Sempre que possível, as amostras foram coletadas aproveitando o momento da coleta de exames solicitados para o acompanhamento ambulatorial dos pacientes, a fim de se evitar repetição de punções.

Para os testes realizados no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP (sCD40, sCD40L e sCD62P), um volume de 6 a 10 mL de sangue total foi colhido com anticoagulante EDTA, que foi centrifugado a 1800 RPM, por 5 minutos a uma temperatura de 4° C para obtenção do plasma rico em plaquetas. Posteriormente, o plasma foi separado em alíquotas de 1 mL e centrifugado a 14000 RPM por 10 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Foram feitas alíquotas de 500 µL e congeladas em freezer a – 80°C, até a realização dos testes laboratoriais.

A principal dificuldade encontrada durante o período da pesquisa foi o fato da coleta das amostras de sangue dos pacientes e controles saudáveis terem sido realizadas em Maceió e os testes laboratoriais para os mediadores inflamatórios das plaquetas, processados no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP em Recife. Para evitar alterações dos testes laboratoriais durante o transporte, todas as amostras foram armazenadas a –80^oc, imediatamente após as centrifugações do sangue total e transportadas até Recife, obedecendo todas as normas para transporte de amostras biológicas.

Para a realização do hemograma e contagem de reticulócitos, foram colhidos 4 mL de sangue total, também com anticoagulante EDTA. Os tubos foram armazenados à temperatura ambiente, por um período máximo de 2h, até a realização dos exames no Laboratório de Análises Clínicas do HUPAA/UFAL/EBSERH.

3.9 Testes laboratoriais

3.9.1 Dosagem da concentração de sCD62P

A concentração de sCD62P solúvel no plasma, foi mensurada por imunofluorescência, utilizando o *Cytometric Bead Array (CBA) - Human Soluble CD62P Flex Set* (BD Biosciences), seguindo as instruções do fabricante⁹⁰. O ensaio BD CBA fornece um método de captura de analitos solúveis com beads de conhecidos tamanho e fluorescência, possibilitando a detecção do CD62P através da citometria de fluxo. Controles e amostras foram diluídos e misturados em volumes iguais de 50 µL com as beads de captura e com um anticorpo específico anti-CD62P, incubadas a temperatura ambiente (TA) por 1h. Posteriormente foram misturadas com 50 µL do reagente de detecção – *phycoerythrin- PE* e novamente incubadas a TA por 2h, protegidas da luz, fornecendo um sinal fluorescente proporcional a quantidade do CD62P ligado, sendo essa fluorescência mensurada por citometria de fluxo. Foram adquiridos 300 eventos no equipamento de citometria de fluxo (FACSVERSE®, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A análise foi realizada no *FCAP Array software v 3.0.1*(BD BIOSCIENCES, CA). Os valores foram expressos em pg/ml, sendo o limite de detecção do kit de 2,9 pg/ml.

3.9.2 Dosagem da concentração de sCD40L e sCD40

A dosagem de sCD40L e sCD40 foi realizada por Ensaio imunoenzimático com técnica de leitura usando ELISA sandwich - *Human sCD40L Platinum ELISA extra sensitive e, Human sCD40 Platinum ELISA, Kit (eBioscience, USA)*, respectivamente, para a detecção quantitativa de CD40L e CD40 solúveis no plasma dos pacientes e controles saudáveis, conforme instruções dos fabricantes^{91,92}.

Após a obtenção do PPP e diluição 1:2 das amostras e controles, 100 µL dos anticorpos de captura específicos anti-CD40 e anti-CD40L foram adicionadas a placa de ELISA e incubados a TA “*overnight*”. Após incubação, 100 µL das amostras foram pipetadas e, posteriormente conjugadas aos anticorpos anti-humanos de detecção, tanto nas diluições da curva como no plasma controle dos kits. A seguir adicionou-se 100 µL de substrato capaz de produzir uma coloração proporcional a quantidade de sCD40 e sCD40L presentes no plasma dos pacientes e controles. A leitura das absorbâncias foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm. Os valores foram expressos em ng/mL, sendo o limite de detecção do kit < 0,01 ng/mL.

3.9.3 Determinação dos valores de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos, reticulócitos e plaquetas

A determinação da hemoglobina, hematócrito, contagem global e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas dos pacientes com AF, foi realizada em analisador automatizado hematológico CELL-DYN Ruby ABBOTT Diagnostics, em 5 populações, que utiliza metodologia por difração à laser, no Laboratório de Hematologia do Hemocentro de Alagoas-HEMOAL. Os resultados de Hb, Ht, leucócitos e plaquetas, foram expressos em grama por decilitro (g/dl), valor percentual (%), contagem global x 10³, respectivamente. As determinações dos controles foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do HUPAA/UFAL, utilizando o mesmo modelo de equipamento.

3.10 Controle de qualidade das informações

Antes do início da coleta dos dados e amostras dos pacientes incluídos no estudo, foi realizada uma reunião para a apresentação do projeto no HEMOAL, a todos os membros envolvidos na pesquisa. A finalidade foi demonstrar a importância científica do mesmo, assim como orientar sobre o seguimento correto dos protocolos de coleta de informações e amostras laboratoriais, a fim de se evitar problemas que pudessem interferir com os resultados da pesquisa.

A pesquisadora realizou treinamento dos profissionais envolvidos no estudo, no preenchimento correto do formulário de coleta de dados (APÊNDICE I), obtenção do TCLE (APÊNDICE II) e do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE III) e acesso ao prontuário. Também foi realizado treinamento de duas técnicas de laboratório do HEMOAL e HUPAA, responsáveis pela coleta e preparação das amostras de sangue dos pacientes e controles para as análises laboratoriais, assim como, abertura do livro de registro dessas amostras, apenas para fins da pesquisa. Após o preenchimento dos formulários e livros, estes foram revisados pela própria pesquisadora, visando detectar eventuais falhas de registro ou ausência de informações, que pudessem prejudicar a análise dos dados do estudo e pudessem ser corrigidas a tempo.

Os formulários e amostras foram codificados com a sigla CAF (Cintha Anemia Falciforme) e checados, visando garantir a segurança dos dados e erros na fase pré-analítica das dosagens laboratoriais. Desta forma, todas as amostras sanguíneas foram rotuladas e receberam um número sequenciado. As alíquotas sanguíneas foram preparadas e armazenadas em freezer a -80°C no laboratório de HLA do HEMOAL, até serem transportadas ao Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP, seguindo as normas de transporte de amostras biológicas.

Todo o processo de convocação dos pacientes e controles, assim como a coleta das amostras e análises laboratoriais foi acompanhado e/ou realizados pela pesquisadora.

3.11 Análise estatística

Na análise descritiva, as variáveis numéricas são apresentadas em forma de tabela de medidas de tendência central e de dispersão de acordo com a forma clínica de doença e grupo controle, ou seja, média \pm desvio padrão (DP), em casos de distribuição normal, ou mediana com intervalo interquartil (IQR), em caso de distribuição não normal. Após a aplicação do teste de normalidade de *Shapiro Wilk*, as variáveis numéricas que apresentaram distribuição normal foram comparadas através dos testes *t* não pareado e testes não paramétricos foram usados para comparar variáveis numéricas com distribuição não normal entre grupos: teste *Kruskall-Wallis*. Coeficiente de Correlação de Spearman's (distribuição não normal) foi usado para realizar análise de correlação e interpretado da seguinte forma: 0,00 a 0,30 desprezível; 0,30 a 0,50 baixo; 0,50 a 0,70 moderado; 0,70 a 0,90 alto e 0,90 a 1,00 muito alto⁹³. Foi considerado significativo $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada através do *GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA)*.

3.12 Aspectos éticos

Esse projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP, sob o N^o 4434-14 (Anexo 1). O HEMOAL autorizou a realização da pesquisa, através de carta de anuência, concordando em participar do estudo (Anexo 2), assim como o HUPAA/UFAL liberou uma autorização para execução da pesquisa, conforme Anexo 3.

IV. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados no formato de manuscrito em inglês.

