

Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

**DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA DAS  
POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM SANGUE PERIFÉRICO  
DE INDIVÍDUOS ADULTOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rudolf-Oliveira, Renata Cristina Messores

Determinação dos valores de referência das populações linfocitárias em sangue periférico de indivíduos adultos [dissertação] / Renata Cristina Messores Rudolf-Oliveira ; orientadora, Maria Cláudia Santos-Silva - Florianópolis, SC, 2013.

175 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Intervalo de referência. 3. Linfócitos. 4. Citometria de Fluxo. I. Santos-Silva, Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

**DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA DAS  
POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM SANGUE PERIFÉRICO  
DE INDIVÍDUOS ADULTOS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pela orientadora e pelos membros da Banca Examinadora.

Florianópolis, 08 de março de 2013.

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto  
Universidade Federal de Santa Catarina (Membro Titular)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Luiz Barbosa Báfica  
Universidade Federal de Santa Catarina (Membro Titular)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco  
Universidade Federal de Santa Catarina (Membro Titular)



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por iluminar meu caminho;

A minha mãe, por seu contínuo apoio durante esses anos, pois muitas conquistas foram graças a sua ajuda;

Ao meu amor Rafael, enxugar minhas lágrimas, compartilhar sorrisos e compreender os momentos de ausência;

Ao meu pai e ao meu irmão, pelo apoio mesmo estando longe;

A Nina, Kyra e Brida, pelo amor incondicional;

As minhas avós Martha e Carmen, e minha sogra pelo carinho e apoio;

A minha orientadora Maria Cláudia, pelas oportunidades e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional;

A professora Maria Luiza, pelas oportunidades e apoio;

A Rosemeri, a Isabela e ao Borgatto, pela ajuda estatística; e a Maria Cristina pela revisão gramatical.

Aos meus fiéis escudeiros, Kauê, Mariana Martignago, Vanessa, Pâmela, Ana Carolina, Chandra e Arthur, pela ajuda técnica, científica e pela amizade.

Aos demais amigos do LOEH e LBMM, em especial Daiane, Lorena, Haíra, Letícia, Lisléia e Toni; alguns pela ajuda científica e outros pelas conversas e ombro amigo;

Aos colaboradores do banco de sangue em especial Jovino, Neuza, Kiko, Junara, Daiana e Everaldo; e a todos os doadores que aceitam participar da pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e demais órgãos (CNPQ, CAPES, Projeto REUNI, PROGRAMA DST/AIDS e Hepatites Virais e FAPEU).



## RESUMO

Os resultados dos testes laboratoriais devem ser comparados o intervalo de referência com o objetivo de se obter um diagnóstico e/ou uma decisão terapêutica. Por isso, os laboratórios de análises clínicas necessitam de intervalos de referência confiáveis e aplicáveis a sua população para todos os parâmetros analisados. De maneira geral, os intervalos de referência aplicados nas rotinas laboratoriais são obtidos da literatura ou de informações contidas nas bulas dos fabricantes dos reagentes; não sendo obtidos com resultados referentes à população ao qual será aplicado. Dessa forma, preconiza-se que cada laboratório estabeleça o intervalo de referência referente a sua população, baseado na metodologia utilizada na rotina. Para isso, foi analisado 238 amostras de sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis, não fumantes, doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a identificação e quantificação das células linfoides foi utilizado o seguinte painel de anticorpos monoclonais anti-: CD4/CD8/CD3/CD45, CD20/CD19/CD45, CD16/CD56/CD3/CD45 e TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$ /CD3/CD45. Os intervalos de referência para encontrados foram CD3+ de 51,3 a 83,5% e de 718 a 2494 células/mm<sup>3</sup>; CD4+ de 24,4 a 54,2% e de 456 a 1492 células/mm<sup>3</sup>; CD8+ de 12,8 a 40,2% e de 272 a 1144 células/mm<sup>3</sup>; relação T CD4+/T CD8+ de 0,68 a 3,61; CD4+ CD8+ de 0,01 a 3,6% e de 2 a 88 células/mm<sup>3</sup>; TCR  $\alpha\beta$ + de 44,3 a 77% e de 855 a 2384 células/mm<sup>3</sup>; TCR  $\gamma\delta$  de 0,99 a 15,9% e de 19 a 345 células/mm<sup>3</sup>; CD3+ CD4-CD8- de 1,2 a 13,3% e de 28 a 292 células/mm<sup>3</sup>; CD19+CD20+ de 6,3 a 20,8% e de 110 a 618 células/mm<sup>3</sup>; CD19+CD20- de 0,001 a 1,3% e de 0 a 23 células/mm<sup>3</sup>; NK maduras de 3,1 a 27,4% e de 70 a 745 células/mm<sup>3</sup>; NK imaturas de 0,08 a 1,1% e de 1 a 23 células/mm<sup>3</sup>; NK totais de 3,7 a 28,5% e de 82 a 760 células/mm<sup>3</sup> e NKT de 0,9 a 21,4% e de 18 a 488 células/mm<sup>3</sup>. Com relação aos gêneros, as células T CD3+, T CD4+, CD4+CD8+, TCR  $\alpha\beta$ +, TCR  $\gamma\delta$ +, CD19+CD20-, NK maduras e imaturas e NKT apresentaram diferenças significativas na contagem de linfócitos tanto para o valor relativo quanto para o absoluto entre homens e mulheres. Por outro lado, as células T CD8+ e CD19+ apresentaram diferenças apenas relacionadas ao valor absoluto e na relação T CD4+/T CD8+ não foram observadas diferenças estatísticas. A comparação entre o intervalo de referência obtido em indivíduos naturais do Estado de Santa Catarina com os de indivíduos de outros Estados do país e de outros países do mundo confirmou a necessidade de se estabelecer intervalos de referência próprios para essa população.

**Palavras chave:** linfócitos, intervalo de referência, citometria de fluxo.



## Determination of lymphocyte subsets reference ranges in peripheral blood of healthy subjects

### ABSTRACT

The results of laboratory tests should be compared with the reference range in order to obtain a diagnosis and/or treatment decision. Thus, clinical laboratories need reliable and applicable reference intervals for its population for all parameters analyzed. In general, the reference ranges used in clinical laboratories are obtained from literature or information provided by the reagents manufacturers'. Thus, the reference range are not obtained with results concerning the population which will be applied, since few laboratories establish their own reference ranges. Thus, it is recommended that each laboratory establish reference range referent its population, based on the methodology used in the routine. With this purpose, we have analyzed 238 peripheral blood samples from healthy adult subjects, nonsmokers, who donated blood in the Hemotherapy Service of Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina. The panel of monoclonal antibodies employed was composed by anti-: CD4/CD8/CD3/CD45, CD20/CD19/CD45, CD16/CD56/CD3/CD45 e TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$ /CD3/CD45. The reference ranges obtained were: CD3+ 51,3 to 83,5% and 718 to 2494 cells/mm<sup>3</sup>; CD4+ 24,4 to 54,2% and 456 to 1492 cells/mm<sup>3</sup>; CD8+ 12,8 to 40,2% and 272 to 1144 cells/mm<sup>3</sup>; T CD4+/T CD8+ ratio 0,68 to 3,61; CD4+ CD8+ 0,01 to 3,6% and 2 to 88 cells/mm<sup>3</sup>; TCR  $\alpha\beta$ + 44,3 to 77% and 855 to 2384 cells/mm<sup>3</sup>; TCR  $\gamma\delta$  0,99 to 15,9% and 19 to 345 cells/mm<sup>3</sup>; CD3+CD4-CD8- 1,2 to 13,3% and 28 to 292 cells/mm<sup>3</sup>; CD19+CD20+ 6,3 to 20,8% and 110 a 618 cells/mm<sup>3</sup>; CD19+CD20- 0,001 to 1,3% and 0 to 23 cells/mm<sup>3</sup>; mature NK cells 3,1 to 27,4% and 70 to 745 cells/mm<sup>3</sup>; immature NK cells 0,08 to 1,1% and 1 to 23 cells/mm<sup>3</sup>; total NK cells 3,7 to 28,5% and 82 to 760 cells/mm<sup>3</sup> and NKT cells 0,9 to 21,4% and 18 to 488 cells/mm<sup>3</sup>. In relation to genders, the CD3+, CD4+, CD4+ CD8+, TCR  $\alpha\beta$ +, TCR  $\gamma\delta$ +, CD19+CD20-, mature and immature NK and NKT cells showed significant differences for both relative and absolute values. Moreover, CD8+ and CD19+ cells differ only when related to absolute values and T CD4+/ T CD8+ ratio had no statistical differences. Comparison between reference ranges obtained in subjects born in Santa Catarina State and individuals from other states of the country or other countries of the world affirmed the need to establish reference intervals for this population.

**Keywords:** lymphocytes, reference range, flow cytometry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferenciação antigênica das células NK.....	31
Figura 2 – Antígenos expressos nos diversos estágios maturacionais das células B.....	45
Figura 3 – Maturação das células linfoides T no timo. ....	50
Figura 4 – Dot-plot representativo dos grupos celulares de acordo com a intensidade de expressão das moléculas CD4 e CD8 e de acordo com os dímeros ( $\alpha$ e/ou $\beta$ ) expressos na molécula de CD8.. ....	52
Figura 5 – Dot-plot representativo indicando a região de restos celulares e o threshold . ....	63
Figura 6 – Avaliação da reprodutibilidade de das células T CD3+, T CD4+ e T CD8+ por meio do teste de Bland-Altman. ....	68
Figura 7 – Avaliação da consistência do marcador CD3 pelo método de Bland-Altman. ....	71
Figura 8 – Avaliação da reprodutibilidade dos leucócitos e dos linfócitos pelo método de Bland-Altman. ....	75
Figura 9 – Comparação da contagem relativa dos linfócitos entre o contador hematológico e o citômetro de fluxo. ....	77
Figura 10 – Dot-plot representativo da positividade (em vermelho) para o marcador CD3 para a avaliação dos linfócitos T.....	78
Figura 11 – Linfócitos T CD4+.....	80
Figura 12 – Linfócitos T CD8+.....	82
Figura 13 – Dot-plot representativo da co-expressão dos marcadores CD4+ e CD8+. ....	85

Figura 14 – Células positivas para o receptor TCR $\alpha\beta$ .	87
Figura 15 – Células positivas para o receptor TCR $\gamma\delta$ .	89
Figura 16 – Dot-plot representativo demonstrando a negatividade para os marcadores CD4 e CD8.	91
Figura 17 – Teste de Bland-Altman entre as células TCR $\gamma\delta$ + e as células CD3+ CD4- CD8- duplo-negativas.	92
Figura 18 – Dot-plot de CD19 <i>versus</i> CD20 representativo da expressão do marcador CD19+.	93
Figura 19 – Dot-plot de CD19 <i>versus</i> CD20 representativo da co-expressão dos marcadores CD19+ e CD20+.	95
Figura 20 – Dot-plot de CD19 <i>versus</i> CD20 representativo da positividade para CD19 e ausência de expressão de CD20.	97
Figura 21 – Avaliação das células NK maduras.	99
Figura 22 – Dot-plot representativo das células NK imaturas CD56++ CD16 -.	101
Figura 23 – Dot-plot representativo das células NK imaturas CD56++ CD16 - (azul) e células NK maduras CD56+ CD16+.	103
Figura 24 – Dot-plot representativo das células NK.	104

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Metodologia e fabricantes dos testes sorológicos.....	59
Quadro 2 – Relação de anticorpos monoclonais, clone, volume estabelecido na titulação e fabricante. ....	60
Quadro 3 – Pannel de anticorpos monoclonais utilizados no estudo. ....	60



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos doadores nas macrorregiões de saúde do Estado de Santa Catarina.....	66
Tabela 2 – Coeficiente de correlação intraclasse (r) dos marcadores CD3, CD4 e CD8 entre os citômetros de fluxo FACSCalibur e FACSCanto II.....	67
Tabela 3 – Valores obtidos na comparação entre as células T CD3+ e no somatório das células CD4+, CD8+ e TCR $\gamma\delta$ +. .....	73
Tabela 4 – Valores obtidos na comparação entre as células TCR $\alpha\beta$ + e CD4+ e CD8+. .....	73
Tabela 5 – Coeficiente de correlação intraclasse (r) entre os tipos celulares nos dois contadores hematológicos. ....	75
Tabela 6 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos T CD3+.....	79
Tabela 7 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8-.....	81
Tabela 8 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos T CD3+ CD8+ CD4-.....	83
Tabela 9 – Valores obtidos na avaliação da relação T CD4+/T CD8+ .	84
Tabela 10 – Valores obtidos na avaliação da população CD4+CD8+...	86
Tabela 11 – Valores obtidos na avaliação da contagem das células TCR $\alpha\beta$ +. .....	88
Tabela 12 – Valores obtidos na avaliação da contagem das células TCR $\gamma\delta$ +. .....	90

Tabela 13 – Coeficiente de correlação intraclasse entre as células TCR $\gamma\delta$ + e as células CD3+ CD4- CD8- duplo-negativas.....	91
Tabela 14 – Valores obtidos na avaliação da contagem das células CD3+CD4-CD8-.....	93
Tabela 15 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos B CD19+.	94
Tabela 16 – Valores obtidos na quantificação das células CD19+ CD20+.....	96
Tabela 17 – Valores obtidos na quantificação de das células CD19+CD20-.....	98
Tabela 18 – Valores obtidos na quantificação das células NK maduras. .....	100
Tabela 19 – Valores obtidos na quantificação das células NK imaturas. .....	102
Tabela 20 – Valores obtidos na quantificação das células NK totais..	103
Tabela 21 – Valores obtidos na quantificação das células NKT. ....	105
Tabela 22 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos T CD3+.....	113
Tabela 23 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos T CD4+.....	115
Tabela 24 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos T CD8+.....	117
Tabela 25 – Comparação da relação T CD4+ / T CD8+.....	118
Tabela 26 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos B.....	122

Tabela 27 – Comparação da contagem relativa e absoluta das células NK.....	125
--	-----



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
APC	Fluorocromo alofococianina
BCR	Receptor de células B
BD	Becton & Dickinson
CD	Grupo de diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CS&T	Cytometer Setup and Tracking
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio-padrão
EDTA/K3	Ácido etilenodiamino tetra-acético/tripotássico
Fc	Fração cristalizável
FITC	Isotiocianato de fluoroceína
FOXP3	<i>Forkhead box protein 3</i>
FSC	Dispersão frontal
HBc	Antígenos do core do vírus da hepatite B
HbsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HLDA	<i>Human Leukocyte Differentiation Antigens</i>
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
HU	Hospital Universitário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNKT	NKT invariáveis
KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptors</i>
LFA-1	Antígeno associado à função leucocitária tipo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
$\mu$ L	Microlitro
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
NCAM	Moléculas de adesão das células neuronais
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
PBS	Solução salina

PC5	Ficoeritrina cianina 5.1
PE	Ficoeritrina
PerCP	Complexo da Proteína Clorofila Peridina
RAG1	Gene ativador da recombinação 1
RAG2	Gene ativador da recombinação 2
rpm	Rotações por minuto
RPR	Reagina plasmática rápida
SC	Santa Catarina
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SSC	Dispersão lateral
TCR $\alpha\beta$	Receptor de células T do tipo alfa/beta
TCR $\gamma\delta$	Receptor de células T do tipo gamma/delta
TdT	Desoxinucleotidil terminal transferase
TFH	Células T auxiliares foliculares
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento
Th	<i>T helper</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TRAIL <i>ligand</i>	<i>Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing</i>
Treg	T regulatórias
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VDJ	Regiões variáveis, de diversidade e de junção.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1 GERAL .....	25
2.2 ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
3.1 ESTABELECIMENTO DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA .....	27
3.2 POPULAÇÕES CELULARES AVALIADAS .....	29
<b>3.2.1 Células NK</b> .....	<b>29</b>
3.2.1.1 <i>Diferenciação e maturação</i> .....	29
3.2.1.2 <i>Imunofenótipo</i> .....	32
3.2.1.3 <i>Função</i> .....	32
3.2.1.4 <i>Distribuição</i> .....	33
<b>3.2.2 Células NKT</b> .....	<b>34</b>
3.2.2.1 <i>Diferenciação e maturação</i> .....	34
3.2.2.2 <i>Imunofenótipo</i> .....	34
3.2.2.3 <i>Função</i> .....	36
3.2.2.4 <i>Distribuição</i> .....	37
<b>3.2.3 Células T <math>\gamma\delta</math></b> .....	<b>37</b>
3.2.3.1 <i>Diferenciação e maturação</i> .....	37
3.2.3.2 <i>Imunofenótipo</i> .....	37
3.2.3.3 <i>Função</i> .....	38
3.2.3.4 <i>Distribuição</i> .....	38
<b>3.2.4 Linfócitos B</b> .....	<b>39</b>
3.2.4.1 <i>Diferenciação e maturação</i> .....	39
3.2.4.2 <i>Imunofenótipo</i> .....	42
3.2.4.3 <i>Função</i> .....	46
3.2.4.4 <i>Distribuição</i> .....	47
<b>3.2.5 Linfócitos T</b> .....	<b>47</b>
3.2.5.1 <i>Diferenciação e maturação</i> .....	47
3.2.5.2 <i>Imunofenótipo</i> .....	51
3.2.5.3 <i>Função</i> .....	52
3.2.5.4 <i>Distribuição</i> .....	55
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>57</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	57
4.2 SELEÇÃO DOS DOADORES E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS .....	57
<b>4.2.1 Critérios de inclusão</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2.2 Critérios de exclusão</b> .....	<b>59</b>
4.3 REAGENTES .....	59
4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	61
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	63
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	65
5.2 VALIDAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE.....	66
<b>5.2.1 Citômetro de fluxo .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2.2 Contador hematológico .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.3 Concordância entre o citômetro e o contador hematológico .....</b>	<b>77</b>
5.3 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS T CD3+.....	78
5.4 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS T CD4+.....	79
5.5 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS T CD8+.....	82
5.6 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO T CD4+/T CD8+ .....	84
5.7 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO CD4+CD8+ .....	84
5.8 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS TCR $\text{AB}^+$ .....	86
5.9 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS TCR $\text{G}\Delta^+$ .....	89
5.10 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS CD19+ .....	93
5.11 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS NK.....	98
5.12 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS NKT .....	104
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>127</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>129</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>147</b>
<b>APÊNDICE B – VALORES DE REFERÊNCIA DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS ESTABELECIDOS NO PRESENTE ESTUDO .....</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICE C – TABELA COMPARATIVA DOS MARCADORES CD3+, CD4+ E CD8+ ENTRE OS DIVERSOS ARTIGOS. ....</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE D – TABELA COMPARATIVA DOS MARCADORES CD19+, CD16+CD56+ E RELAÇÃO CD4+/CD8+ ENTRE OS DIVERSOS ARTIGOS.....</b>	<b>161</b>
<b>ANEXO A – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS DOADORES NO SERVIÇO DE HEMOTERAPIA .....</b>	<b>173</b>
<b>ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA .....</b>	<b>175</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A interpretação dos exames laboratoriais de um indivíduo depende da comparação dos resultados observados na sua amostra com o intervalo de referência determinado pelo laboratório de análises clínicas. A definição do intervalo de referência é resultado da avaliação de amostras de um grupo controle constituído de indivíduos normais, ou seja, sem alterações diretas ou indiretas para os parâmetros investigados. Os intervalos de referência são estabelecidos após análise estatística, na qual os valores centrais são aqueles que preenchem os critérios de normalidade (OLIVEIRA; MENDES, 2010). Dessa forma, os laboratórios de análises clínicas necessitam de intervalos de referência confiáveis e aplicáveis a sua população para todos os parâmetros analisados (CLSI, 2008).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é extensamente utilizada para a quantificação das células sanguíneas e, dessa forma, necessita-se do estabelecimento de intervalos de referência tanto para valores relativos quanto para absolutos das subpopulações linfocitárias presentes em amostras de sangue periférico (SANTAGOSTINO et al., 1999).

Devido a expansão da utilidade clínica da citometria de fluxo e ao fato de que a interpretação dos dados obtidos para avaliar as populações linfocitárias depende da relação entre os resultados obtidos na amostra do paciente com os intervalos de referência estabelecidos pela análise de amostras de indivíduos normais cada vez mais há necessidade de se estabelecer intervalos de referência mais exatos (McCOY; OVERTON, 1994).

Diversos países já avaliaram a contagem relativa e absoluta das células linfóides em amostras de sangue periférico. No entanto, na literatura brasileira há escassos trabalhos mostrando dados relacionados aos valores normais dessas células na nossa população. Dessa forma, o estabelecimento dos valores normais das células linfocitárias na população catarinense é de suma importância para que os resultados alterados possam ser comparados com o intervalo obtido em indivíduos saudáveis da população local, e, dessa forma, auxiliar na identificação das imunodeficiências e de outras alterações.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Determinar os intervalos de referência das subpopulações linfocitárias em sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis.

### 2.2 ESPECÍFICOS

✓ Validar os valores relativos obtidos pela análise das células no citômetro de fluxo FACSCanto II e os valores relativos e absolutos obtidos pela análise das células no contador hematológico Sysmex XE-2100D;

✓ Avaliar a concordância entre os valores relativos obtidos pelo citômetro de fluxo e pelo contador hematológico;

✓ Analisar a reprodutibilidade de metodologia pela consistência da contagem relativa das células T CD3+; pela avaliação da comparação entre o somatório das células T CD4+, T CD8+ e TCR  $\gamma\delta$ + com o valor das células T CD3+ totais; e por meio do valor relativo das células TCR  $\alpha\beta$ + com o somatório das células T CD4+ e T CD8+;

✓ Estabelecer o intervalo de referência da contagem relativa e absoluta das células T CD3+, T CD4+, T CD8+, CD4+CD8+, TCR  $\alpha\beta$ +, TCR  $\gamma\delta$ +, CD19+, CD19+CD20+, CD19+CD20-, NK maduras (CD56+ CD16+), NK imaturas (CD56++ CD16 -), NK totais, NKT e da relação T CD4+/T CD8+ e avaliar se há diferenças entre os gêneros;

✓ Comparar o intervalo de referência obtido na contagem dos valores relativos obtido pelo fenótipo TCR  $\gamma\delta$ + com o fenótipo CD3+ CD4- CD8- duplo-negativo;



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ESTABELECIMENTO DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Os resultados das análises laboratoriais devem ser comparados com um valor ou intervalo de referência com o objetivo de se obter um diagnóstico e/ou uma decisão terapêutica. (CLSI, 2008). Os intervalos de referência aplicados nas rotinas laboratoriais usualmente são obtidos da literatura ou de informações contidas nas bulas dos fabricantes dos reagentes ou equipamentos (FUENTES-ARDERIU, 2004), por isso, normalmente não são obtidos com resultados referentes à população ao qual será aplicado, visto que poucos laboratórios estabelecem seus próprios intervalos de referência (CLSI, 2008). Dessa forma, cada laboratório deve estabelecer o intervalo de referência relativo a sua população, baseado na metodologia utilizada na rotina, com no mínimo 120 amostras e com critérios estatísticos válidos para os dados obtidos na população (CALVELLI et al., 1993; CLSI, 2008).