Revista: Blood Cells, Molecules and Diseases

Formato do artigo: Short Communication (Instruções aos autores no Anexo 4)

Fator de Impacto: 1.882

Situação: Submetido em 06/05/2018 (comprovante de submissão no Anexo 5)

Title: Analyses of the soluble levels of sCD40L, sCD62P and sCD40 in pediatric sickle cell anemia patients with abnormal transcranial Doppler

Cintha Pereira Leite Costa de Araújo^{1,2}, Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte²
Marina Cadena da Matta², Leuridan Cavalcante Torres²

¹Universidade de Ciências da Saúde do Estado de Alagoas (UNCISAL), Maceió, Brazil

²Translational Research Laboratory Prof CA Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil

Corresponding author:

Leuridan Cavalcante Torres, PhD

Translational Research Laboratory Prof. C. A. Hart

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP),

P.O. Box 1393

Rua dos Coelhos, 300

Recife, PE 50070-550 Brazil

Phone +55 81 2122-4702

Fax +55 81 2122-4703

E-mail: leuridan.torres@gmail.com

ABSTRACT

Serum levels of sCD40L, sCD40 and sCD62P were evaluated in Sickle cell anemia (SCA; age between 2 and 16 years) and normal transcranial Doppler (TCD) and no stroke (G1, n=24); SCA and abnormal TCD (G2, n=16); SCA and previous history of stroke (G3, n=8) and healthy controls (aged 2 to 16 years; n=26). The levels of sCD40L were significantly higher in the G1, G2 and G3 groups when compared to controls ($p=0.0001$, $p <0.0002$ and $p=0.004$, respectively). Among patients with SCA, were found higher levels of sCD40L in the G3 group when compared to G2 group ($p=0.03$). In the sCD62P analysis, high levels in G3 when compared to G1 ($p = 0.0001$); G2 ($p = 0.03$) and G4 ($p= 0.01$), and G2 also had high levels when compared to G1 ($p = 0.04$). G1 patients had a higher sCD40L/sCD62P ratio when compared to G2 ($p=0.003$) and controls ($p <0.0001$). sCD40L/sCD40 ratio were higher in G1, G2, G3 when compared to controls ($p<0.0001$, $p=0.008$ and $p = 0.002$, respectively). It is concluded that the combination of TCD abnormality associated to levels of sCD40L and sCD62P may contribute to a better assessment of the risk for stroke in pediatric SCA patients.

Keywords: sickle cell anemia, stroke, blood platelets, CD40 antigen, CD40 Ligand inflammation, immune system.

1 INTRODUCTION

Stroke is a severe neurologic complication of sickle cell anemia (SCA) and transcranial Doppler (TCD) screening is an important tool in predicting the risk of overt stroke [1-3]. TCD measures cerebral blood flow velocity and an abnormal TCD (defined by a time-averaged velocity > 200 cm/second) has been predictive of 40% risk of overt stroke in children with SCA [1-3].

Platelets are involved in the process of hemostasis and inflammation and play an important role in the innate and adaptive immune response [4,5]. Platelets express a large amount of CD40 ligand (CD40L) and P- selectin (CD62P), both membrane-bound and soluble forms (sCD40L e sCD62P) [4,5]. These proinflammatory molecules associated with platelets have been considered as markers of platelet activation in autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and cancer [6-8]. However, the potential of these molecules as risk biomarkers for stroke in children with SCA is not described in literature.

Therefore, the investigation of these inflammatory mediators in peripheral blood is important for the early identification of patients at risk of stroke, avoiding severe and debilitating complications associated with SCA. Thus, the aim of this study was to examine the relationship between sCD40L, sCD40 and sCD62P in peripheral blood of children and adolescent with SCA and an abnormal TCD.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Subjects

This study included 48 patients with SCA aged 2-16 years followed at the Centro de Hematologia e Hemoterapia de Alagoas (HEMOAL, Brazil) and the study was conducted at the Translational Research Laboratory Prof. C. A. Hart of the Instituto

de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP, Recife, Brazil). Exclusion criteria for the patients included use of hydroxyurea, blood components transfusion 21 days prior to the collecting of the blood sample, infections in the last 30 days, chronic use of immunosuppressive drugs, previous diagnosis of primary or secondary immunodeficiency, and gestation.

The control group included 26 healthy subjects aged 2-16 years undergoing outpatient elective surgery at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Alagoas (UFAL, Brazil).

All patients with SCA underwent TCD examination to evaluate cerebral blood flow velocity in the intracranial arteries using a (Doppler; Probe 2 Mhz model, Ezdap, Germany). The time averaged maximum mean velocity (TAMM) was measured in the middle cerebral artery and internal carotid artery and a TDC ≥ 200 cm/s was considered abnormal. Patients with SCA were divided into three groups: (G1) SCA, normal TCD and no stroke (n = 24); (G2) SCA, abnormal TCD and no stroke (n = 16); and (G3) SCA and previous history of stroke (n = 8) and Group 4 (G4) healthy controls (n=26).

The study was approved by IMIP's Research Ethics Committee and after written informed consent has been provided by the parent of patients and controls, clinical data and blood samples were collected.

2.2 Measurement of sCD40, sCD40L and CD62P and hematological parameters

Peripheral blood collection was drawn in K2 EDTA tubes for hematological parameters, sCD40, sCD40L and sCD62P measurement. Blood samples of the patients were collected after performing the TCD and prior to the beginning of hypertransfusion regimen. The dosage of hemoglobin (g/dL), reticulocytes (%), leukocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$),

neutrophils ($\times 10^3/\mu\text{L}$), lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$) and platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$) were performed in automated cell counter (Cell-Dyn Ruby – Abbott Diagnostics, CA, USA),

The concentration of sCD40 and sCD40L was measured in platelet-free plasma by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using Human sCD40 and sCD40L Human Platinum ELISA Kit (eBioscience, USA), respectively, according to the manufacturer's instructions. Values were expressed in pg/mL.

The concentration of sCD62P was measured in platelet-free plasma by flow cytometry (BD™ FACSVerse – BD Biosciences, CA, USA) using BD™ CBA Human Soluble CD62P (P-Selectin) Flex Set, according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using FCAP Array software (BD Biosciences, CA, USA) and values expressed in pg/mL.

2.3 Statistical analysis

Continuous variables are represented as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR). The Shapiro-Wilk normality test was used to assess normality. Continuous variables were compared by Kruskal Wallis or ANOVA tests. Spearman (nonparametric) correlation coefficient was used to correlation analysis and interpreted as follows: 0.0-0.3, negligible; 0.3-0.5, weak; 0.5-0.7, moderate; 0.7-0.9, strong; 0.9-1.0, very strong. P-values < 0.05 were considered significant. Data analysis were performed in GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Patients with SCA (groups G1, G2 and G3) had significantly higher median values of sCD40L ($p < 0.0001$, $p = 0.0002$ and $p = 0.004$, respectively) than healthy controls (group G4; Figure 1A). Elevated levels of sCD40L were also observed by Lee

et al, 2006 in a study with 45 patients with SCA, including eight patients with vaso-occlusion and 37 patients in the non-crisis steady state [9]. This suggests an important role of platelet-derived inflammatory mediators in process of chronic inflammation and thrombotic activity, which are common features of SCA [9].

Among patients with SCA, significantly higher levels of sCD40L were observed in patients in group G3 (median 1.330 pg/mL) when compared to patients in group G2 (median 1.003 pg/mL, $p=0.03$; Figure 1A). This may reflect a high expression on the surface and a release of sCD40L by activated platelets [6], suggesting that sCD40L may represent a potential soluble biomarker of vascular injury and thrombus formation in patients with SCA and stroke. Studies show elevated sCD40L levels in acute myocardial infarction and chronic inflammatory diseases [6,9-14]. Our data corroborate the findings from Majumdar et al, which showed a significant increase in platelet activation through of the dosage of sCD40L levels in patients with SCA and stroke or abnormal TCD and intracranial stenosis [15].

Comparison of sCD40 levels showed no significant difference between groups (Figure 1B). CD40 is presented on antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells, macrophages and B lymphocytes and vascular endothelium. CD40L are present on T-lymphocytes and on 95% of the circulating platelets [4-5] and CD40-CD40L interactions are essential for activation of APCs by cell-cell contact and activation of endothelium [12]. Our results indicate that the soluble form of CD40 is not involved in chronic diseases and cerebrovascular disease in SCA. SCD40L/sCD40 ratio were increased 7.1-fold, 6.1-fold and 7.7-fold in the groups G1, G2 and G3, respectively, compared to healthy controls ($p<0.0001$, $p=0.008$ and $p = 0.002$, respectively). However, no significant difference was observed between groups G1, G2 and G3 (Table 1).