Diversas etapas devem ser seguidas para que um laboratório estabeleça ou defina seu intervalo de referência. O processo tem início com a seleção de indivíduos referência, seguido da realização da fase analítica com posterior análise dos dados e obtenção do intervalo de referência para aquela população (CLSI, 2008). Para o estabelecimento de intervalos de referência a condição de “indivíduo saudável” é relativa, visto que a definição de saudável está relacionada aos critérios de inclusão, e estes podem variar entre os diferentes estudos. Assim, o critério utilizado para não incluir indivíduos considerados não saudáveis é uma questão a ser analisada para a seleção dos indivíduos de referência. Por isso, cada pesquisador deve estabelecer esses critérios antes da coleta da amostra biológica. Dentre os parâmetros utilizados para avaliar a condição física do indivíduo podem ser utilizados a aplicação de questionários com perguntas que envolvam aspectos físicos e históricos familiares e a realização de alguns exames laboratoriais (sorologias, avaliação da pressão arterial, peso, entre outros). Os questionários devem requerer respostas negativas ou afirmativas e, quando bem delineados e bem aplicados, podem ser uma excelente fonte para identificar os indivíduos que não devem ser incluídos no estudo (CLSI, 2008). Além disso, todos os indivíduos referência que concordarem em participar do estudo devem assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de coletar a amostra biológica

(FUENTES-ARDERIU, 2004). Ainda, relacionado a seleção do indivíduo, pode-se escolher o método direto, na qual os sujeitos são selecionados de uma população de referência específica com critérios bem definidos, ou de forma indireta, quando os indivíduos são selecionados a partir de uma base de dados utilizada para outros propósitos, como por exemplo, doadores de um serviço de hemoterapia. Embora o segundo método seja mais simples e sem custos, deve-se ter cautela, pois alguns indivíduos considerados não saudáveis podem acabar fazendo parte da amostragem. Para atenuar esses problemas, devem-se aplicar métodos estatísticos que excluam os valores discrepantes (CLSI, 2008).

Nesse tipo de estudo, a fase pré-analítica (preparação do indivíduo e coleta da amostra) e a fase analítica (processamento da amostra) devem estar bem definidas de modo que o mesmo padrão seguido para estabelecer os intervalos de referência seja utilizado para analisar, posteriormente, as amostras dos pacientes. Caso o intervalo de referência seja estabelecido de forma distinta (método ou equipamento) da utilizada para a avaliação das amostras dos pacientes, deve-se proceder a comparação dos resultados. Caso não sejam comparáveis, é necessário estabelecer intervalos de referência distintos, principalmente se os resultados numéricos resultarem em condutas clinicamente distintas (CLSI, 2008).

Além da variação intra- e inter-individual, o estabelecimento do intervalo de referência também sofre interferências relacionadas a variabilidade presente na fase analítica. Nesse sentido, o método utilizado deve estar padronizado e descrito em detalhes para que as informações fornecidas sejam válidas. Além disso, outros fatores que afetam o desempenho analítico, como o equipamento e os reagentes utilizados, processos de calibração e a análise de dados devem ser levados em consideração (CLSI, 2008).

Após a análise dos dados, deve-se proceder a análise estatística para a obtenção do intervalo de referência. Apesar do estabelecimento desse intervalo ser definido com amostras de indivíduos saudáveis, exclui-se 2,5% dos valores extremos, pois assume-se que 5,0% dos indivíduos classificados clinicamente como normais apresentarão valores acima ou abaixo dos limites do intervalo de referência (WRIGHT; ROYSTON, 1999; OLIVEIRA; MENDES, 2010). A maioria dos analitos apresenta distribuição não paramétrica dos dados e, dessa forma, o intervalo de referência é estabelecido por meio dos

percentis 2,5% e 97,5%. Para os casos nos quais a distribuição dos dados é paramétrica aplica-se como limites inferior e superior a média  $\pm$  2 desvios-padrão (DP) (CLSI, 2008).

Nessa fase de análise, os dados dos indivíduos de referência podem ser particionados em subgrupos. De acordo com magnitude dessa subdivisão, pode haver alterações no diagnóstico ou na escolha da conduta terapêutica. Os indivíduos podem ser divididos de acordo com gênero, idade, estado gestacional e descendência étnica (FUENTES-ARDERIU, 2004).

### 3.2 POPULAÇÕES CELULARES AVALIADAS

Para alcançar o objetivo proposto, o presente estudo estabeleceu os valores de referência para as células T CD3+, T CD4+, T CD8+, CD4+CD8+, TCR  $\alpha\beta$ +, TCR  $\gamma\delta$ +, CD19+, CD19+CD20-, NK maduras (CD56+ CD16+), NK imaturas (CD56++ CD16 -), e NKT. Neste âmbito, serão abordadas abaixo algumas características de cada tipo celular avaliado no estudo.

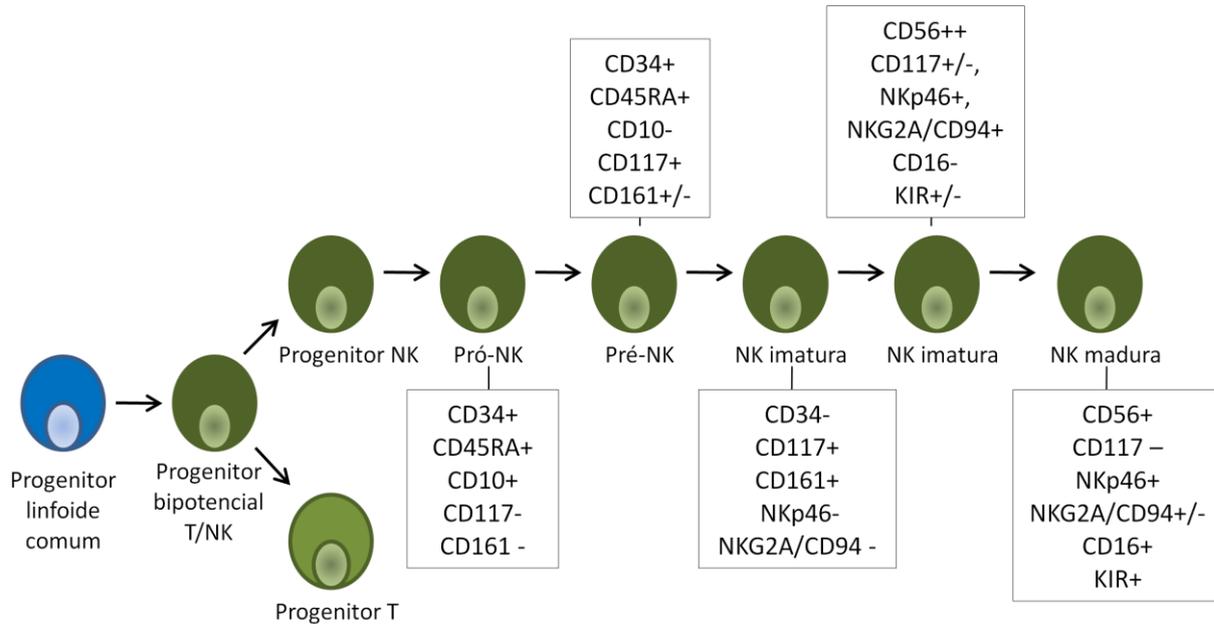
#### 3.2.1 Células NK

##### 3.2.1.1 Diferenciação e maturação

As células NK têm origem a partir de uma célula hematopoiética pluripotente que se diferencia a um precursor linfóide comum (FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007; CRUVINEL et al., 2010). Esse último se diferencia a um progenitor bipotencial T/NK e, logo depois, a um progenitor NK, o qual dará origem às células NK maduras (Figura 1) (FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007). No entanto, há indícios de que a via de desenvolvimento das células NK não ocorra completamente na medula óssea, pois tentativas de caracterizar a maturação das células NK a partir das células progenitoras CD34++ na medula óssea ou no timo não foram bem sucedidas. Ao contrário, foram observadas células NK imaturas (CD56 com forte intensidade de expressão e CD16- ou com fraca intensidade de expressão) em órgãos linfóides secundários (linfonodos e amígdalas), o que sugere que os órgãos linfóides secundários sejam o local de desenvolvimento das células NK (FREUD et al., 2006; CALIGIURI, 2008). Assim, foram descritos estágios fenotipicamente distintos do desenvolvimento das células NK nos tecidos linfóides secundários. O estágio pró-NK

(CD34+, CD45RA+, CD10+, CD117-, CD161-), que deriva da medula óssea, entra na circulação periférica e atinge o espaço parafolicular do linfonodo. Nesse espaço, essas células pró-NK tornam-se células pré-NK (CD34+, CD45RA+, CD10-, CD117+, CD161+/-) que são ativadas e estimuladas a passarem para o estágio de NK imaturas (CD34-, CD117+, CD161+, NKp46-, NKG2A/CD94-). Na sequência, essas células se diferenciam e dão origem as células CD56+ de forte expressão, CD117+/-, NKp46+, NKG2A/CD94+, CD16-, KIR+/-, que ainda são consideradas imaturas. Finalmente as células NK maduras (CD56+ de fraca intensidade de expressão, CD117-, NKp46+, NKG2A/CD94+/, CD16+, KIR+) retornam para a circulação via vaso eferente do linfonodo (FREUD et al., 2006; CALIGIURI, 2008).

Figura 1 – Diferenciação antigênica das células NK.



Fonte: Adaptado de FREUD et al. (2006) e CALIGIURI (2008).

### 3.2.1.2 *Imunofenótipo*

As células NK não expressam marcadores associados à linhagem T (CD3) nem B (CD19) e são caracterizadas pela expressão de CD16 e CD56 em sua membrana (PAPAMICHAIL et al., 2004; FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007). O CD16 é o receptor de baixa afinidade para a fração cristalizável (Fc) da imunoglobulina G (IgG), o Fcγ-RIIIA, e o CD56 pertence a família de moléculas de adesão das células neuronais – NCAM (FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007). As células NK apresentam fenótipo heterogeneo e ao avaliar a intensidade de expressão dos marcadores CD16 e CD56, elas podem ser divididas em duas subpopulações principais (FEHNIGER et al., 2003; FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007; GIBSON; SWERDLOW; FELGAR, 2011). A primeira população corresponde às células menos maduras com expressão fraca ou negativa de CD16 e com expressão forte de CD56 (FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007; GIBSON; SWERDLOW; FELGAR, 2011). A outra população compreende células mais maduras que expressam CD16 com forte intensidade e CD56 com fraca intensidade (FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007; GIBSON; SWERDLOW; FELGAR, 2011).

Além dos marcadores CD16 e CD56, o CD2, o antígeno associado à função leucocitária tipo 1 (LFA-1) (FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007), o CD8 de fraca intensidade, o CD7 e o CD11b (BACAL; FAULHABER, 2003) também podem estar expressos nas células NK . Além disso, a expressão de CD57 está associada com o aumento da atividade citotóxica das células NK e é adquirido de forma tardia na via de diferenciação das células com expressão fraca ou negativa de CD16 e com expressão forte de CD56 (GIBSON; SWERDLOW; FELGAR, 2011).

### 3.2.1.3 *Função*

As células NK constituem uma das primeiras linhas de defesa do organismo, pois, exercem sua ação sem a necessidade de sensibilização prévia (PAPAMICHAIL et al., 2004; FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007). Dentre as funções das células NK inclui-se a ação citotóxica e a produção de quimiocinas e de citocinas imunorregulatórias (PAPAMICHAIL et al., 2004) para o recrutamento

de outras células, como neutrófilos e macrófagos; e para o processo de ativação de células dendríticas, dos linfócitos B e T, de forma que esses possam exercer sua ação (CRUVINEL et al., 2010).

A ação citotóxica das células NK é efetuada sobre células infectadas por vírus, bactérias, protozoários e, também, contra células tumorais (PAPAMICHAIL et al., 2004; CRUVINEL et al., 2010). Essa ação é baseada na diminuição ou ausência de expressão de moléculas do MHC de classe I nas células-alvo (CHAPLIN, 2010; CRUVINEL et al., 2010). As moléculas de MHC de classe I nos seres humanos receberam o nome de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) e estão presentes em todas as células nucleadas (CRUVINEL et al., 2010). Dessa forma, as células com a presença de HLA são reconhecidas como próprias. Nas células tumorais ou infectadas ocorre o fenômeno de perda da expressão do próprio, ou seja, há uma diminuição ou, até mesmo, uma ausência de expressão de moléculas de HLA. Isso faz com que haja uma ativação das células NK, o que resulta na lise dessas células devido à alteração na expressão do HLA (ORANGE; BALLAS, 2006; BECKNELL; CALIGIURI, 2008; JOBIM; JOBIM, 2008; CRUVINEL et al., 2010).

#### *3.2.1.4 Distribuição*

As células NK maduras podem ser encontradas em diversos órgãos, como no baço, no pulmão, no fígado e no útero de gestantes (ORANGE; BALLAS, 2006; FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007). Na linfa e nos linfonodos essas células são encontradas em pequenas quantidades, no entanto, na presença de estímulos as células NK podem migrar rapidamente para os linfonodos (ORANGE; BALLAS, 2006).

Com relação ao sangue periférico, a porcentagem de células NK descrita na literatura difere entre os estudos e apresenta uma faixa que varia de 5% a 29% dos linfócitos circulantes (FEHNIGER et al., 2003; PARSLow, 2004; ORANGE; BALLAS, 2006; FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007; JOBIM; JOBIM, 2008; CRUVINEL et al., 2010; KOESELL; MILLER; MCKENNA, 2012).

A população de células NK imaturas com expressão fraca ou negativa de CD16 e com expressão forte de CD56 representa a minoria das células NK do sangue periférico (cerca de 10%), pois a maioria dessas células estão localizadas nos órgãos linfoides como linfonodos, amígdalas e tecido linfóide associado a mucosa (MALT)

(FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007; GIBSON; SWERDLOW; FELGAR, 2011).

### 3.2.2 Células NKT

#### 3.2.2.1 Diferenciação e maturação

As células NKT têm origem na medula óssea e provém do mesmo precursor linfóide comum que origina as células T, no entanto, o desenvolvimento dessas células ocorre no timo (VIVIER et al., 2012). As células iNKT CD4+ e iNKT CD4-CD8- duplo negativas tem seu desenvolvimento dependente do timo, ao contrário das células iNKT CD8+, as quais são timo independentes (HAMMOND et al., 1999). A avaliação de camundongos timectomizados sugere que as células NKT possam desenvolver-se de maneira extra-tímica a partir da medula óssea (PAPAMICHAIL et al., 2004).

Após o comprometimento com a linhagem linfóide T, ocorre a aquisição do receptor de célula T (TCR) tipo  $\alpha\beta$  e depois da geração dos tímócitos duplo-positivos é que as células NKT e os linfócitos T convencionais seguem caminhos diferentes na via de maturação (VIVIER et al., 2012). As etapas de maturação dessas células até se tornarem linfócitos TCR  $\alpha\beta$ + e CD4+CD8+ duplo positivos é descrita na seção de linfócitos T.

#### 3.2.2.2 Imunofenótipo

As células NKT compreendem uma subpopulação linfocitária que coexpressa um marcador associado à linhagem NK (CD56+) e outro associado à linhagem T (CD3+) (PAPAMICHAIL et al., 2004).

Geralmente as células NKT são descritas como uma única população, no entanto, essas células podem ser divididas em NKT tipo I [clássico ou invariante – (iNKT)] CD1d-dependente; tipo II (NKT não-clássico) CD1d-dependente; e células NKT-like CD1d-independentes (GODFREY et al., 2004). O tipo I (iNKT) é o grupo de células NKT mais estudadas em humanos e, ainda, podem ser divididas de acordo com a presença ou ausência da expressão dos antígenos CD4 e CD8 (TARAZONA et al., 2003; VIVIER et al., 2012). Dessa forma, é possível observar o tipo iNKT CD4+, o tipo iNKT CD4-CD8- duplo-

negativo e o tipo iNKT CD8<sup>+</sup> (HAMMOND et al., 1999; GODFREY et al., 2000; TARAZONA et al., 2003; GODFREY et al., 2004). A expressão de CD8<sup>+</sup> observada nas células iNKT é de intensidade inferior quando comparada a observada nas células T CD8<sup>+</sup> convencionais (HAMMOND et al., 1999).

As células iNKT expressam o TCR  $\alpha\beta$  no qual a cadeia  $\alpha$  é invariante, ou seja, possui o segmento V $\alpha$ 24 e J $\alpha$ 18 (V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18) (PAPAMICHAIL et al., 2004; SANDERSON et al., 2012; VIVIER et al., 2012). Essa cadeia V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 é pareada a uma cadeia  $\beta$  semi-invariante que utiliza preferencialmente o segmento V $\beta$ 11 (PAPAMICHAIL et al., 2004; SANDERSON et al., 2012) mas que também pode utilizar o segmento V $\beta$ 13 (SAKAMOTO et al., 1999) rearranjados com diversos segmentos J $\beta$  (PAPAMICHAIL et al., 2004; SANDERSON et al., 2012). Esse rearranjo invariante da cadeia  $\alpha$  faz com que as células NKT reconheçam um número restrito de ligantes (GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2002). No entanto, estudos apontaram que a cadeia  $\alpha$  não é totalmente invariante, uma vez que, foram observados clones com variações em um único aminoácido em uma frequência que varia de 4% a 30% (EXLEY et al., 2008; SANDERSON et al., 2012). A maioria dessas variações envolve o resíduo 93 da região CDR3. O aminoácido usualmente encontrado nessa região é a serina e as variações incluem asparagina, treonina e isoleucina. Sanderson e colaboradores (2012) avaliaram os efeitos dessas alterações na ligação das células iNKT à molécula apresentadora CD1d e observaram que essa mudança de apenas um aminoácido exerce um grande impacto nessa ligação. No entanto, as consequências dessa alteração na resposta imune em indivíduos saudáveis e doentes ainda não são claras (SANDERSON et al., 2012).

As células NKT também podem expressar CD38<sup>+</sup> (HAMMOND et al., 1999), CD28<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup> (TARAZONA et al., 2003) e CD122<sup>+</sup> (PAPAMICHAIL et al., 2004). Quando ativadas essas células podem expressar os marcadores CD44<sup>+</sup> de forte intensidade, CD62L<sup>+</sup> de fraca intensidade e CD69<sup>+</sup> (HAMMOND et al., 1999). Essas células também apresentam um fenótipo de memória caracterizado pela positividade para CD45RO<sup>+</sup> e perda da expressão de CD62L (TARAZONA et al., 2003).

### 3.2.2.3 Função

As células NKT desempenham um papel intermediário na ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo. Esse fato é evidenciado quando ocorre a ausência dessas células no organismo e, como consequência, há falhas na execução das funções em ambos os sistemas (SEINO; TANIGUCHI, 2005a). Outro fato importante é que essas células secretam tanto interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) quanto IL-4 e, dessa forma, elas podem ativar respostas T helper 1 (Th1) e Th2 (PAPAMICHAIL et al., 2004).

As células iNKT respondem de forma rápida e específica a antígenos do tipo glicolipídeos apresentados pela molécula CD1d (HAMMOND et al., 1999; TARAZONA et al., 2003; SEINO; TANIGUCHI, 2005a; LIN et al., 2006; VIVIER et al., 2012). O CD1d é expresso em linfócitos B, linfócitos T, macrófagos e hepatócitos. Estruturalmente, é uma proteína não polimórfica relacionada ao MHC de classe I que reconhece ligantes de natureza hidrofóbica, glicolipídeos de microorganismos e raramente glicolipídeos próprios (GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2002), como o glicosilfosfatidil inositol (GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2002; PAPAMICHAIL et al., 2004) ou a isoglobotrihexosilceramida (SEINO, TANIGUCHI, 2005b).

A ativação das subpopulações funcionalmente distintas de células NKT pode ser responsável pelas diversas atividades dessas células na rejeição de células tumorais, em doenças auto-imunes ou em infecções (TARAZONA et al., 2003). A função das células NKT relacionada com a imunovigilância tumoral despertou interesse na utilização dessas células na terapia celular anti-tumoral (VIVIER et al., 2012).

As células NKT também exercem uma ação citotóxica sob as células infectadas ou tumorais. A escolha em exercer essa ação citotóxica ou a produção de citocinas depende da natureza do sinal de ativação (antigênico ou inflamatório) (PAPAMICHAIL et al., 2004). Para exercer a ação citotóxica as células NKT atuam por meio de perforinas, granzimas, ligante de FAS (CD95L) e ligante de indução de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (CD253) [*tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)] (TARAZONA et al., 2003; PAPAMICHAIL et al., 2004).

### 3.2.2.4 Distribuição

As células NKT podem ser encontradas no timo, no baço (HAMMOND et al., 1999; PAPAMICHAIL et al., 2004), no sangue periférico (GODFREY et al. 2000; TARAZONA et al., 2003), no sangue de cordão umbilical, na medula óssea, na decídua (cerca de 0,5% das células T decíduais) (TARAZONA et al., 2003) e no fígado (cerca de 4% das células T hepáticas) (HAMMOND et al., 1999; GODFREY et al. 2000; TARAZONA et al., 2003; PAPAMICHAIL et al., 2004). Essas células também podem ser encontradas no pulmão e nos linfonodos, no entanto, esse achado é raro (PAPAMICHAIL et al., 2004).

Na maioria dos tecidos são encontradas as células iNKT tipo CD4+ e CD4-CD8- duplo-negativas, com exceção do timo, onde também são encontradas as células tipo iNKT CD8+ (HAMMOND et al., 1999).

## 3.2.3 Células T $\gamma\delta$

### 3.2.3.1 Diferenciação e maturação

No timo fetal, os primeiros rearranjos dos genes de TCR envolvem os loci  $\gamma$  e  $\delta$ . Na célula T duplo-negativa em desenvolvimento, é possível ocorrer o rearranjo dos loci  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ . A célula é selecionada para a linhagem T  $\gamma\delta$  quando obteve sucesso no rearranjo dos loci  $\gamma$  e  $\delta$  do TCR antes de realizar o rearranjo de  $\beta$ . Isso ocorre em cerca de 10% das células T duplo-negativas em desenvolvimento uma vez que, em 90% dos casos ocorre inicialmente um rearranjo do gene  $\beta$ , e, dessa forma, as células se transformam em células TCR  $\alpha\beta$  (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

### 3.2.3.2 Imunofenótipo

As células T  $\gamma\delta$  podem ser divididas em duas subpopulações baseadas na expressão do gene da cadeia V $\delta$  (V $\delta$ 1 e V $\delta$ 2) (ZHENG et al., 2011; FRENCH et al., 2009). Uma das populações expressa o gene V $\delta$ 2 pareado com uma cadeia específica, a V $\gamma$ 9 formando o V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 (também denominado V $\delta$ 2V $\gamma$ 2), enquanto a outra expressa o gene V $\delta$ 1 associado a diversos elementos V $\gamma$  (KABELITZ; WESCH; HE, 2007).

A maioria das células T  $\gamma\delta$  apresentam fenótipo duplo-negativo para os antígenos CD4 e CD8 (GIRARDI, 2006). Evidenciou-se que aproximadamente 50% das células T  $\gamma\delta$  esplênicas e intraepiteliais humanas e 30% das células T  $\gamma\delta$  circulantes expressam CD8+; e que 25% das células T  $\gamma\delta$  do sangue periférico expressam NKR-P1A (CD161). As células T  $\gamma\delta$  humanas também expressam receptores de células NK: 70% das células T  $\gamma\delta$  do sangue periférico expressam os heterodímeros NKG2/CD94 e cerca de 10% expressam receptores KIR (FRENCH et al., 2009).

### 3.2.3.3 Função

As células T  $\gamma\delta$  contribuem tanto para imunidade inata quanto para a adaptativa e atuam como uma ponte entre essas duas respostas (CHEN; LETVIN, 2003; CHEN, 2011). Essas células atuam na imunovigilância, na imunoregulação, no reconhecimento de células tumorais, como primeira linha na defesa contra infecções microbianas (CHEN; LETVIN, 2003) por meio da secreção de citocinas (principalmente TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), na atividade citotóxica (via receptores/ligantes de morte ou via grânulos citotóxicos) e na indução da resposta imune adaptativa (KABELITZ; WESCH; HE, 2007; ZHENG et al., 2011).