Levels of sCD62P were higher in patients of group G3 when compared to groups G1, G2 and G4 ($p = 0.0001$, $p = 0.03$, $p = 0.01$, respectively) and patients of group G2 had higher levels when compared to patients of group G1 ($p=0.04$; Figure 1C). Therefore, we hypothesize that the increase of sCD62P in patients with SCA and stroke, when compared to normal TCD and no stroke and abnormal TCD is due to elevated levels of sCD62P produced by platelet activation associated to endothelial injury present in stroke.

Kutlar et al demonstrated that increased expression of CD62P in the in the microvascular endothelium of patients with SCA represents an important role in mechanisms of acute vascular occlusion and in chronic form can cause changes in blood flow [16]. Our data show significantly higher levels of sCD62P in patients of group G2 when compared to patients of group G1 ($p=0.04$). Abnormal TCD refers to increased blood flow velocity through the large cerebral arteries [16], which may lead to increased platelet activation even without vascular injury, resulting in elevated sCD62P levels. Thus, our findings indicate that sCD62p may be a possible biomarker of cerebrovascular disease installed or pre-disease in patients with SCA.

Analysis of sCD40L/sCD62P ratio showed that patients of group G1 had higher ratio when compared to patients of group G2 ($p=0.003$) and healthy controls ($p<0.0001$). No significant difference was observed between group G3 and groups G1 and G2, as shown in Table 1. Our data suggest that decreased values of sCD40L/sCD62P ratio involving two inflammatory mediators produced in platelet activation. In this way, a similar study in patients with acute myocardial infarction showed that the association of two inflammatory mediators, such as troponin and sCD40L, increases the accuracy of prediction of infarction [13].

In correlation analysis, there was no significant difference between levels of sCD40L vs sCD62P ($r=0.001$, $p>0.9$), sCD40 vs sCD62P ($r=0.18$, $p=0.2$) and sCD40 vs sCD40L ($r =0.26$, $p=0.11$), which suggests that the mechanisms of production of these mediators are independent in SCA, although these mediators are produced at higher plasma concentration by platelets.

Patients with SCA showed higher absolute values of leukocytes, neutrophils, reticulocytes and platelets, and lower values of hemoglobin when compared to healthy controls ($p<0.05$). These findings corroborate the continuous hemolytic condition that occurs in patients with SCA, which is independent of the complications of the disease. These complications are more common in the vaso-occlusion, associated with a reactive bone marrow, and evidenced by high reticulocytosis found in these patients [17,18].

Therefore, the combination of TCD abnormality associated with possible mediators such as sCD40L and sCD62P could provide a better assessment of risk of stroke in pediatric SCA patients. Moreover, further studies evaluating these molecules in cell surface and correlating them with the soluble forms are needed to better clinical application, since these molecules could be target for the development of therapeutic strategies for SCA.

Conflict of interest statement

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

Acknowledgments

The authors thank the patients and their families for their contribution and Camilo Vieira for his help with the TCD exam. This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

REFERENCES

- [1] Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1992;326(9):605-10.
- [2] Brewin J, Kaya B, Chakravorty S. How I manage sickle cell patients with high transcranial doppler results. *Br J Haematol.* 2017;179(3):377-388.
- [3] Adams RJ, Nichols FT 3rd, Aaslid R, McKie VC, McKie K, et al. Cerebral vessel stenosis in sickle cell disease: criteria for detection by transcranial Doppler. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990;12(3):277-82.
- [4] Au AE, Josefsson EC. Regulation of platelet membrane protein shedding in health and disease. *Platelets.* 2017;28(4):342-353
- [5] Iannacone M. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. *Semin Immunol.* 2016;28(6):555-560.
- [6] Senhaji N, Kojok K, Darif Y, Fadainia C, Zaid Y. The Contribution of CD40/CD40L Axis in Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Frontiers in Immunology.* 2015;16;6:529.
- [7] Pankratz S, Bittner S, Kehrel BE, Langer HF, Kleinschnitz C, et al. The inflammatory role of platelets: translational insights from experimental studies of autoimmune disorders. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10). pii: E1723.

- [8] Davila J, Manwani D, Vasovic L, Avanzi M, Uehlinger J, et al. A novel inflammatory role for platelets in sickle cell disease. *Platelets*.2015; 26(8):726-9.
- [9] Lee SP, Ataga KI, Orringer EP, Phillips DR, Parise LV. Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):1626-31.
- [10] Nagasawa M, Zhu Y, Isoda T, Tomizawa D, Itoh S, et al. analysis of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in the patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: platelet is a major source of serum sCD40L. *Eur J Haematol*. 2005;74(1):54-60.
- [11] Aloui C, Prigent A, Tariket S, Sut C, Fagan J, et al. Levels of human platelet-derived soluble CD40 ligand depend on haplotypes of CD40LG-CD40-ITGA2. *Sci Rep*. 2016;6:24715.
- [12] Antoniadis C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 Ligand system. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(8):669-77.
- [13] Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, et al. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;108(9):1049-52.
- [14] Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, et al. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke*. 2003;34(6):1412-8.
- [15] Majumdar S, Webb S, Norcross E, Mannam V, Ahmad N, et al. Stroke with intracranial stenosis is associated with increased platelet activation in sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(7):1192-7..
- [16] Kutlar A, Ataga KI, McMahan L, Howard J, Galacteros F, et al. A potent oral P-selectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell injury in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2012;87(5):536-9.

- [17] Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011; 108(31-32):532-40.
- [18] Damanhoury GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, et al. Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(1):24-31.