As células T  $\gamma\delta$  são capazes de reconhecer diversos antígenos como proteínas, lipídeos, moléculas fosforiladas e alquil aminas, metabólitos bacterianos e alguns antígenos virais. Esses antígenos não precisam ser apresentados por moléculas do MHC, pois, as células T  $\gamma\delta$  não são restritas ao MHC (CHEN; LETVIN, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). As células TCR  $\alpha\beta$  e TCR  $\gamma\delta$  reconhecem ligantes diferentes. Isso faz com que as células T  $\gamma\delta$  atuem como uma via adicional na imunovigilância e na atividade antitumoral (KABELITZ; WESCH; HE, 2007). Devido ao fato de reconhecerem ligantes distintos, as células T  $\gamma\delta$  não atuam de forma redundante na defesa imune contra microorganismos (KABELITZ; WESCH; HE, 2007).

### 3.2.3.4 Distribuição

A porcentagem das células T  $\gamma\delta$  varia amplamente em diferentes tecidos e espécies (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

No sangue periférico essas células podem compreender de 2% a 5% do total de células T (PARSLOW, 2004; KABELITZ; WESCH; HE, 2007), contudo, podem ser encontradas em maior quantidade no intestino (KABELITZ; WESCH; HE, 2007).

A maioria das células T  $\gamma\delta$  (50% a >90% do total das células T) encontradas no sangue periférico compreendem a subpopulação V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 (KABELITZ; WESCH; HE, 2007; CHEN, 2011; ZHENG et al., 2011). As células que expressam o gene V $\delta$ 1 associado a diversos elementos V $\gamma$  são mais prevalentes entre os linfócitos intraepiteliais intestinais (GIRARDI, 2006; KABELITZ; WESCH; HE, 2007; VERDINO et al., 2011) e entre os linfonodos na epiderme (ZHENG et al., 2011; VERDINO et al., 2011).

### **3.2.4 Linfócitos B**

#### *3.2.4.1 Diferenciação e maturação*

As células linfoides B têm sua origem na medula óssea (BONILLA; OETTGEN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010) e permanecem nesse sítio até o final de sua maturação, ou seja, derivam de uma célula progenitora hematopoiética e amadurecem até o estágio de célula B virgem. Nesse estágio, essas células entram na circulação sanguínea e migram para os órgãos linfoides secundários (linfonodos, tecidos linfoides associados a mucosa, baço), nos quais ocorre o término do processo, ou seja, a diferenciação em célula B de memória ou efetora (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; PEREZ-ANDRES et al., 2010).

Como abordado anteriormente, a célula progenitora hematopoiética se diferencia em um progenitor multipotente, o qual se divide em progenitor mieloide comum e progenitor linfoide multipotente. Posteriormente, este se torna o progenitor linfoide comum que tem o potencial para se diferenciar em linfócitos B, T, NK ou NKT. Quando esse progenitor linfoide comum se compromete com a linhagem B, ele se torna a célula pró-B. Depois, se diferencia a células pré-B (I e II), B imatura, B madura/virgem, célula B do centro germinal e finalmente termina a sua diferenciação como célula plasmocitária (PARRA, 2009).

As células no estágio pró-B expressam os genes ativadores da recombinação 1 e 2 (RAG1 e RAG2) e da desoxinucleotidil terminal transferase (TdT). Esses genes atuam na recombinação gênica

necessária para a produção das imunoglobulinas, na qual a montagem da cadeia pesada tem início com a combinação aleatória que aproxima um segmento D a um J, e que a seguir, unem-se a um segmento V. Essa combinação é importante, pois é ela que define a especificidade de reconhecimento do anticorpo formado, uma vez que a porção constante da cadeia pesada da imunoglobulina não interfere na especificidade. No estágio de célula pré-B, a região variável da cadeia pesada se liga a região constante e forma um pré-receptor de célula B (pré-BCR) (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010) e este aparece na superfície celular em associação à cadeia  $\mu$ . Contudo, o rearranjo ainda não está completo, pois, ainda precisa rearranjar as cadeias leves de imunoglobulina. Esse rearranjo ocorre após o estágio pré-B. Assim, cada imunoglobulina é formada por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. As cadeias leves podem ser de dois tipos (Kappa ou Lambda) e possuem três segmentos distintos (VL, JL e CL). Por outro lado, as cadeias pesadas podem ser de 5 tipos diferentes ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\mu$ ) que definem nove tipos de imunoglobulinas (IgM, IgD, IgG1-4, IgA1-2 e IgE) e que são formadas por 4 segmentos (VH, D, JH, e CH) (CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; BONILLA; OETTGEN, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). O sítio de ligação ao antígeno é formado pela região variável da cadeia leve (VL) em conjunto com a região variável da cadeia pesada (VH) (CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Por outro lado, a região constante da cadeia pesada é responsável pela maioria das funções efetoras da molécula de imunoglobulina, como por exemplo, a ativação do sistema complemento (CHAPLIN, 2010).

Quando ocorre a expressão completa de uma IgM na superfície da célula, essa célula é denominada B imatura (BONILLA; OETTGEN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Nesse estágio, essa célula deixa a medula óssea e, pela corrente sanguínea, chega a polpa vermelha do baço, e em seguida, migra para a polpa branca onde continua a sua maturação com a produção de uma IgD de membrana (BONILLA; OETTGEN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). A coexpressão de IgM e IgD é acompanhada da capacidade de recircular e de funcionar, e nesse estágio, essas células são denominadas B maduras/virgens. Essas células B maduras/virgens retornam a circulação para migrarem para os ganglios linfáticos e tecidos linfóides associados à mucosa (ABBAS;

LICHTMAN; PILLAI, 2011). As células B virgens podem ser divididas em células B-1 (B-1a e B-1b), células B foliculares e células B da zona marginal. As células B-1 não têm suas funções bem definidas em humanos. A maioria das informações acerca dessa população celular é decorrente de estudos em roedores. Nos camundongos, as células B-1 contribuem para a geração de resposta tipo IgM contra antígenos de bactérias patogênicas, como a fosforilcolina, por exemplo, um antígeno T independente (ANSEL; HARRIS; CYSTER., 2002). As células B foliculares são células recirculantes que migram repetidas vezes através do sangue periférico e da linfa para áreas específicas nos linfonodos, nas placas de Peyer e no baço. As células da zona marginal possuem características semelhantes às células do sistema imune inato, pois podem se diferenciar a células plasmáticas de vida curta sem nunca terem realizado uma ligação via BCR. Essas células também possuem a capacidade de mediar o transporte de antígenos na forma de imunocomplexos para os folículos esplênicos, podem estar envolvidas na resposta B dependente de célula T e participar na resposta imune, pois, reconhecem antígenos lipídicos (ALLMAN; PILLAI, 2008).

As imunoglobulinas IgM e IgD são receptores de superfície celular que atuam no reconhecimento dos antígenos e iniciam o processo de ativação dos linfócitos B (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Na ausência de reconhecimento de algum antígeno, essas células B virgens permanecem circulando no sangue periférico no estado latente (PARRA, 2009). No entanto, quando essas células entram em contato com antígenos elas são ativadas. A ativação das células B culmina na expansão clonal, seguida da diferenciação e geração de células B de memória e de células secretoras de anticorpos (células plasmocitárias) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

São necessários dois sinais para que o linfócito B se ative. O primeiro é a ligação do BCR a um antígeno e o segundo provém de duas cadeias peptídicas [Ig $\alpha$  (CD79a) e Ig $\beta$  (CD79b)] que dão início à sinalização intracelular (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Após a ativação pelo antígeno, algumas células se transformam em células B de memória, pois adquirem a capacidade de sobreviver por grandes períodos sem necessitar de um contínuo estímulo antigênico. Essas células são geradas nos centros germinativos e atuam montando uma resposta rápida na presença do mesmo antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Algumas células B ativadas começam a produzir outros tipos de imunoglobulinas de cadeia pesada (switching ou troca de classe) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). A troca da cadeia pesada ocorre de forma que a IgM ou IgD se transformam em IgG, IgA ou IgE. Esse processo envolve eventos moleculares complexos onde a porção variável tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada continuam as mesmas e, dessa forma, não há alteração na especificidade antigênica. Dessa forma, as diferentes características funcionais e locais de atuação das imunoglobulinas tornam a resposta imune mais diversificada (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Algumas células B, que proliferaram em resposta a antígenos, diferenciam-se em células plasmocitárias secretoras de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

#### *3.2.4.2 Imunofenótipo*

A diferenciação das células B ocorre por meio de um processo de maturação celular com diversas etapas, as quais podem ser monitoradas pela combinação de vários marcadores na qual a aquisição ou a perda de expressão coordenada desses antígenos celulares possibilita a divisão das células em várias populações (LÚCIO et al., 1999). Esses marcadores são responsáveis por funções específicas nas diferentes fases de maturação dos linfócitos B (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Lúcio e colaboradores (1999) avaliaram os padrões normais de diferenciação dos linfócitos B na medula óssea e definiram três subpopulações em diferentes estágios de maturação (imaturas, intermediárias e maduras).

Estudos posteriores, por meio da avaliação imunofenotípica, evidenciaram a presença de cinco populações relacionadas aos estágios de maturação das células B: pró-B, pré-B-I, pré-B-II, imatura e célula B madura/virgem. As células pró-B apresentam expressão fraca de CD45, positividade para CD22 e CD79a citoplasmáticos e CD34, e forte intensidade de expressão de CD38 (JAFFE et al., 2008; PEREZ-ANDRES et al., 2010), no entanto, o CD19 ainda não está expresso nesse estágio (PEREZ-ANDRES et al., 2010). A interação da IL-7 com o seu receptor (CD127) faz com que a célula comece a produzir uma série de fatores de transcrição como PAX-5, PU.1, EBF-1 e E2A. Esses fatores atuam na indução da síntese de TdT e dos genes RAG 1 e 2 para dar início a recombinação somática entre os segmentos D e J das cadeias

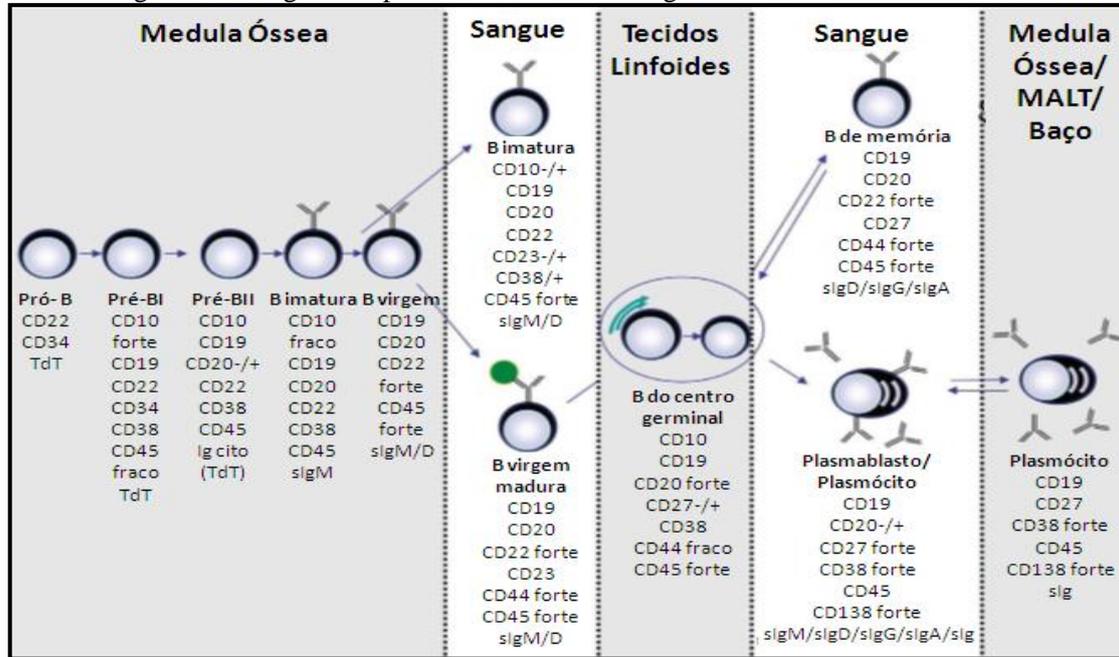
pesadas de imunoglobulinas (PEREZ-ANDRES et al., 2010). Após expressarem PAX-5, as células B passam a expressar CD19 (marcador específico das células B) (LLINÀS et al., 2011; PEREZ-ANDRES et al., 2010), e nesse momento, diferenciam-se para o estágio pré-B-I. Além desses dois marcadores, apresentam uma forte expressão de CD10 e CD38, positividade para CD34, CD79a e TdT. É nesse estágio, que o segmento V se recombina com o segmento DJ já rearranjado. Com a finalização do rearranjo VDJ, as células passam a expressar no citoplasma a cadeia pesada de I $\mu$ . Nesse estágio, essas células são denominadas pré-B-II, no qual as células expressam CD20 de forma heterogênea, CD45 com uma maior intensidade de expressão, quando comparado ao estágio anterior, e ausência de expressão de CD34 e TdT. As moléculas CD79a e CD79b correspondentes as proteínas sinalizadoras I $\alpha$  e I $\beta$  também estão presentes nesse estágio para formar o pré-BCR. Quando o pré-BCR é capaz de reconhecer ligantes próprios ocorre uma sinalização intracelular e a célula entra em apoptose. Caso o reconhecimento do próprio não ocorra, a célula se prepara para continuar seu processo de maturação e recombinar as cadeias leves de imunoglobulinas. Após o rearranjo das cadeias leves e pesadas estar completo, uma molécula de IgM é expressa na superfície da célula, e nesse estágio, a célula é considerada B imatura. Essas células expressam CD20, CD38 e CD45 de forte intensidade e apresentam uma expressão fraca para CD10. Essas células B imaturas circulantes expressam CD21 de fraca intensidade, CD81 de alta intensidade e uma positividade homogênea para CD5. Nesse estágio, o BCR (agora completo) é testado novamente, e caso as células reconheçam ligantes próprios, passam pelo processo de re-edição das cadeias leves do BCR. Caso essa re-edição ainda produza uma célula auto-reativa, elas seguem o caminho da apoptose. As células que obtêm sucesso nessa re-edição expressam CD22 e CD20 com forte intensidade e perdem a expressão de CD10 e CD38, tornando-se linfócitos B maduros/virgens, os quais deixarão a medula óssea por meio da corrente sanguínea para migrarem para os órgãos linfóides secundários (PEREZ-ANDRES et al., 2010). Essas células B maduras/virgens co-expressam IgM+ e IgD+ (VAN LOCHEM et al., 2004; LLINÀS et al., 2011) não expressam CD27 (BONILLA; OETTGEN, 2010) e há indícios de que elas não precisam do baço para completar o processo maturacional (VAN LOCHEM et al., 2004).

As células B da zona marginal co-expressam CD19, IgM, IgG e CD27 (BONILLA; OETTGEN, 2010) por outro lado, as células do centro germinal expressam CD19+ e CD38+ com forte intensidade e não expressam IgD (LLINÀS et al., 2011) nem IgM e expressam CD27 (BONILLA; OETTGEN, 2010). Essas células B que entraram no linfonodo e foram selecionadas antigenicamente por uma reação no centro germinal, o qual selecionou as células com imunoglobulinas de alta afinidade finalmente se diferenciam em células B de memória (JOURDAN et al., 2009). As células B de memória não expressam CD5 (PEREZ-ANDRES et al., 2010), tampouco CD38 (JOURDAN et al., 2009) e expressam altos concenções de Bcl-2, proteína antiapoptótica que contribui para a vida longa dessas células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011), para CD27 (BONILLA; OETTGEN, 2010) e para os marcadores CD19+ e CD20+ (JOURDAN et al., 2009).

Após o estágio de células B de memória, essas células diferenciam-se em plasmablastos precoces (JOURDAN et al., 2009). Essas células são negativas para IgM e positivas para CD38 e CD27 com forte intensidade (JOURDAN et al., 2009; BONILLA; OETTGEN, 2010) além disso, expressam CD19+, no entanto, a expressão de CD20 torna-se ausente (JOURDAN et al., 2009).

Por fim, os plasmablastos precoces se diferenciam em células plasmocitárias (Figura 2) maduras, as quais expressam CD19+, CD45+, CD27+, CD38++ e CD138++ com forte intensidade e expressam cadeias leves de imunoglobulina (Kappa e Lambda) intracitoplasmáticas, mas não expressam imunoglobulinas de superfície (PEREZ-ANDRES et al., 2010; LLINÀS et al., 2011). Além disso, semelhante ao observado nos plasmablastos precoces, essas células são negativas para CD20 (JOURDAN et al., 2009).

Figura 2 – Antígenos expressos nos diversos estágios maturacionais das células B.



Fonte: Adaptado de PEREZ-ANDRES et al. (2010).

### 3.2.4.3 Função

Os linfócitos B fazem parte do sistema imune adaptativo e são responsáveis pela resposta humoral. Esse tipo de resposta é caracterizada pela produção e consequente liberação de anticorpos que atuam na neutralização ou destruição dos antígenos contra os quais foram gerados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Os linfócitos B também são capazes de atuarem como células apresentadoras de antígenos, uma vez que conseguem interiorizar, processar e apresentar antígenos ligados ao BCR. Os peptídeos gerados por esse processamento são posteriormente expressos na membrana plasmática dos linfócitos B ligados às moléculas do MHC de classe II para apresentação aos linfócitos T CD4+. Quando o complexo formado pelo antígeno e MHC de classe II interage com o TCR do linfócito T CD4+, o sinal gerado resulta na expansão clonal desses linfócitos T e produção de citocinas que atuam na estimulação da proliferação e diferenciação dos linfócitos B (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Para responderem a antígenos peptídicos, os linfócitos B necessitam da ajuda dos linfócitos T auxiliares (CD4+) (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Assim, esses antígenos são denominados antígenos T dependentes. Nesse tipo de resposta, os linfócitos T ajudam os linfócitos B a amadurecerem, incluindo a secreção de citocinas que controlam a troca de cadeia de imunoglobulina (CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Essa troca de imunoglobulina ocorre de forma que a célula que expressa IgM e IgD, devido a outro rearranjo, passa a expressar IgA, IgG ou IgE. As citocinas atuam de forma que a IL-4 e a IL-13 promovam a troca para IgE e o TGF- $\beta$  e a IL-10 promova a troca para IgA (BONILLA; OETTGEN, 2010). Por outro lado, quando os linfócitos B não necessitam dos linfócitos T para executar a resposta, esses antígenos são denominados antígenos T independentes (CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Certas moléculas são capazes de induzir a proliferação e a produção de anticorpos pelas células B, como por exemplo, algumas lectinas. Existem outras macromoléculas, como proteínas polimerizadas e polissacarídeos que apresentam padrões moleculares repetidos que tem capacidade de interagir com receptores de imunoglobulinas na superfície celular e induzir a troca de classe. Em certos casos, os antígenos podem promover mais de um sinal de ativação por meio da interação com outro sistema de receptores, como, por exemplo, os Toll-like (BONILLA;

OETTGEN, 2010). Os linfócitos B expressam alguns receptores Toll-Like (TLR-2, TLR-3, TLR-5, TLR-7 e TLR-9) que respondem a antígenos proteicos, polissacarídicos e lipídicos (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

#### *3.2.4.4 Distribuição*

As células linfóides B variam amplamente entre os tecidos. No sangue periférico, compreendem entre 10 a 15% do total de linfócitos (PARSLOW, 2004; CHAPLIN, 2010). Do total de células B circulantes no sangue periférico cerca de 60 a 70% são B maduras/virgens e 20 a 30% compreendem as células B de memória (PEREZ-ANDRES et al., 2010). Na medula óssea, essas células representam 80 a 90% das células linfóides desse sítio (incluindo todos os estágios de maturação), no linfonodo, compreendem entre 20 a 30%, no baço, entre 50 a 60% e no timo, representam menos de 1% do total de células linfóides (PARSLOW, 2004).

Os plasmablastos precoces também podem ser encontrados no sangue periférico, ainda que em pequena quantidade. No entanto, a frequência dessas células no sangue periférico pode estar aumentada caso tenha ocorrido um recrutamento das mucosas ou da medula óssea, dependendo de qual receptor de quimiocina a célula apresente. Normalmente, essas células sobrevivem por um curto período de tempo na circulação. Contudo, a sobrevivência aumenta quando as células atingem o nicho para as quais foram recrutadas, uma vez que nesses locais, as células recebem fatores de sobrevivência e condições para se diferenciarem em células plasmocitárias maduras com longa sobrevivência (JOURDAN et al., 2009).

### **3.2.5 Linfócitos T**

#### *3.2.5.1 Diferenciação e maturação*

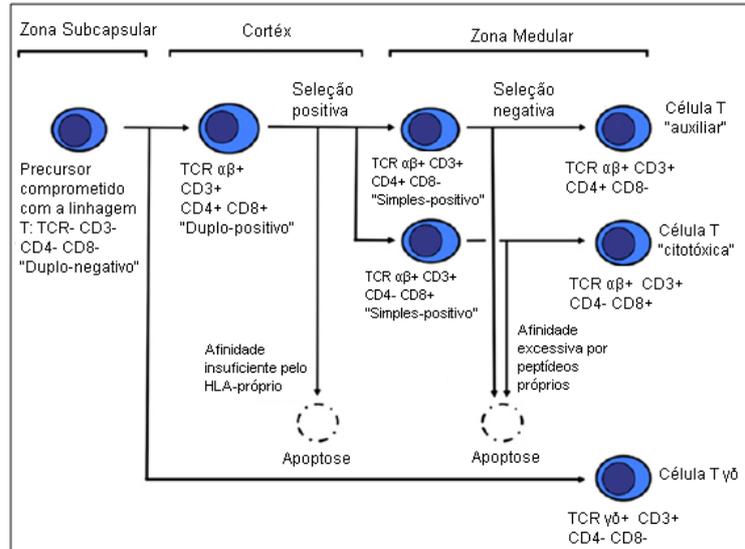
As células T desenvolvem-se a partir de um progenitor linfóide comum que abandona a medula óssea e circula pelo sangue periférico até alcançar o timo, local onde passa por processos de proliferação, seleção e diferenciação até se tornar um linfócito T maduro (PARSLOW, 2004; CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; BONILLA; OETTGEN, 2010). Essas células T que residem no

timo são denominadas timócitos (PARSLOW, 2004). Ao chegar à região subcapsular do timo, o progenitor linfoide comum, sob influência da IL-7, rapidamente prolifera. Essa expansão inicial é acompanhada da indução de vários fatores de transcrição, os quais induzem o comprometimento dessas células com a linhagem T e também induzem a expressão de genes essenciais para a montagem do TCR. O próximo passo envolve um processo antígeno independente, no qual uma série de rearranjos coordenados de genes somáticos leva a criação de genes funcionais que codificam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR, o que transforma essa célula em estágio pró-T, o qual é duplo-negativo para os marcadores CD4 e CD8 (BONILLA; OETTGEN, 2010). Semelhante ao que ocorre com o BCR, o TCR será formado por uma região variável (V, D e J) e outra constante (C). O rearranjo tem início com os genes da cadeia  $\beta$ , seguido da cadeia  $\alpha$  (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). O locus das cadeias  $\alpha$  possui os segmentos V e J, enquanto que o locus da cadeia  $\beta$  possui os segmentos V, D e J. As proteínas RAG1 e RAG2 medeiam um processo ordenado espacial e sequencialmente que cliva o ácido desoxirribonucleico (DNA) próximo aos segmentos V e J da cadeia  $\alpha$  e os segmentos V, D e J da cadeia  $\beta$  e, dessa forma, esses segmentos são randomicamente rearranjados e ligados ao segmento C (CHAPLIN, 2010; BONILLA; OETTGEN, 2010). Esse rearranjo no qual um segmento V, entre as diversas possibilidades, se liga a um segmento J ou a uma combinação DJ é o que gera os elementos  $V\alpha J\alpha$  e  $V\beta D\beta J\beta$ , e isso permite a geração da larga diversidade do repertório dos TCR. Apesar desse vasto repertório, cada célula T individual apresenta receptores antigênicos com uma especificidade única (CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Nesse processo de rearranjo, também há participação da enzima TdT que cataliza a adição de nucleotídeos em algumas junções VDJ, promovendo uma diversidade juncional extra (CHAPLIN, 2010; BONILLA; OETTGEN, 2010). No momento em que a cadeia  $\alpha$  é rearranjada, as células migram para a região cortical do timo, e, é nessa região que acontece a formação juncional, a geração do TCR  $\alpha\beta$  maduro e a célula é denominada pré-T (CHAPLIN, 2010). Após expressarem o TCR na membrana, essas células passam a ser duplo-positivas, pois expressam tanto CD4+ quanto CD8+ em sua superfície e passam a ser denominadas timócitos corticais (PARSLOW, 2004). No entanto, como esse processo de rearranjo do TCR não é perfeito, algumas vezes, há a geração de segmentos não funcionais e para solucionar esse problema essas células passam por um

processo de seleção positiva no timo (CHAPLIN, 2010). As células TCR  $\alpha\beta$  positivas atuam por meio do reconhecimento de antígenos processados e apresentados por moléculas do MHC presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC) (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Dessa forma, é nessa região cortical do timo que as células T testam se o TCR gerado possui afinidade suficiente para reconhecer moléculas próprias do MHC que os permita, posteriormente, reconhecer os complexos antígenos-MHC. Esse processo envolve a interação com linfócitos em desenvolvimento e células estromais especializadas do epitélio cortical. Caso as células falhem nessa seleção positiva, o processo de apoptose é desencadeado e as células morrem (CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). A seguir, devido à interação com moléculas MHC de classe I ou classe II na seleção positiva, cada timócito individualmente interrompe de forma seletiva e permanente a expressão de CD4 ou CD8, e passa a ser um timócito simples-positivo (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) (PARSLOW, 2004; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010), de forma que a célula que reconhece o MHC de classe I expressa CD8<sup>+</sup> e a que reconhece o MHC de classe II expressa CD4<sup>+</sup> (CHAPLIN 2010). Esse processo de diferenciação é extremamente complexo, visto que menos de 1% das células produzidas no timo conseguem completá-lo (PARSLOW, 2004). Assim, as células que sobreviveram à seleção positiva e que agora são simples-positivas migram para a região medular do timo, e, nessa região, entram em contato com células APC (células dendríticas e macrófagos) que apresentam antígenos próprios associados ao MHC. Os timócitos que interagem com grande afinidade com esses complexos formados por antígenos próprios, ou seja, que são autorreativos, entram em apoptose, e este processo é denominado seleção negativa. Esses processos de seleção positiva e negativa objetivam garantir que os linfócitos T sejam tolerantes aos antígenos próprios, mas que também sejam capazes de reconhecer os antígenos estranhos ao organismo que são apresentados pelo MHC próprio (BONILLA; OETTGEN, 2010; CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). A pequena porcentagem de timócitos simples-positivos que sobrevivem a todas essas etapas finalmente abandonam o timo na forma de linfócitos T maduros e migram para o sangue periférico para exercerem suas funções (PARSLOW, 2004; BONILLA; OETTGEN, 2010). Devido a todos esses processos que controlam a maturação e diferenciação dos linfócitos T no timo apenas uma pequena quantidade, cerca de 5% do

total das células que saem da medula óssea e migram para o timo, são capazes de se tornarem linfócitos T maduros (Figura 3) (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Figura 3 – Maturação das células linfoides T no timo.



Fonte: Adaptado de CHAPLIN (2010).

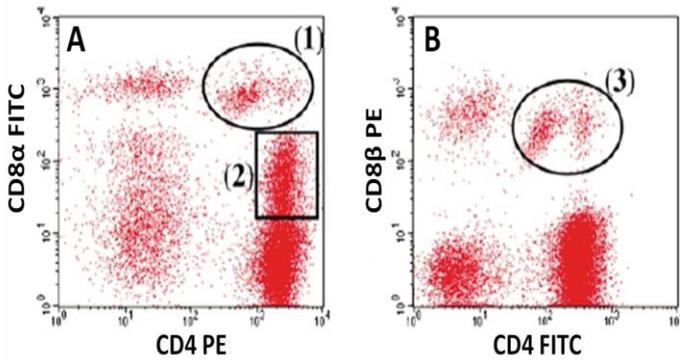
### 3.2.5.2 *Imunofenótipo*

As células que chegam ao timo no estágio pró-T são positivas apenas para CD7 e TdT. Na região subcapsular, essas células, agora pré-T, adquirem alguns marcadores, e além de expressarem CD7 e TdT também expressam CD2, CD5 e CD3 citoplasmático. Quando migram para a região cortical, essas células, denominadas timócitos corticais, expressam CD7, TdT, CD2, CD5, CD3 citoplasmático e CD1a, CD4 e CD8. Na região medular, os timócitos expressam CD2, CD3 na superfície, CD5, CD7, não expressam mais TdT e CD1a, e são simples positivos, uma vez que expressam CD4 ou CD8. O timócito periférico, por sua vez, apresenta o mesmo fenótipo do timócito medular, uma vez que, é essa célula que migra para o sangue periférico (JAFFE et al., 2008).

As células T virgens expressam CD45RA+, CD25, CD27 e CD44 com fraca intensidade e CD127 com forte intensidade. As células T efectoras expressam CD45RO+, CD25, CD27 e CD44 de forte intensidade e fraca intensidade de CD127. O fenótipo das células T de memória inclui a expressão de IL-7, de CD27, de CD45RO, de CD25 com fraca intensidade e de CD127 e CD44 com forte intensidade de expressão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Além das células T CD4+ e T CD8+ existem as células T com fenótipo duplo-positivo, ou seja, CD4+CD8+. Essas células compreendem uma população de células T efectoras pobremente caracterizadas que podem ser encontradas no sangue em pequenas quantidades (HOWE et al., 2009; CHAUHAN et al., 2012). As células duplo-positivas podem ser divididas em grupos de acordo com a intensidade de expressão das moléculas de CD4 e CD8 e de acordo com os dímeros ( $\alpha$  e/ou  $\beta$ ) expressos na molécula de CD8 (Figura 4). Assim, as populações comumente identificadas são: (1) população que expressa CD4 com fraca intensidade e CD8 $\alpha\beta$  com forte intensidade (CD4+CD8 $\alpha\beta$ +++); (2) população que expressa CD4 com forte intensidade e CD8 $\alpha$  com menor intensidade (CD4+++CD8 $\alpha$ +); (3) população com forte intensidade de ambas as moléculas (CD4+++CD8 $\alpha\beta$ +++). (PAREL; CHIZZOLINI, 2004; HOWE et al., 2009).

Figura 4 – *Dot-plot* representativo dos grupos celulares de acordo com a intensidade de expressão das moléculas CD4 e CD8 e de acordo com os dímeros ( $\alpha$  e/ou  $\beta$ ) expressos na molécula de CD8. A) Subpopulação 1 – células com forte intensidade de CD4 e com expressão forte de CD8 $\alpha$ ; Subpopulação 2 - células com expressão de CD4 com forte intensidade e expressão fraca de CD8 $\alpha$ ; B) Subpopulação 3 – células com forte expressão de CD4 e de CD8 $\beta$ .



Fonte: Adaptado de Parel e Chizzolini (2004).

### 3.2.5.3 Função

A maioria das células T (90 a 95%) possui o receptor TCR  $\alpha\beta$  (CHAPLIN, 2010) em associação com o CD3. O CD3 atua na sinalização celular após a ligação do complexo antígeno-MHC ao TCR  $\alpha\beta$  (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Por outro lado, o TCR  $\alpha\beta$  atua no reconhecimento de antígenos peptídicos apresentados pelas proteínas do complexo de MHC classe I ou II. As células TCR  $\alpha\beta$  podem ser divididas em duas subpopulações: as células T CD4<sup>+</sup> e as células T CD8<sup>+</sup>, as quais reconhecem diferentes classes de MHC (CHAPLIN, 2010).

As células T CD4<sup>+</sup> são designadas células T auxiliares (do inglês helper), reconhecem antígenos apresentados pelo MHC de classe II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) (BONILLA; OETTGEN, 2010; CHAPLIN, 2010) e atuam na ativação da resposta humoral e celular com o objetivo de eliminar os patógenos (CHAPLIN, 2010). Uma porção das células T CD4<sup>+</sup> atuam na ativação dos linfócitos B, macrófagos e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Outra porção das células T CD4+ tem um importante papel regulatório e atuam como moduladores descendentes da resposta imune. Essas células T CD4+ regulatórias (Treg) dividem-se em dois grupos. O primeiro grupo desempenha seu papel regulatório no timo e é conhecido como células Treg naturais. Essas células são caracterizadas pela expressão de CD4+ e CD25+ e pela expressão nuclear do fator de transcrição FOXP3 (*forkhead box protein 3*), o qual é essencial para o seu desenvolvimento. A maior parte de sua atividade regulatória é devido à secreção de citocinas TGF- $\beta$  e IL-10. O segundo grupo de células Treg diferencia-se na circulação periférica a partir de células T CD4+ virgens. Essas células são denominadas Treg adaptativas ou induzidas uma vez que se desenvolvem em resposta à estimulação por um antígeno específico (CHAPLIN, 2010).

Os linfócitos T CD4+ também podem ser divididos de acordo com as citocinas que secretam. Esses linfócitos são indistinguíveis morfológicamente, no entanto, devido ao padrão diferenciado de citocinas que produzem, apresentam respostas efetoras distintas (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Após um estímulo fornecido por uma célula APC ligada a um antígeno, o linfócito T CD4+ virgem, que secreta baixas quantidades de citocinas, pode se transformar, por exemplo, em Th0, Th1, Th2 Th9 ou Th17 (CHAPLIN, 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Outra população é a formada pelas células T auxiliares foliculares (TFH) que residem no baço e nos linfonodos. Essas células são atraídas para o linfonodos pelo ligante de CXCR5 produzido somente nos folículos (BONILLA; OETTGEN, 2010).

As células Th1 são essenciais para o controle de infecções por microorganismos intracelulares (protozoários, bactérias intracelulares e vírus), pois secretam IL-2, INF- $\gamma$  e linfotóxina- $\alpha$  (MACHADO et al., 2004; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; CHAPLIN, 2010). A IL-2 atua na indução da proliferação dos linfócitos T, incluindo de forma autócrina a proliferação de células CD4+, e aumenta a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8+. Por outro lado, o IFN- $\gamma$  atua na ativação de macrófagos infectados e de linfócitos T CD8+. A célula Th2 atua de forma importante na ativação da resposta humoral, pois, secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que são citocinas que favorecem a produção de anticorpos (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). As células Th2 também secretam IL-9 e IL-13 (CHAPLIN, 2010). A resposta Th2 é mais efetiva contra helmintos e bactérias extracelulares (MACHADO

et al., 2004). A IL-4 atua na troca de classe de imunoglobulina, pois induz a expressão de IgE, e, dessa forma, atua em doenças alérgicas e infecções por helmintos. Outra citocina que auxilia o combate a infecções por helmintos e atua em doenças alérgicas é a IL-5, a qual induz a produção e ativação de eosinófilos. As células Th17 atuam na eliminação da infecção por patógenos extracelulares. Essas células secretam IL-22, IL-26, as cinco citocinas da família da IL-17 (IL-17A-F) (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010) e IL-6 (CHAPLIN, 2010). As principais citocinas da família IL-17 secretadas são as citocinas pró-inflamatórias IL-17A e IL-17F, que atuam na indução da produção de IL-6 e TNF, auxiliam na infiltração celular tecidual e na produção de outras citocinas pró-inflamatórias (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; BONILLA; OETTGEN, 2010).

As células CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos apresentados por moléculas de MHC de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) (BONILLA; OETTGEN, 2010, CHAPLIN, 2010), possuem atividade citotóxica contra células infectadas por microorganismos intracelulares e contra células tumorais e, também, contém células regulatórias que bloqueiam a ativação e a função de outros linfócitos T (células T supressoras). As células T CD8<sup>+</sup> também apresentam subpopulações com secreção de diferentes citocinas e, dessa forma, são designadas células T citotóxicas tipo 1 e tipo 2 (CHAPLIN, 2010). A ativação das células T CD8<sup>+</sup> virgens para sua diferenciação em células citotóxicas efetoras e células T de memória exige o reconhecimento do antígeno e de segundos sinais fornecidos pelas células T CD4<sup>+</sup>. A característica mais marcante da diferenciação em células citotóxicas efetoras é o desenvolvimento de grânulos que contém perforinas e granzimas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Ao contrário das moléculas MHC de classe II que são expressas apenas na superfície das células APCs, as moléculas de MHC de classe I são expressas em praticamente todas as células nucleadas (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; BONILLA; OETTGEN, 2010). Assim, as células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas reconhecem as células-alvo no contexto das moléculas de MHC de classe I e destroem essas células por meio da ativação da via da apoptose mediante a rápida secreção de grânulos de perforinas e granzimas. Em paralelo, essas células também podem levar as células-alvo a morte por meio da expressão do receptor FasL (CD95) que interage com seu ligante Fas, que também desencadeia a apoptose (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; BONILLA; OETTGEN, 2010).

As células CD4+CD8+ duplo-positivas exibem propriedades funcionais como a produção de citocinas antígeno-dependente e atividade citolítica (HOWE et al., 2009). Estudos relataram que essas células podem estar em quantidades aumentadas em infecções parasitárias, síndrome mielodisplásica (CHAUHAN et al., 2012), doenças autoimunes, em algumas infecções virais agudas ou crônicas como HIV (CHAUHAN et al., 2012; PAREL; CHIZZOLINI, 2004) e em algumas neoplasias, como o linfoma de Hodgkin com predominância linfocitária nodular (RAHEMTULLAH et al., 2006).

#### *3.2.5.4 Distribuição*

No sangue periférico e nos linfonodos, as células T representam cerca de 70 a 80% do total de linfócitos (PARSLOW, 2004). Do total de células T do sangue e dos linfonodos, 60 a 70% são CD4+ e 30 a 40% são CD8+ (CHAPLIN, 2010).

No baço, essas células representam uma parcela menor, que totaliza cerca de 30 a 40% do total de linfócitos. Na medula óssea, essa quantidade chega a ser ainda menor, perfazendo um total de 5 a 10% do total de linfócitos. O local com maior quantidade de linfócitos T é o timo. Nesse órgão, essas células compreendem aproximadamente 99% do total de linfócitos (PARSLOW, 2004). No timo, cerca de 10% das células T são timócitos duplo-negativos (CD4- CD8-) e 15% são timócitos simples-positivos (CD4+ ou CD8+) as quais são quase indistinguíveis dos linfócitos T maduros encontrados no restante do organismo. Estas células T simples-positivas são mais abundantes na região medular do timo, e acredita-se que sejam linfócitos T virgens totalmente maduros que estão se preparando para abandonar o órgão e migrar para o sangue periférico. A grande maioria de células T do timo, cerca de 75%, são células duplo-positivas (CD4+ e CD8+). Essas células não são funcionais imunologicamente e representam um estágio transitório intermediário no desenvolvimento das células T. Aproximadamente 99% desses timócitos duplo-positivos entram em apoptose sem nunca terem saído do timo, devido ao processo de seleção, o qual é indispensável para a criação um sistema imunológico funcionante (PARSLOW, 2004).



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP/UFSC) com certificado sob o número 1163 (ANEXO B). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) antes da coleta da amostra biológica. Este termo de consentimento foi registrado, aprovado e monitorado pelo CEP/UFSC. Para proteger o anonimato todas as amostras foram identificadas com números.

### 4.2 SELEÇÃO DOS DOADORES E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS

Foram selecionados um total de 247 indivíduos adultos que doaram sangue no Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). A amostragem foi distribuída proporcionalmente entre caucasianos e não-caucasianos e entre homens e mulheres semelhante ao observado para a população do estado de Santa Catarina no Censo de 2010 (BRASIL, 2010). O cálculo amostral foi realizado tomando-se um nível de significância de 5% e um erro máximo de estimativa de 100 células para os antígenos T CD3+ e T CD4+, 50 células para o antígeno T CD8+ e 20 células para o antígeno CD19+. Assim, estabeleceu-se que um mínimo de 183 amostras eram necessárias para estabelecer o valor de referência dessas células na população catarinense.

Antes de realizarem a coleta da amostra de sangue periférico, os doadores foram examinados e entrevistados por um médico. No exame físico, os doadores foram avaliados quanto à temperatura corporal, peso, altura, pressão arterial, pulso e quantificação de hemoglobina capilar.

A entrevista foi realizada com o questionário (ANEXO A) que está de acordo com os parâmetros para a seleção dos doadores estabelecidos pelo Ministério da Saúde pela Portaria MS nº 1.353 de 13 de junho de 2011 e pela Resolução RDC nº 57 de 16 de dezembro de

2010. Entre outras questões, os doadores foram indagados sobre a realização de doação prévia, e, nos casos afirmativos, foi avaliado se o intervalo mínimo entre as doações foi respeitado. Também foram questionados sobre infecções durante as últimas semanas, se tomaram algum medicamento nos últimos 15 dias, se foram vacinados no último ano e se consumiram álcool nas últimas 24 horas.

A coleta das amostras de sangue periférico foi realizada no período matutino (das 8:00 às 12:00 horas) entre março de 2011 a março de 2012. As amostras utilizadas para a quantificação das populações linfocitárias por citometria de fluxo e para a contagem em analisador hematológico foram coletadas em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético/tripotássico (EDTA/K3) (Vacuette, Greiner Bio-One, Alemanha) e foram armazenadas a temperatura ambiente até o momento do processamento. Foram coletados mais dois tubos com gel separador e sem anticoagulante (Vacuette, Greiner Bio-One, Alemanha) para a realização dos testes sorológicos. Até a realização dos testes sorológicos, os tubos foram armazenados em geladeira em temperatura de 2°C a 8°C.

Os testes sorológicos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e incluíram a pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, anticorpos anti-HTLV I e II, anticorpos anti-HCV, HbsAg, anticorpos anti-HBc, teste não treponêmico de reagina plasmática rápida - RPR e a pesquisa de antígeno e anticorpos anti-HIV I e II. As metodologias e os fabricantes de cada teste sorológico podem ser visualizados no Quadro 1.

Quadro 1 – Metodologia e fabricantes dos testes sorológicos.

<b>Teste sorológico</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Fabricante</b>
anticorpos anti-Trypanosoma cruzi	ensaio imunoenzimático	Biomérieux, Argentina
anticorpos anti-HTLV I e II	ensaio imunoenzimático	Rem, Brasil
anticorpos anti-HCV	quimioluminescência	Abbott, Alemanha
HbsAg	quimioluminescência	Abbott, Irlanda
anticorpos anti-HBc	quimioluminescência	Abbott, Alemanha
reagina plasmática rápida - RPR	teste não treponêmico	Laborclin, Brasil
antígenos e anticorpos anti-HIV I e II	quimioluminescência	Abbott, Alemanha
antígenos e anticorpos anti-HIV I e II	ensaio imunoenzimático	Bio-Rad, França

#### 4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos saudáveis, não fumantes, que estavam de acordo com todos os parâmetros para a seleção de doadores de sangue estabelecidos pelo Ministério da Saúde, e que eram naturais do Estado de Santa Catarina.

#### 4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as amostras que apresentaram hemólise, coágulos e sorologia positiva para qualquer uma das infecções avaliadas. Cada indivíduo participou da pesquisa apenas uma vez, dessa forma, as amostras de indivíduos repetidos também foram excluídas.

#### 4.3 REAGENTES

Os anticorpos monoclonais utilizados no estudo eram conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoroceína (FITC), ficoeritrina (PE), complexo proteína piridina de clorofila (PerCP), ficoeritrina cianina 5.1 (PC5) ou alofocianina (APC) e todos foram titulados para a obtenção

do volume ideal para uso (concentração de saturação). Todos os anticorpos monoclonais foram provenientes do fabricante BD Biosciences, exceto o CD45 PC5 e o CD3 PC5 que foram adquiridos do fabricante Beckman Coulter (Quadro 2).

Quadro 2 – Relação de anticorpos monoclonais, clone, volume estabelecido na titulação e fabricante.

<b>Anticorpo Monoclonal</b>	<b>Clone</b>	<b>Volume</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-CD4 FITC	SK3		BD Biosciences
Anti-CD8 PE	SK1	7 µL	
Anti-CD3 PerCP	SK7		
Anti-CD45 APC	2D1	0,5 µL	BD Biosciences
Anti-CD20 FITC	L27	7 µL	BD Biosciences
Anti-CD19 PE	HIB19	7 µL	BD Biosciences
Anti-CD45 PC5	J.33	0,5 µL	Beckman Coulter
Anti-CD16 FITC	3G8	7 µL	BD Biosciences
Anti-CD56 PE	NCAM16.2	7 µL	BD Biosciences
Anti-CD3 PC5	UCHT1	0,5 µL	Beckman Coulter
Anti-TCR αβ	WT31	7 µL	BD Biosciences
Anti-TCR γδ	11F2	7 µL	BD Biosciences

O painel de anticorpos monoclonais utilizados neste estudo está apresentado no quadro abaixo. Para a análise e eliminação da autofluorescência foi utilizado um tubo sem a adição de fluorocromos (Quadro 3).

Quadro 3 – Painel de anticorpos monoclonais utilizados no estudo.

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP/PC 5</b>	<b>APC</b>
TUBO 1	Anti-CD4	Anti-CD8	Anti-CD3*	Anti-CD45
TUBO 2	Anti-CD20	Anti-CD19	Anti-CD45	-
TUBO 3	Anti-CD16	Anti-CD56	Anti-CD3	Anti-CD45
TUBO 4	Anti-TCR αβ	Anti-TCR γδ	Anti-CD3	Anti-CD45
TUBO 5	-	-	-	-

Nota: \*fluorocromo PerCP.

Além dos anticorpos monoclonais, também foi utilizada uma solução lisante de hemácias (BD FACS Lysing Solution) diluída dez vezes em água. Essa solução foi adquirida do fabricante BD Biosciences, EUA. A solução salina PBS foi diluída conforme instrução constante na bula e foi adquirida do fabricante Laborclin, Brasil.

#### 4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método multiparamétrico que avalia as características de dispersão de luz (tamanho e granulidade) e a intensidade de fluorescência de células ou partículas à medida que essas passam por um feixe de laser. A avaliação da intensidade de fluorescência é realizada por meio da ligação destas células ou partículas a anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que, quando excitados, emitem fluorescência em um comprimento de onda distinto daquele aplicado na excitação (MACEY, 2007).

Os anticorpos monoclonais foram desenvolvidos contra epítomos das partículas presentes na superfície dos leucócitos denominadas *Clusters of Differentiation* (CD). A nomenclatura dos CD's foi proposta e estabelecida na primeira Conferência e Workshop Internacional dos Antígenos de Diferenciação Leucocitários Humanos (*Human Leukocyte Differentiation Antigens* - HLDA) que ocorreu em Paris, em 1982. Atualmente, foram identificados mais de 350 CD's e muitos são utilizados largamente na área da pesquisa básica, no diagnóstico de imunodeficiências e neoplasias e, também, no monitoramento e tratamento de algumas doenças (ZU; SHAHJAHAN; CHANG, 2009).

Desde o início da sua aplicação, a citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta importante nas investigações biológicas uma vez que permite a avaliação qualitativa e quantitativa de um grande número de células e constituintes celulares. Outra vantagem dessa metodologia está relacionada ao tempo de processamento das análises, pois, a citometria de fluxo permite avaliar um grande número de células em um curto período de tempo (JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999). Além disso, é possível identificar subpopulações homogêneas dentro de populações heterogêneas (MACEY, 2007). Devido a essas e outras características, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método importante para a avaliação das células do sistema imune, pois, possibilita a detecção da presença ou da ausência de populações celulares específicas, a identificação da expressão normal ou alterada de proteínas localizadas

intra ou extracelular, a avaliação das mudanças biológicas associadas a defeitos específicos do sistema imune e, também, a avaliação de algumas características funcionais da resposta imunológica (OLIVEIRA; FLEISHER, 2010).