Figure 1

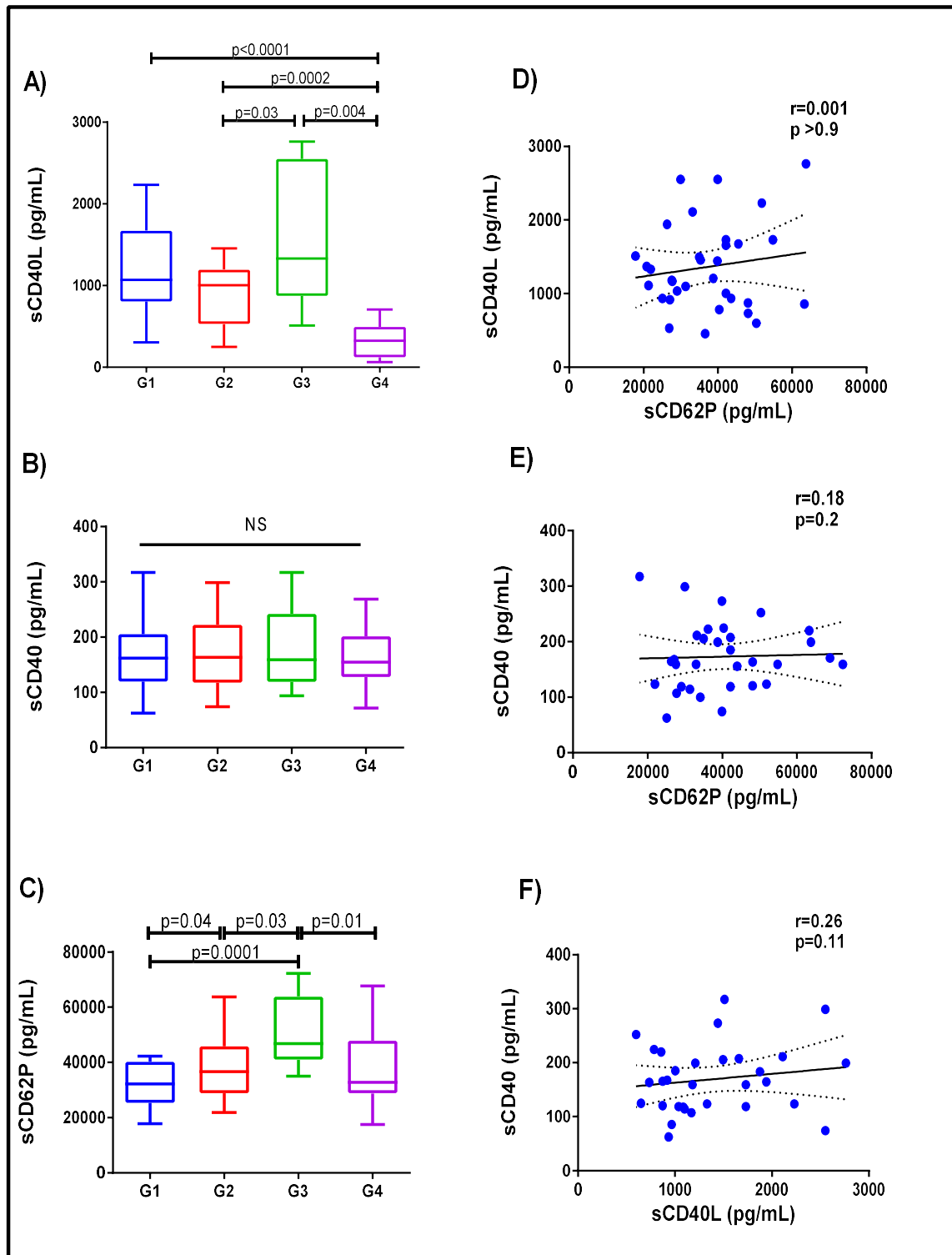


Figure 1. Plasma levels of sCD40L (A), sCD40 (B) and sCD62P (C) of patients with sickle cell anemia according to clinical forms of the disease and control group. Correlation analyses between sCD40L versus sCD62P (D), sCD40 versus sCD62P (E) and sCD40 versus sCD40L (F) of the SCA patients. G1: SCA, normal TCD and no stroke; G2: SCA, abnormal TCD and no stroke; G3: SCA and stroke; G4: Controls. SCA: sickle cell anemia; TCD: Transcranial Doppler; Median and interquartile range (IQR); Kruskal - Wallis test. Nonparametric Spearman correlation. P-values < 0.05.

Table 1. Inflammatory and hematological parameters of patients with sickle cell anemia according to clinical forms of the disease and control group.

Inflammatory Parameters	G1 (N=24)	G2 (N=16)	G3 (N=8)	G4 (N=26)	<i>P-Values*</i>					
					G1 X G2	G1 X G3	G2 X G3	G1 X G4	G2 X G4	G3 X G4
sCD40L/sCD40 ^a	7.1 (5.5-12.5)	6.1 (3.7-7.8)	7.7 (2.7-13.5)	1.02 (0.9-2.6)	0.2	0.9	0.4	<0.0001	0.008	0.002
sCD40L/sCD62P ^a (x 10 ²)	4.0 (2.8-5.9)	2.2 (1.5-3.0)	2.7 (1.5-3.4)	0.8 (0.2-1.2)	0.003	0.3	0.37	<0.0001	0.0002	0.0002
Hematological Parameters										
Leukocytes ^b x 10 ³ /μL	13.2 (±3.9)	13.9 (±4.2)	12.7 (±3.0)	8.0 (±1.3)	0.6	0.6	0.4	<0.0001	<0.0001	0.0004
Neutrophils ^a x 10 ³ /μL	5.8 (3.5-7)	5.9 (4.6-9.9)	5.1 (4.5-7.1)	3.5 (2.6-4.4)	0.3	0.9	0.2	0.001	<0.0001	<0.0007
Lymphocytes ^a x 10 ³ /μL	4.8 (4.2-5.4)	3.8 (2.9-5)	3.1 (2.7-5.1)	3.3 (2.6-3.5)	0.01	0.02	0.5	<0.0001	0.07	0.5
Hemoglobin ^b (g/dL)	7.7 (±1.0)	7.8 (±1.4)	8.7 (±1.2)	12.9 (±0.8)	0.8	0.01	0.08	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Reticulocytes ^b (%)	7.2 (±2.6)	6.8 (±2.6)	7.3 (±2.9)	1.2 (±0.3)	0.5	0.7	0.7	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Platelets ^a x 10 ³ /μL	445 (±187)	377.5 (±99)	423 (360-461)	315 (±57)	0.1	0.6	0.1	0.0003	0.01	0.0002

SCA: sickle cell anemia; TCD: Transcranial Doppler; G1: SCA, normal TCD and no stroke; G2: SCA, abnormal TCD and no stroke; G3: SCA and stroke; G4: Controls. ^amean and standard deviation; ^bmedian and interquartile range (IQR); *Kruskall - Wallis test. *P-values < 0.05.

V. CONCLUSÕES

Com o estudo foi possível concluir:

- 1- Pacientes com AF apresentam alterações nos parâmetros leucocitários e hematológicos, confirmando o quadro hemolítico e a medula óssea reativa presentes na AF;
- 2- Entre os pacientes com AF observou-se níveis elevados sCD40L no grupo de pacientes com AVC, quando comparado ao grupo de AF com DTC anormal, sugerindo que esse mediador inflamatório pode estar envolvido na lesão vascular e formação de trombo na AF;
- 3- Não se observou alteração nos níveis de sCD40, o que sugere não existe envolvimento desse mediador nas complicações cerebrovasculares;
- 4- As alterações encontradas nos níveis de sCD62P nos pacientes com história clínica de AVC sugerem que a ativação plaquetária está presente na doença cerebrovascular já instalada na AF;
- 5- Não foi observado correlação entre o sCD40L *versus* sCD62P; sCD40 *versus* sCD62P e de sCD40 *versus* sCD40L, sugerindo mecanismos distintos de produção desses marcadores;
- 6- A análise da relação entre sCD40L e sCD62P associado ao exame de DTC pode ajudar na detecção do risco de AVC.

Portanto, a combinação de anormalidade do DTC associada ao aumento de possíveis mediadores inflamatórios, como sCD40L e sCD62P, poderia fornecer uma melhor avaliação do risco de AVC em pacientes pediátricos e adolescentes com AF.

Para uma aplicação clínica desses resultados, faz-se necessário novos estudos que avaliem a expressão dessas moléculas na forma de receptores de membrana celular e correlacione-as com as formas solúveis.

5.1 Impacto institucional

O estudo teve uma abordagem de pesquisa translacional, na qual a pergunta oriunda da prática clínica pode ser respondida através da pesquisa básica, com saberes nas áreas de hematologia clínica, imunologia e laboratório de pesquisa. A UNCISAL não possui ainda pós-graduação *stricto sensu* na modalidade acadêmica ou Laboratório de Pesquisa Translacional e um melhor conhecimento da doutoranda na área, pode tornar possível à formação de um grupo de pesquisa translacional envolvendo a AF, doença de grande prevalência no estado de Alagoas.

VI. RECOMENDAÇÕES PARA A PESQUISA

Estudos futuros, multicêntricos, com uma maior número de pacientes podem proporcionar um conhecimento melhor sobre a importância desses mediadores de ativação plaquetária na AF como potenciais biomarcadores inflamatórios de doença cérebro vascular, com importância na prática clínica.

VII. REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde: Doença falciforme. Manual de condutas básicas para tratamento. Brasília - DF; 2013.
2. World health organization. Sickle cell anemia. Report by the secretariat, Executive Board 117 th session. 2005.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de eventos agudos em doença falciforme. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2009. (Série A. Normas e manuais técnicos).
4. Santos SJ, Mesquita DA, Rocha JR. A atuação do psicólogo da saúde no tratamento a pessoa com doença falciforme em Alagoas. *Cadernos de Graduação- Ciências biológicas e da saúde*. 2013; 1 (3): 35-36.
5. Di Nuzzo, Dayana VP, Fonseca SF. Sickle cell disease and infection. *J Pediatric*. 2004; 80 (5): 347-54.
6. Silva RA, Mendes SO, Medeiros MO, Alves SM. Avaliação genético-populacional da doença falciforme a partir de doadores de sangue em Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil. *Biodiversidade*. 2016; 15(3): 111-120.
7. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29(3): 204-6.
8. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme. Relatório de Recomendação. Ministério da Saúde, 2016. Brasília-DF.
9. Brittenham GM, Schechter NA, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*. 1985; 65 (1): 183-89.
10. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117: 850-858.
11. Serjeant GR. One hundred years of sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2010; 151(5):425-9.
12. Serjant GR. Sickle cell disease. 2 ed. Oxford University Press; 1992. p. 631.
13. Kaul DK, Nagel RL. Sickle cell vaso-occlusion: many issues and some answers. *Experientia*. 1993; 49:5-15
14. Zago MA. Anemia falciforme e doença falciforme. In: Ministério da Saúde. Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas na população Afro-descendente. Brasília- DF: Secretaria de políticas de saúde; 2001.
15. Sparkenbaugh E, Pawlinski R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*. 2013; 162 (1): 3-14.
16. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001; 79 (8): 704-12.
17. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Ver. Bras. Hematol. Hemoter*. 2007; 29 (3): 207-214.
18. Felix AA, Souza HM, Ribeiro SBF. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 2010; 32(3): 203-208
19. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle- cell disease. *Lancet*. 2010; 376 (9757): 2018-31.
20. Lobo C, Marra VN, Silva RMG. Crises dolorosas na doença falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2007; 29(3): 247-25.