No presente estudo, as amostras foram processadas utilizando-se imunofenotipagem por citometria de fluxo com a técnica de plataforma dupla, na qual a contagem absoluta dos linfócitos foi obtida utilizando-se o contador hematológico Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Japão) e a contagem relativa de cada subpopulação foi obtida através da aquisição das amostras utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) com o software FACS Diva versão 6.1.2 (BD Biosciences, EUA). A análise dos dados foi feita com o software Infinicyt versão 1.6.0 (Cytognos S.L., Espanha).

Após a determinação dos valores relativos de cada subpopulação por citometria de fluxo, este valor foi multiplicado pela contagem absoluta obtida pelo contador hematológico e assim determinou-se o valor absoluto de cada subpopulação.

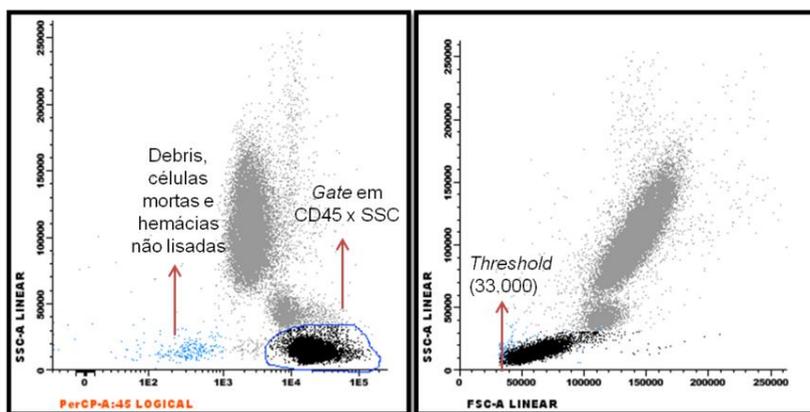
Para o processamento das amostras no citômetro de fluxo, foi adicionado aos tubos de poliestireno de 5mL (12 mm x 75mm) (BD Biosciences, EUA) contendo 100µL de sangue periférico o volume dos anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos estabelecidos na titulação prévia. A amostra com os anticorpos monoclonais foi homogeneizada em vórtex e incubada na ausência de luz e à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, adicionou-se 1 mL de solução lisante de hemácias e as amostras foram homogeneizadas e incubadas novamente na ausência de luz à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm (300g), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 500µL de solução salina PBS. A suspensão celular obtida foi adquirida no citômetro de fluxo.

Para a aquisição das amostras, fez-se um *gate* (janela) na região de linfócitos em CD45 *versus* SSC e a contagem só foi finalizada quando alcançou-se 10.000 células nessa região. A estratégia de *gate* em CD45 (e não em FSC por SSC) foi preferida por aumentar a pureza na região dos linfócitos devido à exclusão da contaminação por hemácias e restos celulares. O estudo de Hultin e colaboradores (2010) observou uma pureza superior a 98% ao realizar o *gate* em CD45 *versus* SSC, ao contrário da pureza de 85% encontrada no guia de imunofenotipagem do

*National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) que realizou o gate em FSC versus SSC.

Para que houvesse o mínimo de perda de linfócitos e que não fossem adquiridos uma grande quantidade de restos celulares, células mortas ou hemácias não lisadas, o *threshold* (ponto de corte) foi ajustado em 33.000 em FSC (Figura 5).

Figura 5 – *Dot-plot* representativo indicando a região de restos celulares e o *threshold*.



#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias com seus respectivos desvios-padrão (DP), as medianas, os valores máximos e mínimos, os percentis 2,5% e 97,5%, o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), o coeficiente de correlação intraclasses, os testes de comparação das médias entre os gêneros (Mann-Whitney para dados não paramétricos e teste T Student independente para dados paramétricos) foram calculados utilizando-se o programa SPSS - *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS software, versão 17.0, EUA). Os intervalos de referência das variáveis foram estabelecidos utilizando-se as médias  $\pm$  2DP para dados paramétricos e os percentis 2,5% e 97,5% para dados não paramétricos.

O teste de Bland-Altman foi realizado utilizando-se o programa MedCalc (versão 12.0.3.0, Bélgica).

Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de “p” foi inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) e de acordo com Bland & Altman (1990), a correlação foi considerada excelente quando  $r > 0,75$ , moderada quando o r estava entre 0,75 e 0,40 e baixa quando  $r < 0,40$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram coletadas 247 amostras de sangue periférico das quais uma foi excluída pela presença de coágulos, quatro foram excluídas devido a sorologias positivas (HIV+ e RPR+ diluição 1/64; HBc+; HCV+; e HbsAg+ e HBc+) e outras quatro foram excluídas por serem doadores de repetição. Dessa forma, foram incluídas no estudo 238 amostras das quais 56,3% (n = 134) eram do gênero masculino e 43,7% (n = 104), do gênero feminino. A idade média  $\pm$  desvio-padrão (DP) da amostragem total foi de  $27,3 \pm 9,3$  anos, com mediana de 24 e valor mínimo e máximo de 16 e 56 anos, respectivamente. Com relação aos gêneros, a idade média  $\pm$  DP do feminino foi de  $25,9 \pm 8,5$ , com mediana de 23 anos e valor mínimo e máximo de 16 e 53, respectivamente. Para o gênero masculino, a idade média  $\pm$  DP foi de  $28,4 \pm 9,8$ , com mediana de 24,5 anos e valor mínimo e máximo de 18 e 56, respectivamente. Do total de indivíduos avaliados, 57,1% (n = 136), eram estudantes. A segunda profissão mais frequente foi professor (4,6%; n = 11), seguida de servidor público (2,5%; n = 6). Foram identificadas outras 50 profissões perfazendo-se um total de 35,8% (n = 85).

Com relação à raça, 97,9% (n = 233) eram brancos e 2,1% (n = 5), negros. Ao avaliar a naturalidade, foram observados doadores provenientes de 68 municípios. O município com maior número de doadores foi Florianópolis (36,6%; n = 87), seguido de São José (8,4%; n = 20). Os demais municípios (n = 66) corresponderam a 55% (n = 131) dos doadores. De acordo com a Secretaria de Estado da Saúde, o Estado de Santa Catarina é dividido em 9 macrorregiões de saúde. A distribuição dos doadores nessas macrorregiões de saúde está representada na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos doadores nas macrorregiões de saúde do Estado de Santa Catarina.

<b>Macrorregião de saúde</b>	<b>%</b>	<b>n</b>
Macrorregião da Grande Florianópolis	54,2	129
Macrorregião do Sul	10,9	26
Macrorregião do Extremo Oeste	10,9	26
Macrorregião do Meio Oeste	5,5	13
Macrorregião do Vale do Itajaí	5,5	13
Macrorregião do Planalto Serrano	5,0	12
Macrorregião do Planalto Norte	2,9	7
Macrorregião da Foz do Rio Itajaí	2,5	6
Macrorregião do Nordeste	2,5	6

## 5.2 VALIDAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE

### 5.2.1 Citômetro de fluxo

A calibração do equipamento FACSCanto II foi realizada diariamente utilizando-se o sistema de partículas do reagente CS&T - *Cytometer Setup and Tracking Beads* (BD Biosciences, EUA), que tem como função otimizar as voltagens e permitir que o software caracterize automaticamente e relate as medidas do citômetro. Outro sistema de partículas utilizado diariamente foi o *FACS 7-Color Setup Beads* (BD Biosciences, EUA) o qual tem a função de promover a compensação automática de sete fluorocromos através da correção da sobreposição dos espectros de emissão e de ajustar as voltagens dos lasers para garantir que a fluorescência para as células marcadas fosse detectada de maneira correta em cada detector.

A metodologia para obtenção dos valores relativos das populações linfocitárias foi realizada pela técnica de plataforma dupla no citômetro FACSCanto II. Esse citômetro participa de ensaios de proficiência assegurados por programas de controle de qualidade, no entanto, para a certificação de que os resultados obtidos por essa

metodologia eram exatos, testou-se a reprodutibilidade de 20 amostras de sangue periférico de indivíduos adultos infectados pelo vírus HIV com os valores relativos e absolutos de CD3, CD4 e CD8 já estabelecidos pela técnica de plataforma única no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), o qual também possui controle de qualidade externo assegurado pelos ensaios de proficiência do Ministério da Saúde.

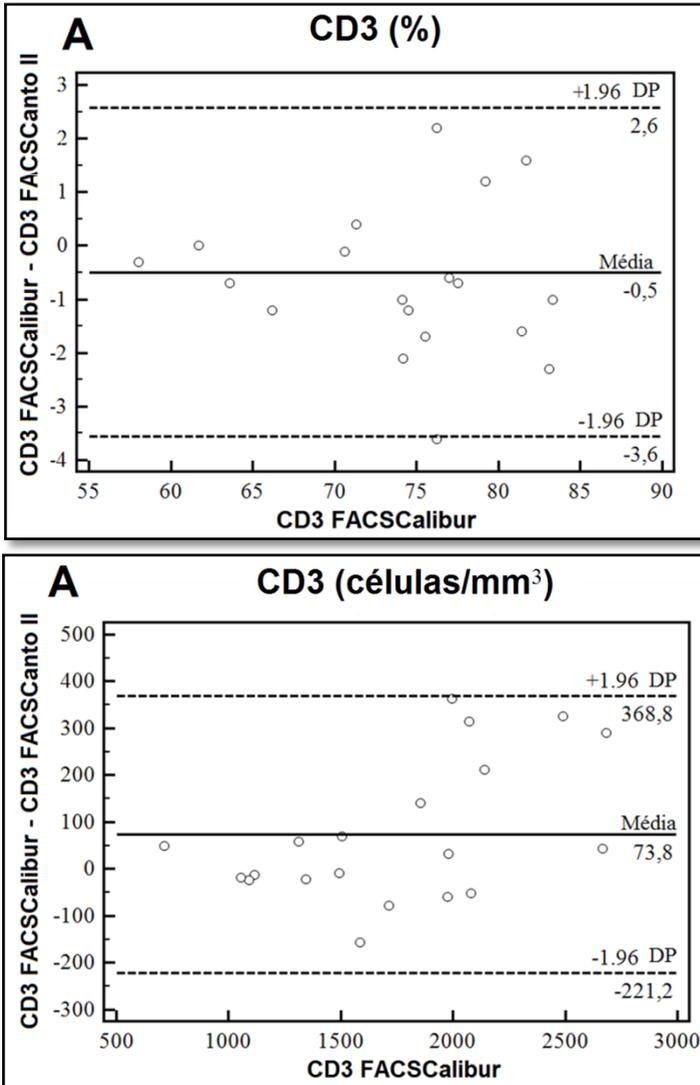
As amostras foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD4 (clone SK3), anti-CD8 (clone SK1), anti-CD3 (clone SK7) e anti-CD45 (clone 2D1) e adquiridas utilizando-se os citômetros de fluxo FACSCalibur e FACSCanto II. A existência de correlação entre os dados obtidos nos dois equipamentos foi testada utilizando-se o coeficiente de correlação intraclasse e o teste de Bland-Altman. O coeficiente de correlação intraclasse ( $r$ ) dos marcadores CD3, CD4 e CD8 entre os dois equipamentos variou de 0,948 a 0,996 (Tabela 2) e essa correlação foi estatisticamente significativa entre os dois métodos ( $p < 0,0001$ ) para todas as variáveis.

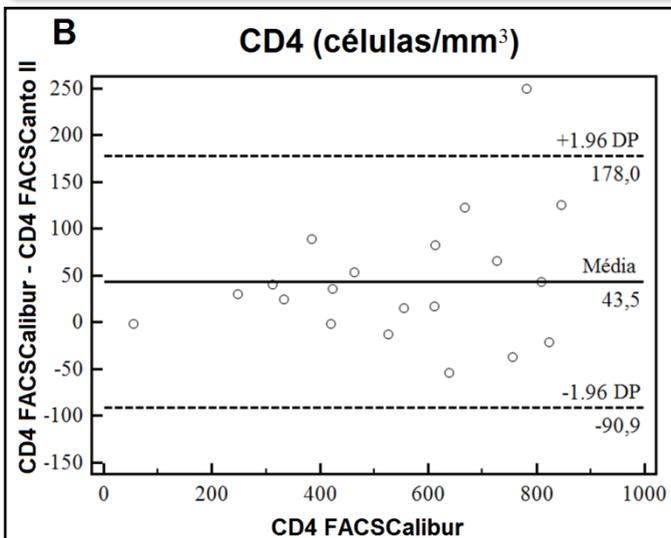
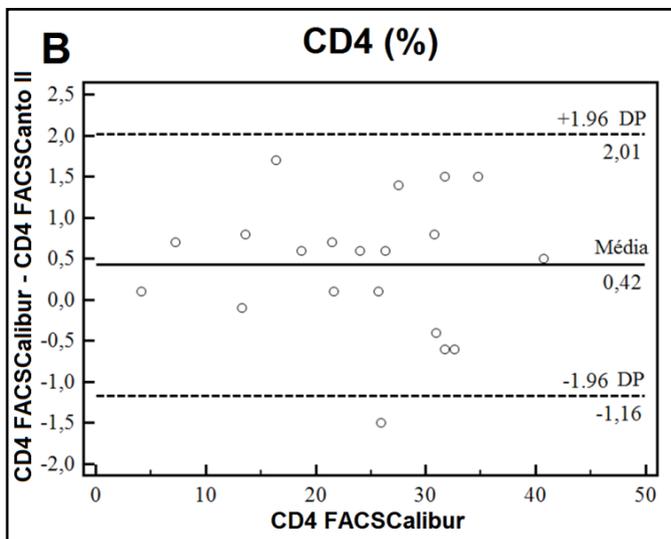
Tabela 2 – Coeficiente de correlação intraclasse ( $r$ ) dos marcadores CD3, CD4 e CD8 entre os citômetros de fluxo FACSCalibur e FACSCanto II.

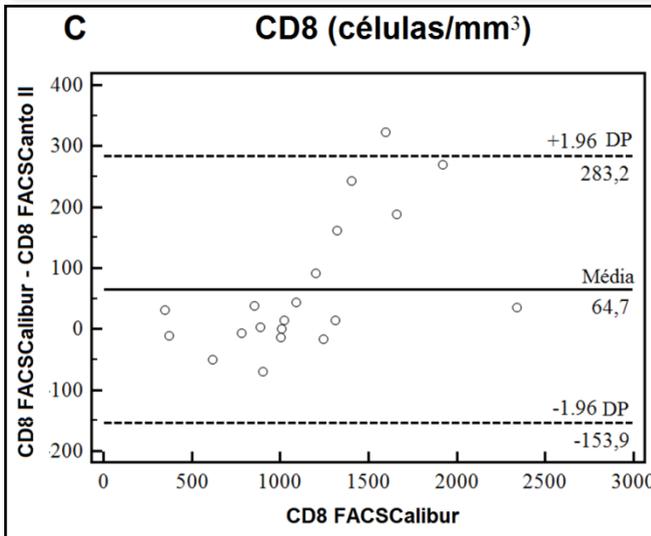
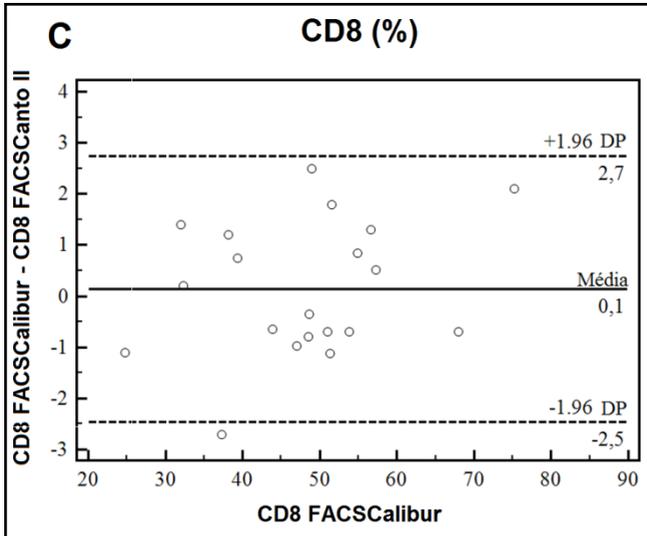
<b>Marcador</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
CD3/mm <sup>3</sup>	0,958	< 0,0001
CD3%	0,979	< 0,0001
CD4/mm <sup>3</sup>	0,948	< 0,0001
CD4%	0,996	< 0,0001
CD8/mm <sup>3</sup>	0,971	< 0,0001
CD8%	0,994	< 0,0001

Os métodos também foram avaliados pelo teste de Bland-Altman (Figura 6).

Figura 6 – Avaliação da reprodutibilidade de das células T CD3+ (A), T CD4+ (B) e T CD8+ (C) por meio do teste de Bland-Altman.





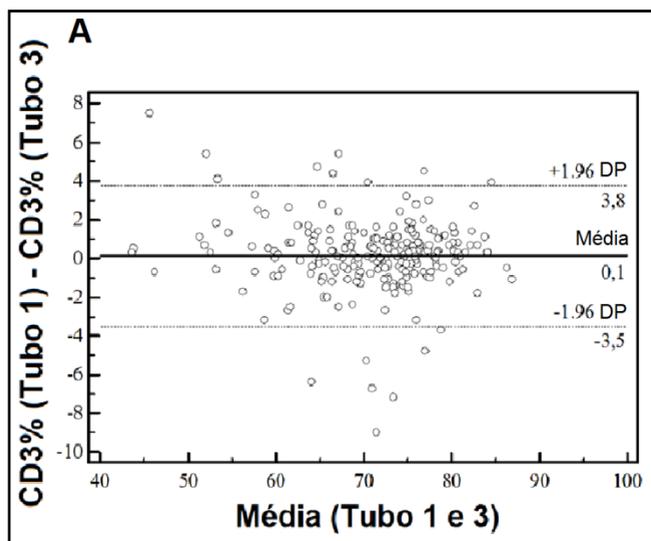


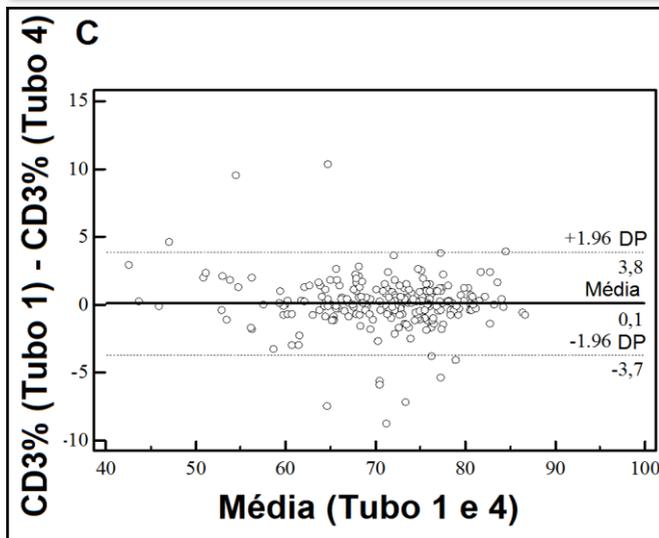
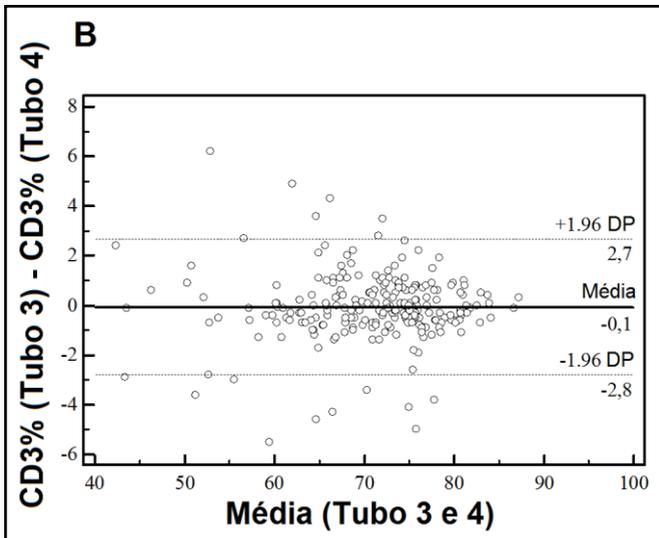
A consistência da contagem relativa do marcador CD3 foi utilizada como controle interno da qualidade e foi avaliada por meio da comparação entre os três tubos que continham esse marcador: Tubo 1 anti-CD4/ anti-CD8/ anti-CD3/ anti-CD45; Tubo 3 anti-CD16/ anti-

CD56/ anti-CD3/ anti-CD45 e Tubo 4 anti-TCR  $\alpha\beta$ / anti-TCR  $\gamma\delta$ / anti-CD3/ anti-CD45. A média dos valores relativos do marcador CD3 nos encontrada no Tubo 1 foi 71,0%, nos Tubo 2 e 3 70,9%.

Além da comparação das médias, foi utilizado o coeficiente de correlação intraclass e o teste de Bland-Altman (Figura 7). O coeficiente de correlação intraclass encontrado foi de 0,969 e o valor de p obtido ( $p < 0,0001$ ) indicando que há correlação estatisticamente significativa entre os três tubos contendo o anticorpo anti-CD3. O teste de Bland-Altman mostrou que a variação média entre os tubos foi de 0,1%.

Figura 7 – Avaliação da consistência do marcador CD3 pelo método de Bland-Altman. A) Comparação entre o Tubo 1 e o Tubo 3. B) Comparação entre o Tubo 3 e o Tubo 4. C) Comparação entre o Tubo 1 e o Tubo 4





Outra forma de avaliar a reprodutibilidade e de controle interno foi o somatório das células T CD4+, T CD8+ e TCR  $\gamma\delta$  as quais, caso não tenha ocorrido nenhum erro no momento da análise, devem ser semelhantes ao valor total das células CD3+. A média  $\pm$  DP e a mediana

dessa comparação podem ser visualizadas na Tabela 3. O coeficiente de correlação intraclasse encontrado foi de 0,949 ( $p < 0,0001$ ). A diferença média obtida entre os valores foi de 0,1%.

Tabela 3 – Valores obtidos na comparação entre as células T CD3+ e no somatório das células CD4+, CD8+ e TCR  $\gamma\delta$ .

	<b>CD3</b>	<b>CD4+CD8+TCR <math>\gamma\delta</math></b>
	<b>%</b>	<b>%</b>
Média $\pm$ DP	70,9 $\pm$ 7,9	71,0 $\pm$ 8,1
Mediana	72,5	72,2

Legenda: DP: desvio-padrão.

Uma vez que as células TCR  $\alpha\beta$ + compreendem as células T CD4+, T CD8+, iNKT CD4+ e iNKT CD8+; avaliou-se se a contagem de células CD4+ e CD8+ corresponde às células marcadas com o anticorpo específico anti-TCR  $\alpha\beta$ . Os resultados da média  $\pm$  DP e mediana das células marcadas com anti-TCR  $\alpha\beta$  e o somatório das células CD4+ e CD8+ podem ser visualizadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores obtidos na comparação entre as células TCR  $\alpha\beta$ + e CD4+ e CD8+.

	<b>TCR <math>\alpha\beta</math>+</b>	<b>CD4+ e CD8+</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>
Média $\pm$ DP	65,3 $\pm$ 8,0	65,8 $\pm$ 7,8
Mediana	66,9	67,1

Legenda: DP: desvio-padrão.

O coeficiente de correlação intraclasse encontrado entre o somatório das células CD4+ e CD8+ com as células TCR  $\alpha\beta$ + foi 0,921 ( $p < 0,0001$ ). A variação média encontrada foi de 0,5%.

Outro parâmetro avaliado foi o somatório total dos linfócitos por meio da soma dos linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD19+) e células NK (CD16+CD56+CD3). O valor médio  $\pm$  DP do somatório foi 95,0  $\pm$  2,9% e a mediana foi 95,8%.