21. Heeney MM, Hoppe CC, Abboud MR., Inusa B, Kanter J, Heeney MM, Oguto B *et al.* A Multinational Trial of Prasugrel for Sickle Cell Vaso-Occlusive Events. *N Engl J Med.* 2016; 374(4): 625-635.
22. Kutlar A, Ataga KI. A potente oral P- selectin blocking agente improves microcirculatory blood flow and a marker of endotelial cell injury in patients with sickle cell disease. *Am J Hematology.* 2012; 53: 536-539
23. Ângulo IL. Acidente vascular cerebral e outras complicações do Sistema nervoso central nas doenças falciformes. *Ver. Bras. Hematol. Hemoter.* 2007; 29 (3): 262-267.
24. Brasil, Ministério da Saúde. Manual de Eventos Agudos em Doença Falciforme-UNIFAL- Unidade de Apoio as pessoas com Doença Falciforme. 2010, Camaçari-Bahia.
25. Lobo C, Caçado RD, Leite ACCB, Pinto ACS, Matta APC, Guimarães AF *et al.* Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes Brasileiras para o uso do Doppler Transcraniano (DTC), em crianças e adolescentes portadores de Doença Falciforme (DF), 2010.
26. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in Sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994; 330 (23): 1639- 44.
27. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet.* 2005; 37 (4): 435-440.
28. DeBaun MR, Armstrong FD, McKinstry RC, Ware RE, Vichinsky E, Kirkham FJ. Silent cerebral infarcts: a review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia. *Blood.* 2012; 119(20): 4587-4596.
29. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C *et al.* Prevention of first stroke by transfusion in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med.* 1998; 339 (1): 5-11.
30. Silva CM. Doppler transcraniano na doença falciforme: implantação na rede e custo benefício. Fundação Hemominas. 2009.
31. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C *et al.* t al. Optimizing primary stroke prevention in sickle cell anemia (STOP 2) trial investigators. Discontinuing prophylactic transfusion used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2005; 353(26): 2769-78
32. Hebbel RP, Vercellotti G, Nath KA. A system biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxis. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets.* 2009; 9(4): 271-92.
33. Meier ER, Rampersad A. Pediatric sickle cell disease- Past successes and future challenges. *Pediatric Research* 2017. 81: 249-258.
34. Davila J, Manwani D, Vasovic L, Avanzi M, Verlinder J, Ireland K *et al.* A novel inflammatory role for platelets in sickle cell disease. *Platelets.* 2015; 26(8):726-9.
35. Azar S, Wong TE. Sickle cell disease. A brief update. *Med Clin North Am.* 2016; 101 (2): 375-93.
36. Setty BN, Key NS, Rao AK, Gayen-Betal S, Krishnan S, Dampier CD *et al.* Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of haemolysis. *Br J Haematol.* 2012; 157:370-80.
37. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D *et al.* Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica.* 2008; 93(1): 20-26.

38. Damanhoury GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawe SI, Mushtag G. Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi J Biol Sci.* 2015; 22(1): 24-31.
39. Belcher JD, Bryant CJ, Nqwen J, Bowlin PR, Kiebiak MC, Bischof JC et al. Transgenic Sickle mice have vascular inflammation. *Blood.* 2003; 101(10): 3953-59.
40. Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Vilback AE, Sonbol KM, Kalambur VS et al, Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288(6): H2715-25.
41. Hoppe CC. Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease. *Hematol. Oncol. Clin.* 2014; 28:265-286.
42. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways, at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood J,* 2016; 127(7):801-9.
43. Qari MH, Dier V, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 2012; 18(2): 195-200.
44. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter NA et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002; 8(12): 1383-89.
45. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstruction sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews.* 2007; 21(1): 37-47.
46. Bakshi N, Morris CR. The role of the arginine metabolome in pain: implications for sickle cell disease. *J Pain Res* 2016; 9: 167-175.
47. Mack AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(8): 1237- 43.
48. Scavella A, Sullivan KJ, Kisson N, Sandler E, Gauger C, Froyen M et al. Effect of L-arginine supplementation on immune responsiveness in patients with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 55(7):318-323.
49. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J hematology.* 2009; 84(9): 618-625.
50. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 2009; 33(1): 1-16.
51. Sparkenbaugh E, Pawlinski R. Prothrombotic aspects of sickle cell disease. *J Thromb Haemost.* 2017;15: 1307-16.
52. Chantrathammachart P, Mackman N, Sparkenbaugh E. Factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood* 2012; 120(3): 636-46.
53. Lee SP, Ataga KI, Orringer EP, Phillips DR, Parise LV. Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia. Potential role for platelet-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1626-1631.
54. De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence.* 2014; 5(1): 73-79.
55. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010; 140(6): 805-20.
56. Rubin LG, Schaffner W. Clinical practice. Care of asplenic patient. *N Engl J Med* 2014; 371(4): 349-356.

57. Gary DO, Vicent JL. Prevention of invasive pneumococcal infection in sickle cell disease on the threshold of a new era of successes? *J Pediatr* 2003; 143: 438
58. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004; 11(2): 129-51.
59. Sprong T, Westerdorp RGT. Influence of innate cytokine production capacity on clinical manifestation and severity of pediatric meningococcal disease. *Crit Care Med*. 2009; 2812-8.
60. Aloui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Cognasse HH, Pozzetto B et al. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *Int. J. Mol. Sci*. 2014; 15: 22342-364.
61. Li C, Li J, Li Y, Lang S, Yougbare I, Zhu G, Chen P, Ni H. Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Adv Hematol*. 2012: 384685.
62. Ataga KI, Key NS. Hypercoagulability in sickle cell disease: New approaches to an old problem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007; 91-96.
63. De Franceschi L, Cappellini MD, Olivieri O. Thrombosis and sickle cell disease. *Semin Thromb Hemost*, 2011; 37(3):226-236
64. Stokes KY, Granger DN. Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction. *J Physiol*. 2012; 590 (5): 1023-34
65. Li Z, Yang F, Dunn S, Gross AK, Smyth SS. Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. *Thromb Res*. 2011; 127(3): 184-8.
66. Nagasawa M, Zhu Y, Isoda T, Itoh S, Kajiwara M, Morio T et al. Analysis of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: platelet is a major source of serum sCD40L. *Eur J Haematol*. 2005; 74: 54-60.
67. Cognasse F, Lafarge S, Chavarin P, Acquart S, Garraud O. Lipopolysaccharide induces sCD40L release through human platelets TLR4, but not TLR2 and TLR9. *Intensive Care Med*. 2007:382-4
68. Chew M, Rahman M, Ihrman L, Erson A, Zhang S, Thorlacius H. Soluble CD40L (CD154) is increased in patients with shock. *Inflammation Research*. 2010; 59(11): 979-82.
69. Senhaji N, Kojok K, Darif Y, Fadainia C, Zaid Y. The contribution of CD40/CD40L axis in inflammatory bowel disease: an update. *Front. Immunol* 2015; 6: 529.
70. Kaplan ZS & Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology*. 2011.
71. Sahler J, Spinelli S, Phipps R, Blumberg N. CD40 Ligand (CD154) involvement in platelet transfusion reactions. *Transfus. Clin Biol*. 2012; 19(3): doi:10.1016/j.tracli.2012.02.003
72. Bennett JS. Vaso-occlusion in sickle cell anemia. Are platelets really involved? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26: 1415-1416.
73. Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E. et al. The CD40/CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med*. 2011; 43(5): 331-40.
74. Gururajan P, Gurumurthy P, Nayar P, Babu S, Sarasabharati A, Victor D, Cherian KM. Increased serum concentrations of soluble CD40 Ligand as a prognostic marker in patients with acute coronary syndrome. *Indian J Clin Biochem*. 2009;24:229-233.
75. Chen J, Li JH, Zhao SJ, Wang DY, Liang WJ. Clinical significance of costimulatory molecules CD40/CD40L and CD134/CD134L in coronary heart disease: A case-control study. *Medicine* 2017; 96(32): e 7634.

76. Garrido VT. Avaliação do papel das citocinas inflamatórias, light e CD40L, na inflamação mediada por plaquetas na anemia falciforme [doutorado]. Universidade Estadual de Campinas; 2014.
77. Garrido VT, Ferreira RP, Dominical VM, Traina F, Bezerra MAC, Mello MRB et al. Elevated plasma levels and platelet-associated expression. Of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (light), in sickle cell disease. *British J Haematology*. 2012; 158:788-797.
78. Bian N. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. *Blood Coag Fibrinol* 2003; 14: 255-9.
79. Mohan JS, Lip GYH, Bareford D, Blann AD. Platelet P-selectin and platelet mass, volume and component in sickle cell disease: relationship to genotype. *Tromb Res*. 2006; 117(6): 623-629.
80. Reis JHO. Avaliação de biomarcadores de risco em pacientes com anemia falciforme em crise vaso-oclusiva [mestrado]. Universidade Federal da Bahia. 2013.
81. DeBaun MR, Gordon M, McKinstry RC, M Gordon, Noetzel MJ, White DA et al. Controlled trial transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2014; 371: 699-710.
82. Farias ICC, Mendonça TF, Araújo SC. Frequência do polimorfismo do gene MBL2 em pacientes com anemia falciforme com alterações cerebrovasculares. *Revista Bras Hematol Hemoter*. 2011; 33 (2): 84.
83. Alarcón M, Fuentes E, Olate N, Navarrete S, Carrasco G, Palomo I et al. Strawberry extract presents antiplatelet activity by inhibition of inflammatory mediator of atherosclerosis (sP-selectin, sCD40L, RANTES and IL-1 β) and thrombus formation. *Platelets*. 2015; 26(3): 224-9.
84. Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, Adams RJ, Kutlar A, Hibbert JM et al. Plasma interleukin – 1 beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*. 2010; 49 (1): 39-44.
85. Inwald DP, Kirkham FJ. Platelet and leucocyte activation in childhood sickle cell disease: association with nocturnal hypoxaemia. *British J of Haematol*. 2000; 111: 474-481.
86. Suvankar M, Welb S, Norcross E, Mannan V, Ahmed N, Lirette S et al. Stroke with intracranial stenosis is associated with increased platelet activation in sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60(7): 1192-1197.
87. Leal AS, Martins PRJ, Balarin MAS, Pereira GA, Resende GAD. Haplótipos β -globin its clinical-haematological correlation in patients with sickle cell anemia in Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil. *J Bras Patol Med Lab*. 2016; 52(1): 5-10.
88. Watanabe A, Pianovski MAD, Lenzi L, Cat R. The frequency of β s-globin haplotypes in the state of Paraná, Brazil, and clinical manifestation of sickle cell anemia. *J Patol Clin Med Lab*. 2017; 53(1): 24-30.
89. Rodrigues DOW, Ribeiro LC, Sudário LC, Teixeira MTB, Martins ML, Pittella AMO et al. Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. *Journal Ped*. 2016; (6): 602-608.
90. BDTM Cytometric Bead Array (CBA) – Human Soluble CD64P (P-Selectin) Flex Set Kit, Instruction Manual (2014). http://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_Human_Inf_Cytokine_manual.pdf (acesso 12.01.2018).
91. eBioscience Human sCD40L Platinum ELISA Extra Sensitive Kit, Instruction Manual (20). <https://www.ebioscience.com/pdf> (acesso 12.01.2018).
92. eBioscience Human sCD40 Platinum ELISA kit, Instruction Manual (2014). <http://www.ebiosciences.com/pdf> (acesso 12.01.2018).

93. Mukaka MM. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012; 24(3): 69-71.

VIII. APÊNDICES

APÊNDICE I – FORMULÁRIO

ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE sCD40L, sCD40 e sCD62P EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME E ALTERAÇÃO DO EXAME DE DOPPLER TRANSCRANIANO			
FORMULÁRIO Nº: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
DADOS PESSOAIS DO PACIENTE			
Nome:		Registro: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
D. de Nasc. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Idade: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> meses	Genero: Mas.=1; Fem.=2 <input type="checkbox"/>	
Endereço:			
Número:	Bairro:	Estado:	UF:
Referência:			
Naturalidade:		Procedência:	
Responsável legal:			
Telefone 1:		Telefone 2:	
DADOS CLÍNICOS			
Responder: 1 para SIM e 2 para NÃO			
1º A criança foi internada nos últimos 12 meses? R: <input type="checkbox"/>			
2º A criança foi internada no último mês? R: <input type="checkbox"/>			
3º Se foi internada, por qual(is) doença(s) e quantas vezes nos últimos 12 meses?			
Crise álgica: <input type="checkbox"/> _____ vezes	STA <input type="checkbox"/> _____ vezes	Infecção: <input type="checkbox"/> _____ vezes	
Outros: <input type="checkbox"/> _____			
Já teve AVC: <input type="checkbox"/>	Idade: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	AVCI: <input type="checkbox"/>	AVCH: <input type="checkbox"/> TIA: <input type="checkbox"/>
Data AVC: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Data DTC: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Local:		Equipamento:	
Fluxo Cerebral:	Normal 1 : <input type="checkbox"/>	Condicional baixo 2: <input type="checkbox"/>	
	Condicional Alto 3: <input type="checkbox"/>	Alterado 4: <input type="checkbox"/>	
VFH: _____ cm/s			
Uso Hidroxiureia: <input type="checkbox"/>		Regime de hipertransusão: <input type="checkbox"/>	
Última Transusão: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Ferritina sérica: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Exames pré-transfusionais:	Hb: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> g/dl	Ht: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> %	

	Ret: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> %	DHL: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mg/dl
Eletroforese de Hemoglobina:	HbA: <input type="text"/> <input type="text"/> %	HgF: <input type="text"/> <input type="text"/> % HbS: <input type="text"/> <input type="text"/> %
Tipagem sanguínea:		
A amostra laboratorial de sangue foi coletada? <input type="checkbox"/>		
Características relacionadas aos mediadores inflamatórios de plaquetas (pg/ml)		
Marcador	Resultado	Técnica utilizada
sCD40		ELISA
sCD40L		ELISA
sCD62P		CITOMETRIA DE FLUXO

Responsável pelo Preenchimento

Data: ___/___/___

Hora: ___:___

APÊNDICE II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES)
INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA (IMIP)
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidar seu (sua) filho(a) para participar de nossa pesquisa. Para isso, precisamos dos seguintes dados:

NOME DO PACIENTE:.....
 Nº IDENTIDADE: ORGÃO EXPEDITOR.....
 SEXO : Masculino Feminino DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO.....Nº.....
 QUADRA: LOTE: APTO:BAIRRO:.....
 CIDADE.....CEP:.....TELEFONE: DDD (....)

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise dos níveis séricos de sCD40L, sCD40 e sCD62P em crianças e adolescentes com anemia falciforme e alteração do exame de Doppler Transcraniano

2.PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: CARGO/FUNÇÃO:

Dra. Leuridan Cavalcante Torres – Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Dra. Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo- Doutoranda DINTER IMIP/UNCISAL

Dr. Paulo José de Medeiros de Souza Costa- Co-orientador UNCISAL

Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte- Co-orientadora IMIP

3. UNIDADE: Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

4.AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X
RISCO MÉDIO	RISCO BAIXO	
RISCO MAIOR		

5. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

6. Gostaríamos de convidar seu filho(a) a participar de nossa pesquisa.

7. Justificativa: Os pacientes com AVC apresentam um pior prognóstico, elevada taxa de recidiva e de mortalidade, e por isso baixa qualidade de vida e produtividade laboral quando comparados aos pacientes sem AVC. Portanto, um amplo conhecimento sobre os principais mediadores inflamatórios de plaquetas envolvidos no aumento ou na diminuição do processo inflamatório crônico e sistêmico nos pacientes AF com elevado risco ou na faixa de risco para o AVC, pode propiciar a descoberta de terapias específicas, que podem melhorar a vida desses pacientes e apresentar menos efeitos colaterais, quando comparados as transfusões sanguíneas.