A presença de autofluorescência foi avaliada por meio de um tubo contendo células não marcadas com anticorpos monoclonais, mas que passaram pelo mesmo método de preparação que as células

marcadas. De acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS (1998) a autofluorescência das células não marcadas é causada por pirimidinas e nucleotídeos de flavina e este controle é importante para identificar interferências de fatores não relacionados aos anticorpos como, por exemplo, medicamentos que podem afetar a autofluorescência celular.

### 5.2.2 Contador hematológico

Realizou-se, diariamente, a checagem do contador hematológico com o reagente e-CHECK (Sysmex Coporation, Japão) que consiste em eritrócitos, leucócitos e plaquetas humanas estabilizadas em três níveis de concentração em cada parâmetro. Além disso, os resultados do contador hematológico Sysmex XE-2100D são assegurados por avaliação de ensaios de proficiência externos.

No entanto, devido ao fato da metodologia utilizada para a obtenção dos valores absolutos das populações linfocitárias ter sido a técnica de plataforma dupla, decidiu-se avaliar se os resultados obtidos do contador hematológico Sysmex XE-2100D eram exatos. Para isso, foi testada a reprodutibilidade de 50 amostras de sangue periférico por meio da contagem absoluta de leucócitos e a contagem absoluta e relativa de linfócitos nos equipamentos Sysmex XE-2100D e Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japão). Vale ressaltar que os resultados do equipamento Sysmex XS-1000i também são assegurados por ensaios de proficiência externos.

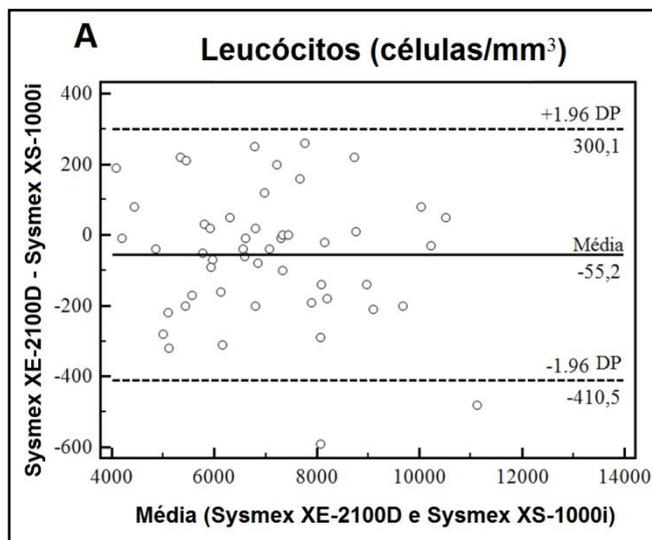
O coeficiente de correlação intraclasse ( $r$ ) entre os tipos celulares nos dois equipamentos variou de 0,988 a 0,994 (Tabela 5), o que indica uma excelente correlação entre os dois contadores hematológicos. O coeficiente de correlação intraclasse mostrou que há correlação estatisticamente significativa entre os dois equipamentos para todas as variáveis ( $p < 0,0001$ ).

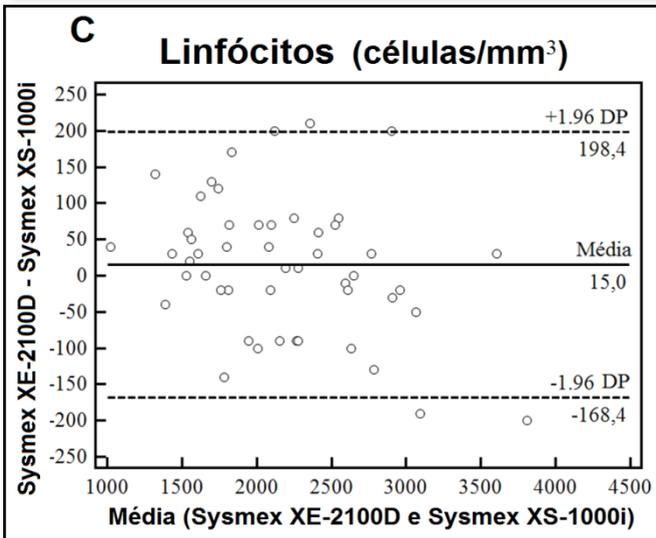
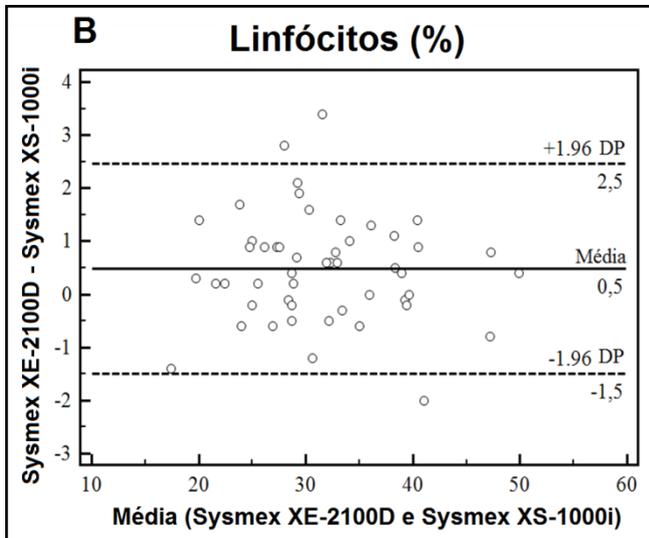
Tabela 5 – Coeficiente de correlação intraclassa ( $r$ ) entre os tipos celulares nos dois contadores hematológicos.

Tipo celular	$r$	P
Leucócitos ( $\text{mm}^3$ )	0,994	< 0,0001
Linfócitos (%)	0,988	< 0,0001
Linfócitos ( $\text{mm}^3$ )	0,990	< 0,0001

Os métodos também foram avaliados pelo teste de Bland-Altman, que mostrou que a maioria dos pontos estavam distribuídos randomicamente em torno da média nos dois equipamentos e um número pequeno de pontos estavam fora de um desvio padrão (Figura 8).

Figura 8 – Avaliação da reprodutibilidade dos leucócitos e dos linfócitos pelo método de Bland-Altman. A) Avaliação da reprodutibilidade dos leucócitos. B) Avaliação da reprodutibilidade da contagem relativa dos linfócitos. C)





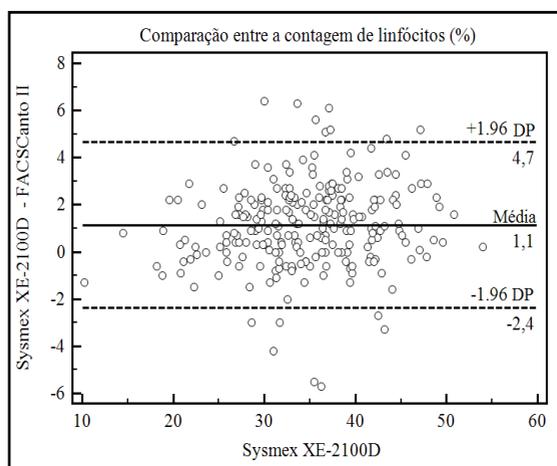
### 5.2.3 Concordância entre o citômetro e o contador hematológico

Com o objetivo de verificar a concordância entre as medidas obtidas pelo citômetro de fluxo e pelo contador hematológico comparou-se a contagem relativa de linfócitos nas 238 amostras nos dois equipamentos.

O valor de linfócitos foi obtido no citômetro de fluxo por meio de um *gate* em CD45 *versus* SSC. Devido ao fato de todos os tubos terem o marcador CD45 em comum, realizou-se a média desses valores. O valor médio obtido foi comparado com o valor relativo de linfócitos obtido no contador hematológico e o coeficiente de correlação intraclassa foi de 0,960 o que indica uma excelente correlação entre os dois equipamentos. A correlação intraclassa foi igual a 0,960 e mostrou que há correlação estatisticamente significativa entre os dois equipamentos para todas as variáveis ( $p < 0,0001$ ).

A contagem relativa de linfócitos também foi avaliada pelo teste de Bland-Altman, que mostrou que a maioria dos pontos estavam distribuídos randomicamente em torno da média nos dois equipamentos e um número pequeno de pontos estavam fora de um desvio padrão (Figura 9).

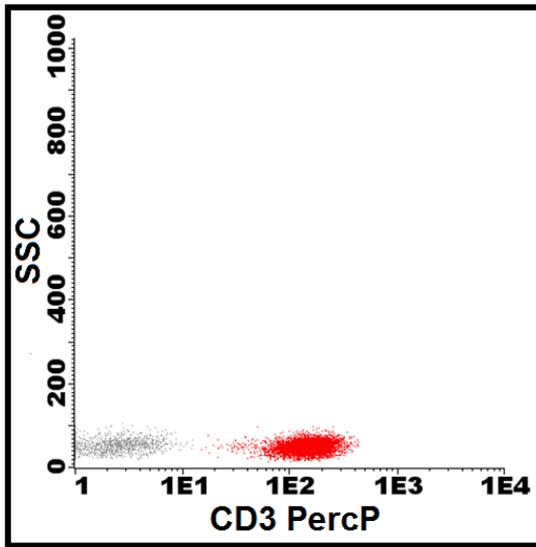
Figura 9 – Comparação da contagem relativa dos linfócitos entre o contador hematológico e o citômetro de fluxo.



### 5.3 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS T CD3+

Os linfócitos T foram avaliados por meio da positividade para o marcador pan-T CD3+ (Figura 10).

Figura 10 – *Dot-plot* representativo da positividade para o marcador CD3(em vermelho) para a identificação dos linfócitos T.



O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos T CD3+ encontrado na população em estudo foi de 72,5%, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 51,3% e 83,5%. Com relação ao valor absoluto, a mediana foi de 1557 células/mm<sup>3</sup> e o intervalo de referência estabelecido foi entre 718 células/mm<sup>3</sup> e 2494 células/mm<sup>3</sup>. Os demais valores referentes aos linfócitos T CD3+ podem ser visualizados na Tabela 6.

Os dados da contagem dos linfócitos T CD3+ relativos (distribuição não paramétrica) foram avaliados por meio do teste de Mann-Whitney e o valor absoluto (distribuição paramétrica) foi avaliado pelo teste t de Student independente. Na avaliação das contagens de linfócitos T CD3+ quanto ao gênero, houve diferenças estatisticamente

significativas ( $p < 0,0001$ ), tanto para os valores relativos quanto para os absolutos. O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos CD3+ para o gênero masculino foi de 68,8% e o intervalo de referência estabelecido foi entre 48,0% e 82,6%; e para o gênero feminino, a mediana foi de 73,8% e o intervalo de referência estabelecido foi entre 56,8% e 84,1%. Com relação ao valor absoluto de CD3+, a mediana para o gênero masculino foi de 1503 células/mm<sup>3</sup> e o intervalo de referência estabelecido foi entre 735 células/mm<sup>3</sup> a 2271 células/mm<sup>3</sup> e a mediana para o gênero feminino foi de 1740 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 1259 células/mm<sup>3</sup> a 2702 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos T CD3+.

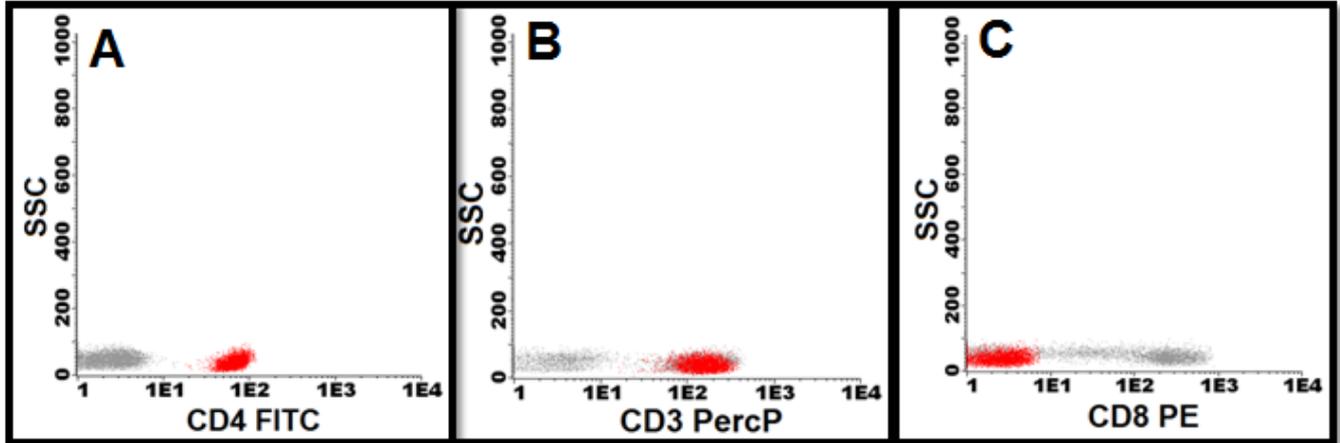
	CD3+					
	%	mm <sup>3</sup>	M (%)	M (mm <sup>3</sup> )	F (%)	F (mm <sup>3</sup> )
Média	70,9	1606	68,8	1503	73,7	1740
$\pm$ DP	$\pm$ 7,9	$\pm$ 444	$\pm$ 8,0	$\pm$ 384	$\pm$ 6,7	$\pm$ 481
Mediana	72,5	1557	70,8	1463	75,1	1662
Mínimo	43,0	744	43,6	744	43,0	920
Máximo	86,9	4126	86,9	2468	86,5	4126
Intervalo de referência	51,3	718	48,0	735	56,8	1259
	83,5	2494	82,6	2271	84,1	2702

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS T CD4+

Os linfócitos T auxiliares foram avaliados por meio da positividade para os marcadores CD3+ e CD4+ e pela negatividade para o antígeno CD8 (Figura 11).

Figura 11 – Linfócitos T CD4+. A) positividade para o marcador CD4+ (em vermelho); B) positividade para o marcador CD3+ (em vermelho); C) negatividade para CD8 (em vermelho).



O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos T CD4+ encontrado na população estudada foi de 39,5%, com intervalo de referência de 24,4% a 54,2%. A mediana do valor absoluto foi de 844 células/mm<sup>3</sup> com intervalo de referência de 456 a 1492 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 7.

A comparação entre gêneros da contagem de linfócitos T CD4+ relativa (distribuição paramétrica) foi avaliada por meio do teste t de Student independente e o valor absoluto (distribuição não paramétrica) foi avaliado pelo teste de Mann-Whitney. As contagens de linfócitos T CD4+ foram avaliadas quanto ao gênero e apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) tanto para valores relativos quanto para absolutos. O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos T CD4+ para o gênero masculino foi de 37,8%, com intervalo de referência de 23,0% a % e 52,6%; e para o gênero feminino encontrou-se a mediana de 40,7% com intervalo de referência de 26,9% a 55,5%. Com relação ao valor absoluto de CD4+, a mediana para o gênero masculino foi de 778 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 427 células/mm<sup>3</sup> a 1372 células/mm<sup>3</sup>; e a mediana para o gênero feminino foi de 922 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 538 células/mm<sup>3</sup> a 1850 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos T CD3+ CD4+ CD8-.

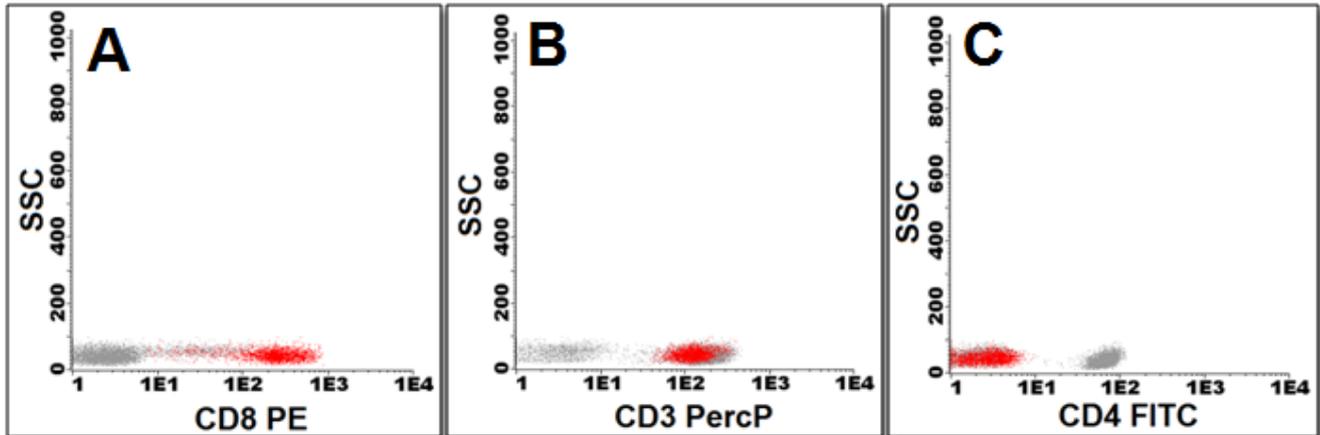
	CD3+ CD4+ CD8-					
	%	mm <sup>3</sup>	M (%)	M (mm <sup>3</sup> )	F (%)	F (mm <sup>3</sup> )
Média	39,3	888	37,8	824	41,2	969
$\pm$ DP	$\pm 7,47$	$\pm 285$	$\pm 7,42$	$\pm 247$	$\pm 7,14$	$\pm 310$
Mediana	39,5	844	37,8	778	40,7	922
Mínimo	20,1	335	20,1	335	24,9	519
Máximo	60,6	2657	58,2	1513	60,6	2657
Intervalo de referência	24,4	456	23,0	427	26,9	538
	54,2	1492	52,6	1372	55,5	1850

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

### 5.5 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS T CD8+

Os linfócitos T citotóxicos foram avaliados por meio da positividade para os marcadores CD3+ e CD8+ e pela negatividade para o antígeno CD4 (Figura 12).

Figura 12 – Linfócitos T CD8+. A) positividade para o marcador CD8+ (em vermelho); B) positividade para o marcador CD3+ (em vermelho); C) negatividade para CD4 (em vermelho).



O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos CD8+ encontrado na população estudada foi de 26,5%, com intervalo de referência de 14,0% a 42,9%. A mediana do valor absoluto foi de 555 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 272 células/mm<sup>3</sup> e 1144 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 8.

A comparação entre os gêneros da contagem de CD8+ relativa (distribuição paramétrica) foi avaliada por meio do teste t de Student independente e o valor absoluto (distribuição não paramétrica) foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. Na avaliação das contagens de linfócitos T CD8+ quanto ao gênero, houve diferenças estatisticamente significativas para o valor absoluto ( $p = 0,013$ ), enquanto que não houve diferença com relação ao valor relativo ( $p = 0,100$ ). No gênero masculino a mediana do valor absoluto foi de 535 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 243 células/mm<sup>3</sup> e 1068 células/mm<sup>3</sup>; e a mediana para o gênero feminino foi de 580 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 291 células/mm<sup>3</sup> a 1238 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos T CD3+ CD8+ CD4-.

	CD3+ CD8+ CD4-					
	%	mm <sup>3</sup>	M (%)	M (mm <sup>3</sup> )	F (%)	F (mm <sup>3</sup> )
Média $\pm$	26,5 $\pm$	602 $\pm$	25,9 $\pm$	565 $\pm$	27,4 $\pm$	649 $\pm$
DP	6,84	230	6,65	202	7,03	254
Mediana	26,5	555	25,1	535	27,2	580
Mínimo	7,8	214	10,7	214	7,8	265
Máximo	48,6	1723	48,6	1230	45,6	1723
Intervalo de referência	12,8	272	12,6	243	13,3	291
	40,2	1144	39,2	1068	41,5	1238

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO T CD4+/T CD8+

O valor da mediana da relação T CD4+/ T CD8+ encontrado na população estudada foi de 1,52, com intervalo de referência de 0,68 a 3,61. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 9.

A relação T CD4+/ T CD8+ (distribuição não paramétrica) foi avaliada quanto ao gênero pelo teste de Mann-Whitney no qual não foi observado diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,547$ ). Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores obtidos na avaliação da relação T CD4+/T CD8+

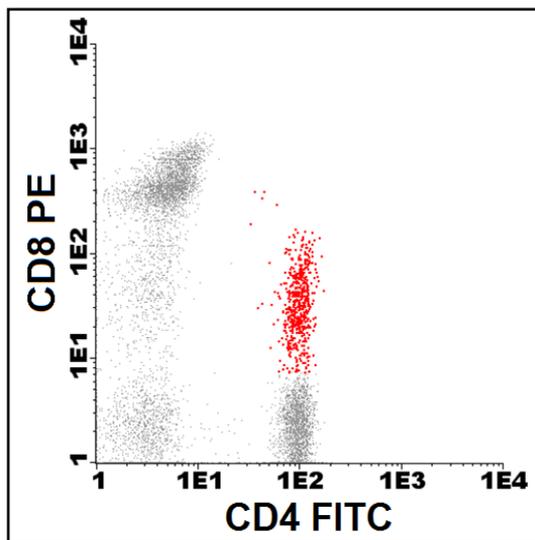
	CD4/CD8		
		M	F
Média $\pm$ DP	1,6 $\pm$ 0,7	1,59 $\pm$ 0,6	1,68 $\pm$ 0,84
Mediana	1,52	1,5	1,53
Mínimo	0,51	0,51	0,55
Máximo	7,4	4,56	7,4
Intervalo de referência	0,68 3,61	0,69 3,58	0,61 3,79

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO CD4+CD8+

A população duplo-positiva foi avaliada pela expressão de CD3+ e co-expressão dos marcadores CD4+ e CD8+ (Figura 13).

Figura 13 – *Dot-plot* representativo da co-expressão dos marcadores CD4+ e CD8+.



O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos duplo-positivos CD4+CD8+ encontrado na população estudada foi de 0,5%, com intervalo de referência de 0,01% a 3,60%. A mediana do valor absoluto foi de 12 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 2 células/mm<sup>3</sup> e 88 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 10.

As contagens das células CD4+CD8+ relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, houve diferenças estatisticamente significativas para o valor relativo ( $p = 0,038$ ) e para o valor absoluto ( $p = 0,009$ ).

O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos duplo-positivos CD4+CD8+ para o gênero masculino foi 0,5%, com intervalo de referência de 0,06% a 3,40%. A mediana do valor absoluto foi de 87 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 2 células/mm<sup>3</sup> e 86 células/mm<sup>3</sup>. Com relação ao gênero feminino, a mediana do valor relativo foi 0,6% com intervalo de referência de 0,1% a 4,1%. A mediana do valor absoluto foi de 13 células/mm<sup>3</sup>, e o

intervalo de referência estabelecido foi entre 3 células/mm<sup>3</sup> e 89 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média ± DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores obtidos na avaliação da população CD4+CD8+.

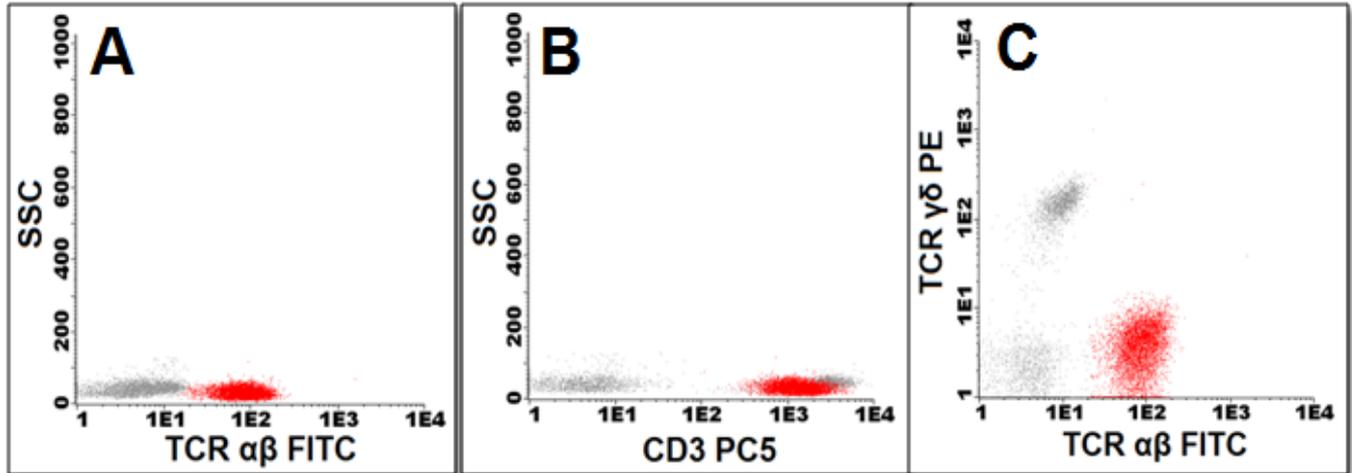
	CD4+CD8+					
	%	mm <sup>3</sup>	M %	M mm <sup>3</sup>	F %	F mm <sup>3</sup>
Média ±	0,78 ±	18 ±	0,73 ±	110 ±	0,85 ±	20 ±
DP	0,84	20	0,83	94	0,85	20
Mediana	0,5	12	0,5	10	0,6	13
Mínimo	0,02	0	0,02	11	0,09	1
Máximo	5,8	139	5,8	738	5,1	103
Intervalo de referência	0,01	2	0,06	2	0,1	3
	3,6	88	3,4	86	4,1	89

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS TCR αβ+

As células positivas para o receptor de células T tipo αβ foram avaliadas por meio da positividade para o TCR αβ+ e para o marcador pan-T CD3+ e pela ausência de expressão do TCR γδ (Figura 14).

Figura 14 – Células positivas para o receptor TCR  $\alpha\beta$ . A) *Dot-plot* representativo da positividade para o TCR  $\alpha\beta$  (em vermelho); B) positividade para o marcador CD3 (em vermelho); C) positividade para TCR  $\alpha\beta$  (em vermelho) e negatividade para o TCR  $\gamma\delta$ .



O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos TCR  $\alpha\beta^+$  encontrado na população estudada foi de 66,9%, com intervalo de referência de 44,3% a 77,0%. A mediana do valor absoluto foi de 1420 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 855 células/mm<sup>3</sup> e 2384 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 11.

As contagens das células TCR  $\alpha\beta^+$  relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, houve diferenças estatisticamente significativas tanto para valores relativos quanto para valores absolutos ( $p < 0,0001$ ).

O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos TCR  $\alpha\beta^+$  para o gênero masculino foi 63,5%, com intervalo de referência de 43,5% a 76,2%. A mediana do valor absoluto foi de 1290 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 756 células/mm<sup>3</sup> e 2056 células/mm<sup>3</sup>. Com relação ao gênero feminino, a mediana do valor relativo foi 69,3% com intervalo de referência de 51,8% a 78,2%. A mediana do valor absoluto foi de 1560 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 975 células/mm<sup>3</sup> e 2673 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores obtidos na avaliação da contagem das células TCR  $\alpha\beta^+$ .

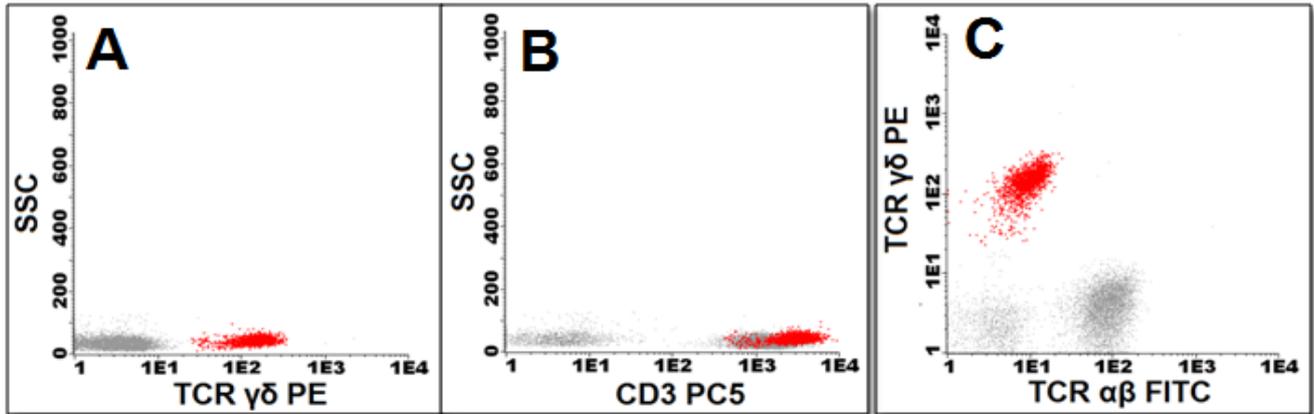
	TCR $\alpha\beta^+$					
	%	mm <sup>3</sup>	M %	M mm <sup>3</sup>	F %	F mm <sup>3</sup>
Média $\pm$ DP	65,3 $\pm$ 8,0	1476 $\pm$ 417	62,8 $\pm$ 8,2	1371 $\pm$ 351	68,3 $\pm$ 6,6	1612 $\pm$ 457
Mediana	66,9	1420	63,5	1290	69,3	1560
Mínimo	39,3	640	41,8	640	39,3	856
Máximo	82,7	3975	78,9	2284	82,7	3975
Intervalo de referência	44,3 - 77,0	855 - 2384	43,5 - 76,2	756 - 2056	51,8 - 78,2	975 - 2673

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

### 5.9 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS TCR $\gamma\delta$ +

As células positivas para o receptor de células T tipo  $\gamma\delta$  foram avaliadas por meio da positividade para o TCR  $\gamma\delta$  e para o marcador pan-T CD3+ e pela ausência de expressão do TCR  $\alpha\beta$  (Figura 15).

Figura 15 – Células positivas para o receptor TCR  $\gamma\delta$ . A) *Dot-plot* representativo da positividade para o TCR  $\gamma\delta$  (em vermelho); B) positividade para o marcador CD3+(em vermelho); C) positividade para TCR  $\gamma\delta$  (em vermelho) e negatividade para o TCR  $\alpha\beta$



O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos TCR  $\gamma\delta^+$  encontrado na população estudada foi de 4,4%, com intervalo de referência de 0,99% a 15,9%. A mediana do valor absoluto foi de 94 células/mm<sup>3</sup>, e o intervalo de referência estabelecido foi entre 19 células/mm<sup>3</sup> e 345 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 12.

As contagens das células TCR  $\gamma\delta^+$  relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, não houve diferenças estatisticamente significativas tanto para valores relativos quanto para valores absolutos ( $p = 0,906$  e  $p = 0,405$ , respectivamente). Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 12.

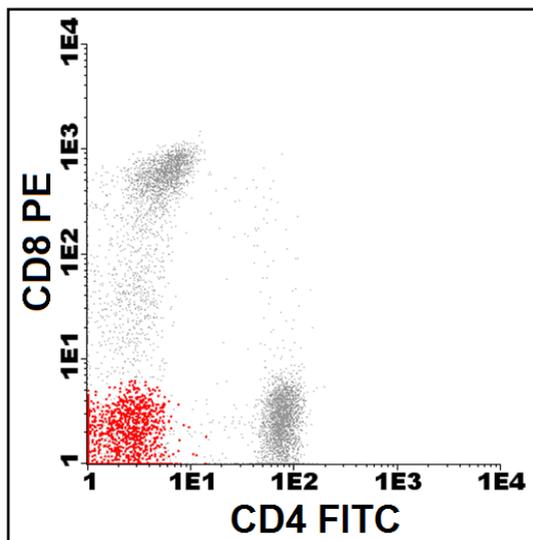
Tabela 12 – Valores obtidos na avaliação da contagem das células TCR  $\gamma\delta^+$ .

	TCR $\gamma\delta^+$					
	%	mm <sup>3</sup>	M %	M mm <sup>3</sup>	F %	F mm <sup>3</sup>
Média $\pm$ DP	5,2 $\pm$ 3,44	118 $\pm$ 87	5,3 $\pm$ 3,7	118 $\pm$ 93	5,1 $\pm$ 3,1	120 $\pm$ 78
Mediana	4,4	94	4,3	91	4,6	96
Mínimo	0,5	9	0,5	9	0,7	17
Máximo	18,8	646	17,9	646	18,8	442
Intervalo de referência	0,99 - 15,9	19 - 345	0,85 - 16,6	17 - 355	0,92 - 14,6	21 - 349

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

Devido ao fato das células que possuem o TCR  $\gamma\delta$  serem predominantemente as células CD3+ CD4- CD8- duplo-negativas (Figura 16) avaliou-se a quantidade de células com esse fenótipo no tubo que não possuía o anticorpo específico para o TCR  $\gamma\delta$ .

Figura 16 – *Dot-plot* representativo demonstrando a negatividade para os marcadores CD4 e CD8 (em vermelho).



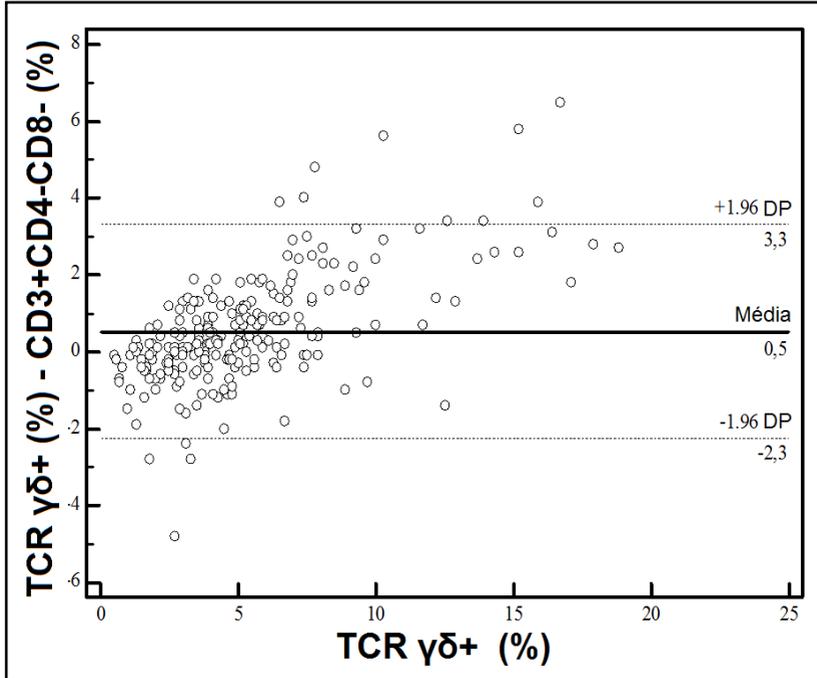
O coeficiente de correlação intraclasse entre essas medidas está apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 – Coeficiente de correlação intraclasse entre as células TCR  $\gamma\delta$ + e as células CD3+ CD4- CD8- duplo-negativas.

	Relativo	Absoluto	P
Amostragem total	0,787	0,813	< 0,0001*
Feminino	0,860	0,881	< 0,0001*
Masculino	0,753	0,783	< 0,0001*

O teste de Bland-Altman (Figura 17) indica que o tubo contendo o anticorpo específico para o TCR  $\gamma\delta$  revelou, em média, 0,5% a mais de células.

Figura 17 – Teste de Bland-Altman entre as células TCR  $\gamma\delta^+$  e as células CD3+ CD4- CD8- duplo-negativas.



A mediana para o valor relativo encontrada foi de 4,1% e o valor absoluto foi de 89 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para essa população celular podem ser visualizados na Tabela 14.

As contagens das células CD3+ CD4- CD8- relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, não houve diferenças estatisticamente significativas tanto para valores relativos quanto para valores absolutos ( $p = 0,345$  e  $p = 0,937$ , respectivamente). Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 14.

Tabela 14 – Valores obtidos na avaliação da contagem das células CD3+CD4-CD8-.

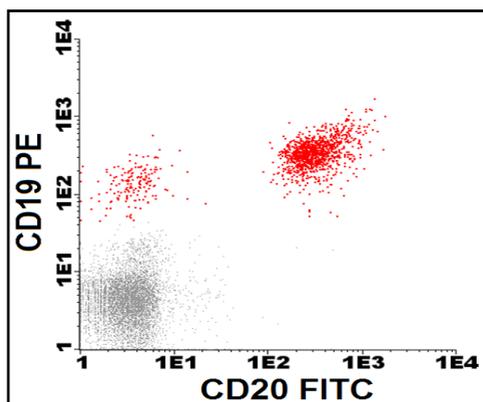
	<b>CD3+CD4-CD8-</b>					
	%	mm <sup>3</sup>	M %	M mm <sup>3</sup>	F %	F mm <sup>3</sup>
Média ± DP	4,8 ± 3,2	109 ± 81	5,0 ± 3,7	110 ± 94	4,6 ± 2,4	107 ± 62
Mediana	4,1	89	4	87	4,2	94
Mínimo	0,60	11	0,6	11	1,1	25
Máximo	31	738	31	738	16,1	379
Intervalo de referência	1,2 - 13,3	28 - 292	1,1 - 14,6	21 - 296	1,2 - 11,4	31 - 282

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

### 5.10 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS CD19+

As células linfoides B foram avaliadas por meio da expressão do marcador pan-B CD19+ (Figura 18).

Figura 18 – *Dot-plot* de CD19 versus CD20 representativo da expressão do marcador CD19+ (em vermelho).



O valor da mediana da contagem relativa dos linfócitos B CD19+ encontrado na população estudada foi de 11,9%, com intervalo de referência de 6,3% a 20,8%. A mediana do valor absoluto foi de 254 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência entre 112 células/mm<sup>3</sup> e 622 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 15.

As contagens dos linfócitos B CD19+ relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, houve diferenças estatisticamente significativas para os valores absolutos ( $p = 0,046$ ), no entanto, não foi observada diferença para os valores relativos ( $p = 0,248$ ). No gênero masculino, a mediana do valor absoluto foi de 228 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 108 a 586 células/mm<sup>3</sup>; e a mediana para o gênero feminino foi de 263 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 115 a 661 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média, desvio padrão e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 15.

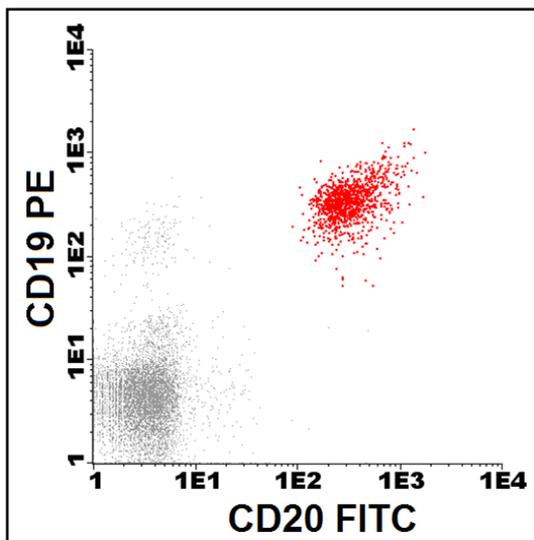
Tabela 15 – Valores obtidos na quantificação de linfócitos B CD19+.

	CD19+					
	%	mm <sup>3</sup>	M %	M mm <sup>3</sup>	F %	F mm <sup>3</sup>
Média $\pm$ DP	12,1 $\pm$	278 $\pm$	12 $\pm$	268 $\pm$	12,2 $\pm$	292 $\pm$
	3,6	128	3,9	132	3,3	122
Mediana	11,9	254	11,5	228	12,5	263
Mínimo	4,5	71	4,8	71	4,5	88
Máximo	29,9	1078	29,9	1078	20,8	795
Intervalo de referência	6,3	112	6,2	108	5,9	115
	20,8	622	21,8	586	20,6	661

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

As células linfoides B também foram avaliadas pela expressão de CD19+ em associação com a expressão de CD20+ (Figura 19). Observou-se um valor médio de  $11,9 \pm 3,6\%$  com mediana de 11,5% (Tabela 16).

Figura 19 – *Dot-plot* de CD19 versus CD20 representativo da co-expressão dos marcadores CD19+ e CD20+ (em vermelho).



As contagens relativa e absoluta dos linfócitos B CD19+ CD20+ apresentaram distribuição não paramétrica e, dessa forma, foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os valores absolutos ( $p = 0,060$ ) tampouco os valores relativos ( $p = 0,309$ ). Os valores de média, desvio padrão e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores obtidos na quantificação das células CD19+ CD20+.

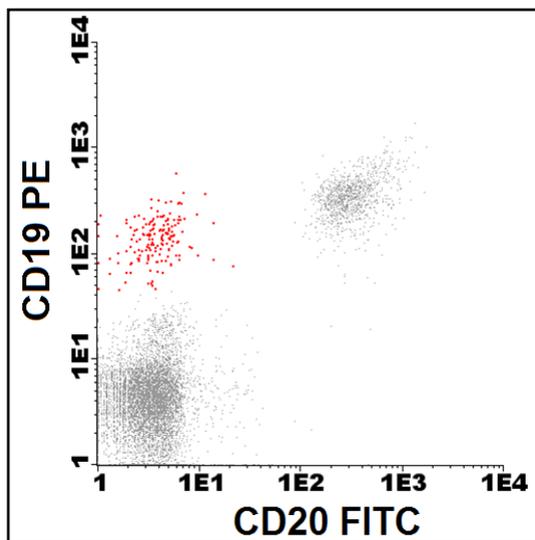
	<b>CD19+ CD20+</b>					
	<b>%</b>	<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>M %</b>	<b>M mm<sup>3</sup></b>	<b>F %</b>	<b>F mm<sup>3</sup></b>
Média ± DP	11,9 ± 3,6	274 ± 128	11,8 ± 3,9	264 ± 132	12 ± 3,3	286 ± 122
Mediana	11,5	252	11,2	223	12	259
Mínimo	4,3	70	4,3	70	4,5	88
Máximo	29,8	1074	29,8	1074	20,8	795
Intervalo de referência	6,3 20,8	110 618	6,1 21,6	101 585	5,9 20,5	113 658

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

A avaliação das células B obtidas pelos fenótipos CD19+CD20+ e CD19+ apresentou correlação excelente tanto para valores relativos ( $r = 0,997$ ;  $p < 0,0001$ ) quanto para valores absolutos ( $r = 0,999$ ;  $p < 0,0001$ ). Quando os gêneros foram avaliados, a correlação intraclasse mostrou-se excelente para valores relativos no gênero feminino ( $r = 0,996$ ;  $p < 0,0001$ ) e no gênero masculino ( $r = 0,997$ ;  $p < 0,0001$ ) e também para valores absolutos (feminino  $r = 0,998$  e masculino  $r = 0,999$ ;  $p < 0,0001$ ).

Como a quantificação das células CD19+ isoladas e das células CD19+CD20+ apresentou diferença, avaliou-se então a quantidade de células que eram positivas para CD19 e negativas para CD20 (Figura 20).

Figura 20 – *Dot-plot* de CD19 *versus* CD20 representativo da positividade para CD19 e ausência de expressão de CD20 (em vermelho).



Foi observado um valor médio de  $0,22 \pm 0,3\%$  e mediana  $0,1\%$  para valores relativos e a média de  $5 \pm 7$  células/mm<sup>3</sup> e mediana de 3 células/mm<sup>3</sup> para valores absolutos. Os valores máximo e mínimo e o intervalo de referência podem ser visualizados na Tabela 17.

As contagens dessas células CD19+ CD20- relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, houve diferenças estatisticamente significativas tanto para os valores absolutos ( $p = 0,002$ ) quanto para valores relativos ( $p = 0,026$ ) das células CD19+ CD20-. Para o gênero masculino, a mediana do valor relativo foi  $0,1\%$  com intervalo de referência de  $0,004\%$  a  $1,3\%$ ; e a mediana para o valor absoluto foi de 2 células/mm<sup>3</sup> com intervalo de referência de 0 células/mm<sup>3</sup> a 26 células/mm<sup>3</sup>. Com relação ao gênero feminino, a mediana do valor relativo foi  $0,2\%$  com intervalo de referência de  $0,008\%$  a  $1,4\%$ ; e a mediana para o valor absoluto foi de 4 células/mm<sup>3</sup> com intervalo de referência de 0 células/mm<sup>3</sup> a 31 células/mm<sup>3</sup>. Os

valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores obtidos na quantificação de das células CD19+CD20-.

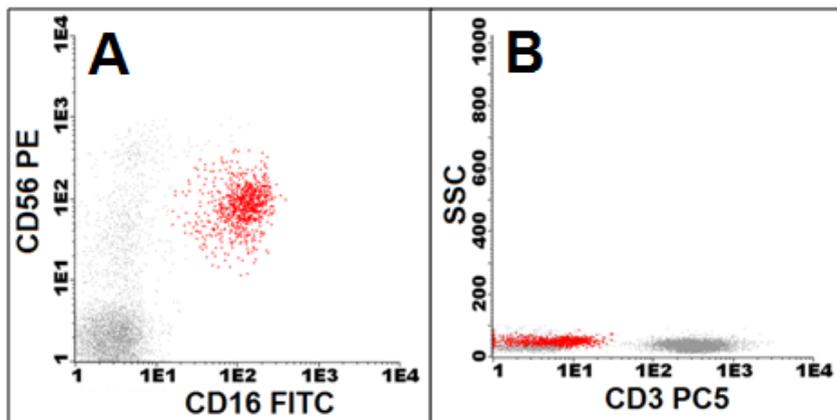
	<b>CD19+CD20-</b>					
	<b>%</b>	<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>M %</b>	<b>M mm<sup>3</sup></b>	<b>F %</b>	<b>F mm<sup>3</sup></b>
Média $\pm$ DP	0,22 $\pm$ 0,3	5 $\pm$ 7	0,20 $\pm$ 0,29	4 $\pm$ 6	0,24 $\pm$ 0,3	6 $\pm$ 7
Mediana	0,1	3	0,1	2	0,2	4
Mínimo	0,001	0	0,001	0	0,001	0
Máximo	1,9	46	1,8	43	1,9	46
Intervalo de referência	0,001 1,3	0 23	0,004 1,3	0 26	0,008 1,4	0 31

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

### 5.11 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS NK

As células NK maduras foram avaliadas pela co-expressão de CD16 e CD56 e pela negatividade para o marcador CD3 (Figura 21).

Figura 21 – Avaliação das células NK maduras. A) *Dot-plot* representativo da co-expressão de CD16 e CD56 (em vermelho); B) *Dot-plot* representativo da negatividade para o marcador CD3 (em vermelho).



O valor da mediana da contagem relativa das células NK maduras (CD16+CD56+CD3-) encontrado na população estudada foi de 10,5% com intervalo de referência de 3,1% a 27,4%. A mediana do valor absoluto foi de 222 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 70 células/mm<sup>3</sup> a 745 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média, desvio padrão e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 18.

As contagens relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) das células NK maduras foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, houve diferenças estatisticamente significativas tanto para os valores relativos quanto para os valores absolutos ( $p < 0,0001$ ). O valor da mediana da contagem relativa das células NK maduras para o gênero masculino foi de 12,3%, com intervalo de referência de 4,3% a 31,2%; e para o gênero feminino a mediana foi de 8,2%, com intervalo de referência de 2,8% a 24,1%. Com relação ao valor absoluto das células NK maduras, a mediana para o gênero masculino foi de 254 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 92 células/mm<sup>3</sup> a 806 células/mm<sup>3</sup>; e a mediana para o gênero feminino foi de 200 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência entre 60 células/mm<sup>3</sup> e 663 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média, desvio padrão e os

valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 18.