8. O objetivo deste trabalho é analisar a expressão dos níveis séricos de sCD62P e da via CD40/CD40L em crianças e adolescentes brasileiras com AF e doença cérebro vascular.

9. Os testes laboratoriais serão realizados em amostras de sangue periférico antes da transfusão de sangue.

10. Existe um risco baixo para o participante de pesquisa. O mesmo risco que pode ocorrer com uma coleta de sangue na veia. Ou seja, a coleta de sangue poderá provocar uma pequena mancha vermelha ou roxa no local da picada da agulha que desaparece com alguns dias..

11. O sangue colhido será usado para os exames no Laboratório de Pesquisa do IMIP (Laboratório de Pesquisa Translacional).

12. Não existe benefício direto **para a pessoa convidada**. A pesquisa vai ajudar a esclarecer o melhor a presença de substância que atuam no risco da vaso-oclusão, isso trará benefícios no acompanhamento clínico desses pacientes.

13. Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do estudo. Os principais investigadores são Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Doutoranda Cinthya Pereira Leite C. Araújo que são encontradas no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), na Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista (Telefone: (81) 99659-6766 e (82)99991-1178).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) que tem como objetivo defender os interesses dos participantes, respeitando

seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas. O CEP-IMIP está situado na Rua dos Coelhoos, 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar = **tel: 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br.** O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 hs (manhã) e 13:30 às 16:00 hs (tarde).

14. Os convidados poderão desistir de fazer parte da pesquisa a qualquer momento.

15. Não serão divulgados os nomes dos **convidados**.

16. Os **convidados** poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.

17. Os **convidados** não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os participantes.

18. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue durante a execução da pesquisa, o convidado tem o direito atendimento médico no HEMOAL.

19. Os pesquisadores deste trabalho se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que meu filho (a) ou **convidado está isento de despesas e que tem a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.** Concordo voluntariamente que meu/minha filho(a) participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste serviço.

Assinatura do participante ou responsável legal.

Assinatura da testemunha.

Maceió, ___/___/20___
Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do paciente ou representante legal para participação neste Estudo.

Maceió, _____ de _____ 20____

Dra. Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo
Dra Leuridan Cavalcante Torres
Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte

APÊNDICE III

Termo de Assentimento

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA (IMIP)

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)

Gostaríamos de convidar seu (sua) filho (a) para participar de nossa pesquisa. Para isso, precisamos dos seguintes dados:

NOME DO PACIENTE:.....
 Nº IDENTIDADE: ORGÃO EXPEDITOR.....
 SEXO : Masculino () Feminino () DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO.....Nº.....
 QUADRA: LOTE: APTO:BAIRRO:.....
 CIDADE.....CEP:.....TELEFONE: DDD (....)

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise dos níveis séricos de sCD40L, sCD40 e sCD62P em crianças e adolescentes com anemia falciforme e alteração do exame de Doppler Transcraniano

2.PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: CARGO/FUNÇÃO:

Dra. Leuridan Cavalcante Torres – Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Dra. Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo- Doutoranda DINTER IMIP/UNCISAL

Dr. Paulo José de Medeiros de Souza Costa- Co-orientador UNCISAL

Dra. Maria do Carmo Menezes Bezerra Duarte- Co-orientadora IMIP

3. UNIDADE: Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Convidamos você, após autorização dos seus pais [ou dos responsáveis legais] para participar como voluntário (a) desta pesquisa. Esta pesquisa é da responsabilidade do pesquisador Dra. Cinthya Pereira Leite, médica hematologista e Dra. Leuridan

Cavalcante Torres Telefone: 81 99659-6766, e-mail: leuridan.torres@gmail.com. Este documento chama-se Termo de Assentimento e pode conter algumas palavras que você não entenda. Se tiver alguma dúvida, pode perguntar à pessoa a quem está lhe entrevistando, para compreender tudo o que vai acontecer. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. Após ler as informações a seguir, caso aceite participar do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema se desistir, é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento.

Você está sendo convidado, pois apresenta Anemia Falciforme. Será realizada coleta de sangue na veia.

Você poderá se beneficiar por participar deste estudo, porque realizaremos exames que auxiliará o acompanhamento clínico. Você também estará ajudando os pesquisadores a compreender melhor esta doença, o que poderá resultar, no futuro, no aperfeiçoamento e/ou desenvolvimento de novas condutas terapêuticas e diagnóstica para as pessoas com esta doença.

- **Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos fornecer. Os resultados da pesquisa serão publicados apenas em eventos ou publicações científicas, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Todos os dados coletados nesta pesquisa ficarão guardados no prontuário médico. Nem você e nem seus pais [ou responsáveis legais] pagarão nada para você participar desta pesquisa. Se você morar longe, nós daremos a seus pais dinheiro suficiente para transporte e alimentação, para também acompanhar a pesquisa. Este documento passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP que está no endereço: O CEP-IMIP está situado à rua dos Coelhos, 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1 Andar tel: 2122-4756 – email: comitedeetica@imip.org.br O CEP-IMIP funciona de 2 a 6 feira, nos seguintes horários: 07:30 às 11:30 h (manhã) e 13:30 às 16h (tarde).**

ASSENTIMENTO DO MENOR DE IDADE EM PARTICIPAR COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), abaixo assinado, concordo em participar do estudo “ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE SCD40L, SCD40 E SCD62P EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME E ALTERAÇÃO DO DOPPLER TRANSCRANIANO”, como voluntário (a). Fui informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, o que vai ser feito, assim como os possíveis riscos e benefícios que podem acontecer com a minha participação. Foi-me garantido que posso desistir de participar a qualquer momento, sem que eu ou meus pais precise pagar nada.

Médico _____

Eu confirmo haver pessoalmente explicado, para o paciente acima identificado, a natureza e o propósito do procedimento.

Assinatura _____ Data _____

Nome da Testemunha _____

ANEXOS

ANEXO 1


Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 4434 – 14 intitulado “**Estudo do papel das plaquetas na fisiopatologia da anemia falciforme na faixa de risco para acidente vascular cerebral**” apresentado pelo (a) pesquisador (a) **Leuridan Cavalcante Torres** foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião ordinária de 22 de outubro de 2014.

Recife, 24 de outubro de 2014


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira

ANEXO 2



ESTADO DE ALAGOAS
SECRETARIA DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE ATENÇÃO A SAÚDE
GERÊNCIA DA HEMORREDE DE ALAGOAS
Rua Dr. Jorge de Lima nº 58 Trapiche - Maceió - AL - CEP: 57.010-382
Fone: (82) 3315-2102 - CNPJ: 12.200.259/0001-65

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro para os devidos fins que concordo com a realização do projeto de pesquisa intitulado "*Estudo do Papel das Plaquetas na Fisiopatologia da Anemia Falciforme na Faixa de Risco para Acidente Vascular Cerebral*", da pesquisadora Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo, aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde Infantil do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP, sob a orientação da Dra. Leuridan Cavalcante Torres, que já foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP, em reunião ordinária de 22/10/2014.

Maceió, 02 de fevereiro de 2015


Verônica de Lima Guedes
Gerente da Hemorrede de Alagoas



ANEXO 3



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. ALBERTO ANTUNES

EBSERH
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

MINISTÉRIO DA
EDUCAÇÃO



AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL PARA EXECUÇÃO DE PESQUISA NO HUPAA/UFAL

Autorizamos os pesquisadores Dra. Cinthya Pereira Leite Costa de Araújo, Dr. Aderson da Silva Araújo, Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra a ter acesso ao Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas HUPAA/UFAL), objetivando a realização do trabalho de pesquisa, com título "ESTUDO DO PAPEL DAS PLAQUETAS NA FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME NA FAIXA DE RISCO PARA ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL". Projeto devidamente cadastrado na Gerência de ensino e Pesquisa, protocolado sob nº 594, para fins de TESE DE DOUTORADO, autorizado pelo Comitê de Ética em 22/10/2014, devendo o mesmo seguir os preceitos de pesquisa, conforme o que estabelece a Resolução CNS 510/16, a Constituição Federal Brasileira (1988) art. 5º, Incisos X e XIV; o Código Civil Brasileiro arts.20 – 21, o Código Penal Brasileiro arts. 153-154, o Código de Processo Civil arts. 347, 363 e 406, o Código de Defesa do Consumidor arts. 43-44, a Resolução da ANS (Lei nº 9961 de 28/01/2000), a Resolução Normativa nº 21, o Código de Ética Médica – CFM arts. 11, 70, 102, 103, 105, 106 e 108, a Resolução do CFM nº 1605/2000, 1638/ 2002 e 1642/2002 e o Parecer CFM nº 08/2005. Só sendo permitido a divulgação dos resultados, preservando a identidade do paciente, em reuniões e publicações científicas e/ou junto ao grupo de estudo, relacionado a pesquisa.

Maceió, 02 de fevereiro de 2015.

Pesquisador(a)

Orientador(a)

José Humberto Belmino Chaves
M.D. M.S. Ph.D. Pesquisador
CRMV - 13854
RDE - 2280

JOSÉ HUMBERTO BELMINO CHAVES

Chefe de Setor de Gestão da Pesquisa e Inovação Tecnológica

HUPAA/UFAL/EBSERH

ANEXO 4

TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**

p.1

p.1

p.2

p.2

p.3

ISSN: 1079-9796

DESCRIPTION

Blood Cells, Molecules & Diseases emphasizes not only **blood cells**, but also covers the molecular basis of **hematologic disease** and studies of the diseases themselves. This is an invaluable resource to all those interested in the study of **hematology, cell biology, immunology, and human genetics**.

Research Areas include:

- Hematolymphopoiesis
- Genetics of Blood Cells and Proteins
- Molecular Biology of Blood Cells and Proteins
- Pathophysiology of Blood Cells and Proteins
- Hematological Malignancies
- Disorders of Blood Cells and Coagulation Proteins

Note to Authors - please use the "Submit your paper" button on the left when submitting

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts

on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#) .

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further

information or help, please visit our [Support Center](#)

IMPACT FACTOR

2016: 1.882 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
 MEDLINE®
 EMBASE
 Reference Update
 ADONIS
 Current Contents/Life Sciences
 SIIC Data Bases

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

M. Narla, New York, New York, USA

Editorial Board

M. Abboud, American University of Beirut (AUB), Beirut, Lebanon
X. An, New York Blood Center, New York, New York, USA
E.J. Benz, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA
L. Blanc, Hofstra Northwell School of Medicine, Manhasset, New York, USA
H.E. Broxmeyer, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA
T. Cheng, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin, China
Y. Colin, Inserm/University Paris Diderot, Paris Cedex 15, France
B.S. Collier, Rockefeller University, New York, New York, USA
L. Da Costa, Hôpital Robert Debré, Paris, France
L. De Franceschi, University of Verona, Verona, Italy
A. El-Beshlawy, Cairo University, Cairo, Egypt
F. Ferreira Costa, University of Campinas, Campinas, Brazil
P.G. Gallagher, Yale-New Haven Children's Hospital, New Haven, Connecticut, USA
T. Ganz, UCLA, Los Angeles, California, USA
R.I. Handin, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA
T. Kalfa, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA
J. Little, University Hospitals Cleveland Medical Center, Cleveland, Ohio, USA
D.G. Nathan, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA
J.T. Prchal, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA
V. Sankaran, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA
S. Schrier, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA
V. Sheehan, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA
S. Sheth, Weill Cornell Medicine, New York, New York, USA
S.L. Thein, National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI), Bethesda, Maryland, USA
K. Yazdanbakhsh, New York Blood Center, New York, New York, USA
A. Zimran, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Blood Cells, Molecules, and Diseases (BCMD) publishes papers in the broad area of hematology, including both basic and clinical studies and encompassing areas such as hemostasis, thrombosis, immunology, metabolism, genetics, molecular biology, therapy, and morphology. Letters to the Editor are also welcome.

Types of paper

Full length article

These are full-length descriptions of original research. The scope may include basic science, clinical results, or applications. These manuscripts will undergo standard review and normally are not expedited.

Reviews

The Review should be a comprehensive appraisal of research in a field of current interest. Authors wishing to contribute a review paper should contact one of contributing editors prior to submission.

All reviews are subject to the normal review process.

Correspondence

Letters must be limited to fewer than 1000 words, not inclusive of figures and tables. References must not number more than 8. There should be no separate title page, no abstract, no headings throughout the text, and no materials and methods section. They should be written in the style of a letter with the title at the top of the page and 'To the Editor' beneath. All authors' names and affiliations should be at the end of the manuscript (including Corresponding author's full address, email, telephone, and fax numbers). Acceptance is determined by the Contributing Editor.

Commentaries

Contributing Editors are encouraged to write or solicit a commentary on an article accepted for publication. Commentaries must be limited to fewer than 1000 words, not inclusive of figures and tables. References must not number more than 8.

Size limits are flexible within the approximate range of 1000 to 10,000 words. With figures, tables, and references appropriate to the subject matter, articles will, in general, not be longer than 20 journal pages. Letters to the Editor and Commentaries are limited to fewer than 1000 words.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the internet).

A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
 - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations

that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include

employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/

registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A

summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file

(if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest:

none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed

disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official

records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information

matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in

the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent](#)

[publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that

its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where

the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in

English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder.

To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref](#)

[Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#).

Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple,](#)

[redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have

materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

[More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission

from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes.

Learn more about

Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of

these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop. Submission to this journal proceeds **totally online** and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. **Please submit your manuscript here:**

[https://www.evise.com/profile/api/navigate/Blood Cells, Molecules and Diseases_YBCMD](https://www.evise.com/profile/api/navigate/Blood_Cells,_Molecules_and_Diseases_YBCMD)

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Apr 2018 www.elsevier.com/locate/bcmd 7

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics

will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Apr 2018 www.elsevier.com/locate/bcmd 8

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide **a minimum of 4 and a maximum of 6** keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). **Letters to the Editor do not require keywords.** Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult:

IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/>

IUPAC: Nomenclature of Inorganic Chemistry: <http://www.iupac.org/>

IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents:

<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small

fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics.

Powers of e are often

more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed

separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word

processors can build footnotes into the text, and this feature may be used.

Otherwise, please indicate

the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the

article. Do not include footnotes in the Reference list.

Electronic artwork

General points

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Apr 2018 www.elsevier.com/locate/bcmd 9

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then

please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is

finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution

requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of

500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or

MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit

usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear

in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please

indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A

caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep

text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the

relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Apr 2018 www.elsevier.com/locate/bcmd 10

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a

different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/blood-cells-molecules-and-diseases>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Apr 2018 www.elsevier.com/locate/bcmd 11
Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For

more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines. AUTHOR INFORMATION PACK 29 Apr 2018 www.elsevier.com/locate/bcmd 12

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of

these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley*

Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data](#)

in [Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.

This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Apr 2018 www.elsevier.com/locate/bcmd 13

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this

proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and

figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this

stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back

to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent

corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free

access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for

sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra

charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is

accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via

Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do

not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on

ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from

Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

ANEXO 5

From: **Blood Cells, Molecules and Diseases** <EviseSupport@elsevier.com>

Date: 2018-05-06 21:53 GMT-03:00

Subject: Successfully received: submission Analyses of the soluble levels of sCD40L, sCD62P and sCD40 in pediatric sickle cell anemia patients with abnormal transcranial Doppler for Blood Cells, Molecules and Diseases

To: leuridan.torres@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: BCMD_2018_151

Title: Analyses of the soluble levels of sCD40L, sCD62P and sCD40 in pediatric sickle cell anemia patients with abnormal transcranial Doppler

Journal: Blood Cells, Molecules and Diseases

Dear Professor Torres,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Blood Cells, Molecules and Diseases. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=BCMD and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Blood Cells, Molecules and Diseases

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier [B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands](#), Reg. No. 33156677.