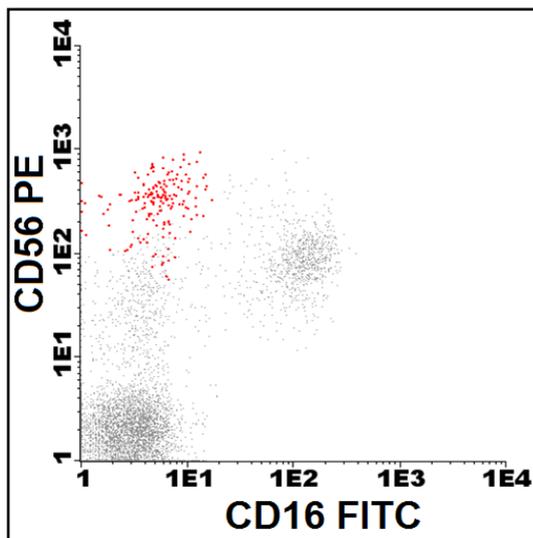
Tabela 18 – Valores obtidos na quantificação das células NK maduras.

<b>CD16+CD56+CD3-</b>						
	<b>%</b>	<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>M %</b>	<b>M mm<sup>3</sup></b>	<b>F %</b>	<b>F mm<sup>3</sup></b>
Média ± DP	11,8 ± 6,2	273 ± 176	13,8 ± 6,5	312 ± 193	9,3 ± 4,7	223 ± 138
Mediana	10,5	222	12,3	254	8,2	200
Mínimo	1,5	28	1,5	38	1,8	28
Máximo	36,4	1019	36,4	1019	26,3	758
Intervalo de referência	3,1 27,4	70 745	4,3 31,2	92 806	2,8 24,1	60 663

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

As células NK imaturas foram avaliadas pela expressão de CD56 de forte intensidade (++) e pela negatividade para o marcador CD16 (Figura 22).

Figura 22 – *Dot-plot* representativo das células NK imaturas CD56++ CD16 - (em vermelho).



O valor da mediana da contagem relativa das células NK imaturas (CD56++CD16-CD3-) encontrado na população estudada foi de 0,32% com intervalo de referência de 0,08% a 1,1%. A mediana do valor absoluto foi de 8 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 1 célula/mm<sup>3</sup> a 23 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média, desvio padrão e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 19.

As contagens das células NK imaturas, tanto relativa quanto absoluta (distribuição não paramétrica), foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, não houve diferenças estatisticamente significativas tanto para os valores relativos quanto para os valores absolutos ( $p = 0,798$  e  $p = 0,247$ , respectivamente). Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 19.

Tabela 19 – Valores obtidos na quantificação das células NK imaturas.

	<b>CD56++CD3-CD16-</b>					
	<b>%</b>	<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>M %</b>	<b>M mm<sup>3</sup></b>	<b>F %</b>	<b>F mm<sup>3</sup></b>
Média ± DP	0,41 ± 0,26	9 ± 5	0,4 ± 0,2	8 ± 5	0,42 ± 0,3	9 ± 6
Mediana	0,32	8	0,3	8	0,36	9
Mínimo	0,02	0	0,02	0,001	0,02	1
Máximo	1,5	34	1,4	34	1,5	27
Intervalo de referência	0,08 1,1	1 23	0,08 1,1	1,4 20	0,04 1,2	1 25

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

Avaliou-se também o somatório das células NK maduras com as células NK imaturas por meio do fenótipo CD56 + e CD3 - (NK totais). A mediana do valor relativo encontrada foi 11,4% com intervalo de referência de 3,7% a 28,5%. A mediana do valor absoluto foi de 234 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 82 células/mm<sup>3</sup> a 760 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média, desvio padrão e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 20.

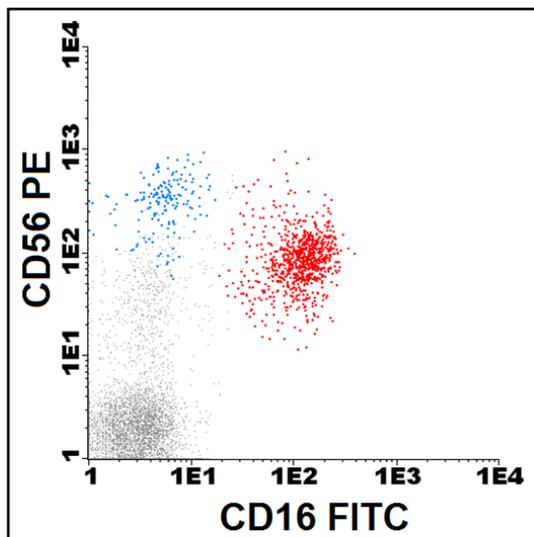
As contagens das células NK totais (Figura 23) relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, houve diferenças estatisticamente significativas tanto para os valores relativos quanto para os valores absolutos ( $p < 0,0001$ ). Os valores de média ± DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 20.

Tabela 20 – Valores obtidos na quantificação das células NK totais.

	Total de células NK					
	%	mm <sup>3</sup>	M %	M mm <sup>3</sup>	F %	F mm <sup>3</sup>
Média ± DP	12,7 ± 6,2	292 ± 178	14,7 ± 6,5	331 ± 194	10,1 ± 4,8	242 ± 140
Mediana	11,4	234	13	273	9,1	218
Mínimo	2,1	52	2,1	54	3,3	52
Máximo	36,8	1030	36,8	1030	27,4	789
Intervalo de referência	3,7	82	5,0	111	3,5	65
	28,5	760	31,3	829	24,9	689

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.

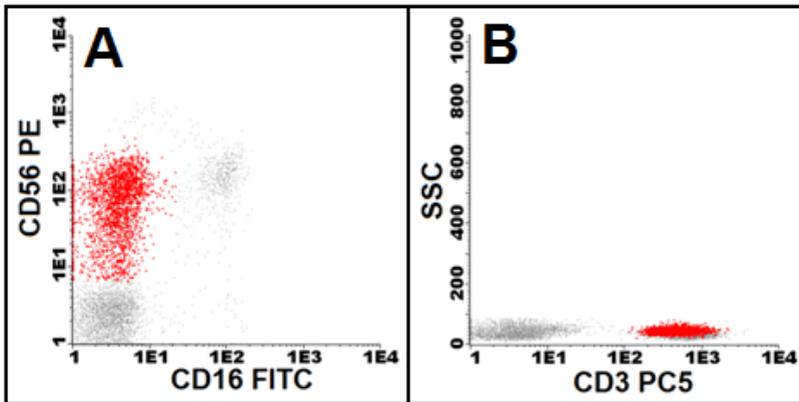
Figura 23 – *Dot-plot* representativo das células NK imaturas CD56<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> (azul) e células NK maduras CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> (vermelho).



## 5.12 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DAS CÉLULAS NKT

As células NKT foram avaliadas pela positividade para os marcadores CD56+ e CD3+ e ausência de expressão de CD16 (Figura 24).

Figura 24 – *Dot-plot* representativo das células NK. A) *Dot-plot* de CD16 *versus* CD56 representativo da positividade para o marcador CD56+ e negatividade para CD16 (em vermelho); B) positividade para o marcador CD3+ (em vermelho).



O valor da mediana da contagem relativa das células NKT (CD56+CD3+CD16-) encontrado na população estudada foi de 6,0% com intervalo de referência entre 0,9% e 21,4%. A mediana do valor absoluto foi de 134 células/mm<sup>3</sup>, com intervalo de referência de 18 a 488 células/mm<sup>3</sup>. Os valores de média, desvio padrão e os valores mínimo e máximo podem ser visualizados na Tabela 21.

As contagens das células NKT relativa e absoluta (distribuição não paramétrica) foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Na comparação entre os gêneros, não houve diferenças estatisticamente significativas tanto para os valores relativos quanto para os valores absolutos ( $p = 0,214$  e  $p = 0,053$ , respectivamente). Os valores de média  $\pm$  DP e os valores mínimo e máximo para os gêneros podem ser visualizados na Tabela 21.

Tabela 21 – Valores obtidos na quantificação das células NKT.

	<b>CD56+CD3+CD16-</b>					
	<b>%</b>	<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>M %</b>	<b>M mm<sup>3</sup></b>	<b>F %</b>	<b>F mm<sup>3</sup></b>
Média ± DP	6,8 ± 4,5	157 ± 118	6,4 ± 4,1	141 ± 96	7,3 ± 5	177 ± 138
Mediana	6,0	134	5,8	127	6,1	139
Mínimo	0,01	0	0,01	0,001	0,2	5
Máximo	31,4	820	23,5	536	31,4	820
Intervalo de referência	0,9 21,4	18 488	0,9 19,4	20 436	0,5 21,5	12 610

Legenda: DP: desvio padrão; M: masculino; F: feminino.



## 6 DISCUSSÃO

Como abordado anteriormente, cada laboratório de análises clínicas deve estabelecer seus próprios intervalos de referência. Dessa forma, é necessário estabelecer os valores referenciais das células linfocitárias em sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis naturais de Santa Catarina (Apêndice B).

Inicialmente, para a validação da metodologia de plataforma dupla, utilizando-se o citômetro FACSCanto II, analisou-se a reprodutibilidade dos valores obtidos na contagem das células T CD3+, T CD4+ e T CD8+ em 20 amostras de sangue periférico de indivíduos adultos HIV soropositivos por meio da comparação dos resultados obtidos por esse método com aqueles emitidos pelo métodos de plataforma única no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences, EUA), o qual possui controle de qualidade externo assegurado pelos ensaios de proficiência do Ministério da Saúde. Os resultados obtidos mostraram que existe uma excelente correlação (Tabela 2) dos valores resultantes dos dois equipamentos (FACSCalibur e FACSCanto II). Ainda, o teste de Bland-Altman indicou que a maioria dos pontos estavam distribuídos randomicamente em torno da média, nos dois métodos utilizados, e, que um número pequeno de pontos estava fora de um desvio padrão. Esse teste também mostrou que houve pouca variação tanto para valores relativos quanto para os absolutos de linfócitos (Figura 6). Dessa forma, os resultados obtidos pelo citômetro FACSCanto II foram validados, pois estavam concordantes com aqueles de valor conhecido determinado pelo citômetro FACSCalibur. Além disso, considera-se essas amostras com valores conhecidos como controles positivos internos. Esses controles, além de avaliarem a reprodutibilidade, verificam o desempenho dos reagentes e dos métodos de preparação e marcação das células. Esse desempenho é considerado aceitável quando a capacidade de identificar as células com determinado marcador é atingida e a quantidade identificada também está correta (NCCLS, 1998).

A reprodutibilidade da metodologia também foi avaliada de outras maneiras, como, por exemplo, pela consistência da contagem relativa do marcador CD3, pela avaliação da comparação entre o somatório das células T CD4+, T CD8+ e TCR  $\gamma\delta$ + com o valor das células CD3+ totais e por meio do valor relativo das células TCR  $\alpha\beta$ + com o somatório das células CD4+ e CD8+.

A consistência da contagem relativa do marcador CD3 apresentou correlação excelente e estatisticamente significativa. O teste de Bland-Altman (Figura 7) mostrou que, em média, a variação entre os tubos foi de  $\pm 0,1\%$  e que a maioria dos pontos estavam distribuídos randomicamente em torno da média nos três tubos. Também foi possível visualizar que um número pequeno de pontos estava fora de um desvio padrão. De acordo com Loken, Meiners, Terstappen (1988) e Santagostino e colaboradores (1999), a variação máxima aceita para um mesmo marcador em diferentes análises é de 3%. Assim, os valores relativos de CD3 se reproduziram de maneira adequada nas três análises, uma vez que a variação média apresentada foi de 0,1%.

A avaliação da comparação entre o somatório das células T CD4+, T CD8+ e TCR  $\gamma\delta$ + com o valor médio das células CD3+ (Tabela 3) também apresentou correlação excelente e estatisticamente significativa, o que indica uma boa reprodutibilidade da metodologia. Nessa análise, também foram somados os valores das células T CD4+ e das células T CD8+ (Tubo 1) com os valores das células TCR  $\gamma\delta$ + (Tubo 4) e esses dados foram comparados com o valor médio do CD3 (Tubos 1, 3 e 4). Segundo Loken, Meiners, Terstappen (1988) e Santagostino e colaboradores (1999), a faixa de variação do somatório com o valor de CD3 pode ser de 3% a, no máximo, 10%. Casos nos quais a variação seja superior a 10%, deve-se rever a porcentagem de células duplo-positivas (CD4+CD8+), por exemplo. No presente estudo, a variação encontrada foi de 0,1%, ou seja, inferior ao limite máximo permitido (10%).

Semelhante ao realizado acima, outra forma de avaliar a reprodutibilidade foi por meio do teste que comparou o valor relativo das células TCR  $\alpha\beta$ + (Tubo 4) com o somatório das células CD4+ e CD8+ (Tubo 1), o qual também apresentou correlação estatisticamente significativa e excelente. A variação média foi de 0,5%, o que indica um baixo grau de variabilidade dos resultados entre tubos distintos.

Além disso, também foi avaliado o somatório total dos linfócitos (Lymphosum) por meio da soma dos linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD19+) e células NK (CD16+CD56+CD3-). O somatório dessas células reflete a pureza e a taxa de recuperação do gate dos linfócitos. A variação ideal é de  $\pm 5\%$  (95% - 105%) (LOKEN; MEINERS; TERSTAPPEN, 1988; GIORGI et al., 1990; CALVELLI et al., 1993; SANTAGOSTINO et al., 1999) com variação máxima de  $\pm 10\%$  (90% - 110%). Quando o somatório apresentar valores excedentes a essa faixa,

deve-se proceder a investigação, como por exemplo, avaliar a taxa de contaminação por monócitos e/ou debris (LOKEN; MEINERS; TERSTAPPEN, 1988). Dessa forma, neste estudo, os casos que apresentaram valores superiores a variação máxima permitida foram reavaliados e o somatório final dos linfócitos foi de  $95,0\% \pm 2,9\%$ , o qual permaneceu dentro da faixa de variação permitida.

Como neste estudo utilizou-se a metodologia em plataforma dupla, além da reprodutibilidade do citômetro de fluxo, avaliou-se a reprodutibilidade do contador hematológico Sysmex XE-2100D. A comparação dos valores obtidos nesse equipamento com os obtidos pelo contador Sysmex XS-1000i apresentaram correlação excelente e estatisticamente significativa para todos os parâmetros avaliados (valor absoluto de leucócitos e valores relativos e absolutos de linfócitos). O teste de Bland-Altman mostrou que a maioria dos pontos estavam distribuídos randomicamente em torno da média nos dois equipamentos e um número pequeno de pontos estava fora de um desvio padrão.

A última avaliação referente à validação e ao controle de qualidade foi a análise da concordância entre as medidas obtidas pelo citômetro de fluxo e pelo contador hematológico por meio da comparação do valor relativo dos linfócitos nas 238 amostras. O valor do coeficiente de correlação intraclasse demonstrou a presença de correlação estatisticamente significativa e excelente. Além disso, o teste de Bland-Altman, que mostrou que a maioria dos pontos estavam distribuídos randomicamente em torno da média nos dois equipamentos e um número pequeno de pontos estava fora de um desvio padrão. Ainda, o teste de Bland-Altman indicou que a variação média entre os dois equipamentos foi baixa (1,1%). Assim, após todas essas comparações foi possível inferir que os resultados obtidos, pela metodologia de plataforma dupla, nesse estudo, são confiáveis. Os resultados obtidos corroboram o estudo de Hultin e colaboradores (2010) no qual uma baixa variação entre valores obtidos por plataforma única e dupla também foi observada. No entanto, as conclusões acerca dos resultados obtidos por plataforma única e dupla apresentam resultados divergentes visto que alguns estudos encontraram diferenças estatisticamente significativas entre essas duas técnicas (SCHNIZLEIN-BICK et al., 2000; REIMANN et al., 2000; SEPSTRUP; SARGENT, 2003).

Após a validação da metodologia iniciou-se a análise das amostras. Foi avaliado um total de 238 amostras, das quais 56,3% ( $n =$

134) eram do gênero masculino e 43,7% (n = 104), do gênero feminino. De acordo com o censo realizado no ano de 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (BRASIL, 2010) o Estado de Santa Catarina é composto por 49,5% de homens e 50,5% de mulheres. Sendo assim, a proporção entre homens e mulheres no presente estudo foi semelhante à encontrada no Estado, porém com um discreto predomínio do gênero masculino, pois a seleção de doadores foi de modo randomizado e a maioria dos indivíduos que doou sangue nesse período pertenciam a esse gênero.

A idade média dos participantes deste estudo foi de  $27,3 \pm 9,3$  anos, refletindo o perfil dos indivíduos selecionados pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário de Santa Catarina, o qual está localizado dentro do Campus Universitário. Dessa forma, foram recrutados adultos jovens, sendo a maioria estudantes (57,1%), seguidos de professores (4,6%) e de servidores públicos (2,5%).

Com relação à raça, quase a totalidade (97,9%) dos indivíduos recrutados foram brancos. Esses dados podem ser justificados pelos dados obtidos pelo Censo de 2010 do IBGE, o qual aponta que 94,5% da população catarinense é composta por indivíduos brancos e 5,5% correspondem a negros, amarelos, pardos e indígenas (BRASIL, 2010).

Também é possível observar que a maioria dos indivíduos (36,6%) eram naturais de Florianópolis (cidade onde está localizado o Campus Universitário da UFSC), seguido do município de São José (8,4%). Além disso, os resultados também demonstram que há um número de indivíduos, em menor proporção, provenientes de outras macrorregiões, o que reflete o processo migratório e o fato de que grande número de estudantes participantes da pesquisa ser natural dessas macrorregiões.

A comparação entre as contagem das populações linfocitárias realizada em estudos anteriores demonstrou diferenças nos intervalos de referência em diversos países (DHALIWAL et al., 1995; SHAHABUDDIN, 1995; HOWARD et al., 1996; KAM et al., 1996; MAINI et al., 1996; SANTAGOSTINO et al., 1999; TSEGAYE et al., 1999; KAABA, AL FADHLI, KHAMIS, 2002; MENARD et al., 2003; UPPAL; VERMA; DHOT, 2003; URASSA et al., 2003; TSEGAYE et al., 2003; AMATYA et al., 2004; BISSET et al., 2004; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004 JIANG et al., 2004; KAABA et al., 2004; AINA et al., 2005; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; YAMAN et al., 2005; RAY et al., 2006; KLOSE et al., 2007; NGOWI, et al., 2009;

OLADEPO et al., 2009; ALAMOOTI et al., 2010; MANDALA et al., 2010; THAKAR et al., 2011) (APÊNDICE C e D). As comparações entre os estudos foram dificultadas, pois alguns estudos apresentaram os resultados apenas em valores absolutos (KAABA; FADHLI; KHAMIS, 2002; JIANG et al., 2004; TORRES et al., 2009; OLADEPO et al., 2009), enquanto outros informaram apenas os valores relacionados aos gêneros (sem os dados referentes a amostragem total) (MAINI et al., 1996; TSEGAYE et al., 1999; UPPAL; VERMA; DHOT, 2003; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; ROJAS-PANDALES et al., 2007; NGOWI et al., 2009). Além disso, outros relatam apenas os valores médios ou a mediana sem apresentar o intervalo de referência (QOUZI et al., 2002; PASQUALETTI et al., 2003). Além das diversas formas de apresentar os resultados, há diferenças nos estudos relacionadas à metodologia empregada como o volume de amostra utilizado, a contagem por plataforma única ou dupla, a técnica de marcação (lyse-wash ou lyse-no wash), o modelo e a marca do citômetro de fluxo, a marca dos anticorpos monoclonais e da solução de lise, o número de fluorocromos utilizados no mesmo tubo, a estratégia de análise, as quais podem gerar discretas diferenças nos resultados obtidos (SANTAGOSTINO et al., 1999; YAMAN et al., 2005; ALAMOOTI et al., 2010). Além dos fatores mencionados acima, ainda devem ser consideradas as diferenças relacionadas à idade, à descendência étnica e racial e a fatores ambientais das populações estudadas (SANTAGOSTINO et al., 1999; YAMAN et al., 2005; ALAMOOTI et al., 2010). O estudo de Santagostino e colaboradores (1999), por exemplo, além de ter observado diferenças estatisticamente significativas entre os gêneros e entre indivíduos fumantes e não fumantes, também observou valores distintos entre pessoas obesas e não obesas (SANTAGOSTINO et al., 1999). Por isso, neste trabalho o critério de inclusão relacionado ao fumo foi adotado, pois estudos prévios demonstraram que fumantes considerados leves ou moderados (menos de 50 maços por ano) tem um aumento significativo na contagem de células T CD3+ e de T CD4+ e uma tendência a aumento nos valores dos linfócitos T CD8+. Esse aumento das células T CD4+ resulta em um aumento na relação T CD4+/T CD8+. Os mesmos estudos ainda demonstraram que fumantes considerados pesados (mais de 50 maços por ano) tem uma redução nas contagens de células T CD4+ e um aumento significativo de células T CD8+. Nesses indivíduos, ao contrário do observado nos fumantes leves e moderados, apresenta-se uma diminuição na relação T CD4+/T CD8+

devido, predominantemente, ao valor aumentado de células T CD8+ (MILLER et al., 1982; HUGHES et al., 1985; MILI et al., 1991; ARCAVI; BENOWITZ, 2004). Ainda neste contexto, no estudo realizado por Santagostino e colaboradores (1999), os fumantes crônicos, além de apresentarem valores aumentados para os linfócitos CD3 e CD4, também apresentaram valores mais elevados nas contagens de CD19 e valores diminuídos nas contagens de células NK.

Como pode ser observado na Tabela 6, o valor de referência relativo encontrado para as células T CD3+ foi de 51,3% a 83,5%. Este intervalo foi semelhante aquele relatado por estudos realizados na Malásia, China e Índia (DHALIWAL et al., 1995), Arábia Saudita (SHAHABUDDIN, 1995), China (KAM et al., 1996), Itália (SANTAGOSTINO et al., 1999), Etiópia (TSEGAYE et al., 2003), Tanzânia (URASSA et al., 2003), Suíça (BISSET et al., 2004), China, Malásia e Índia (CHNG; TAN; KUPERAN, 2004), Kuwait (KAABA ET AL., 2004), Alemanha (JENTSCH-ULLRICH et al., 2005), Turquia (YAMAN et al., 2005), Burkina Faso (KLOSE et al., 2007) e Índia (THAKAR et al., 2011) (Tabela 22).

No entanto, quando o valor de referência absoluto foi avaliado, observou-se algumas diferenças entre essas populações. Quando os resultados do presente estudo (718 células/mm<sup>3</sup> a 2.494 células/mm<sup>3</sup> – Tabela 6) foram comparados com os resultados encontrados na população indiana (Tabela 22), por exemplo, é possível visualizar que o intervalo de referência encontrado na Índia é mais amplo do que o deste estudo. Uma possível explicação para esse fato é que a Índia é um país com uma população muito heterogênea e foram avaliadas amostras de indivíduos de 4 regiões geográficas distintas. A população do Brasil também é heterogênea, pois cada região do país possui uma diversidade étnica como resultado da colonização por Ameríndios, Europeus, Africanos e Asiáticos (ABE-SANDES; SILVA; ZAGO, 2004). De acordo com o estudo de Callegari-Jacques e Salzano (1999), os imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1972 foram 58% europeus, 40% africanos e 2% asiáticos. Apesar dessa heterogeneidade do país, a população desse estudo foi homogênea (97,9% de brancos), pois foram utilizadas apenas amostras de indivíduos procedente do Estado de Santa Catarina, no qual a colonização é predominantemente europeia (PIAZZA, 1989).

Tabela 22 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos T CD3+.

<b>T CD3+ %</b>	<b>T CD3+ /mm<sup>3</sup></b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
53,0 – 80,0	988 – 3.912	Malásia	DHALIWAL et al., 1995
61 – 87	890 – 3.200	Arábia Saudita	SHAHABUDDIN, 1995
54,8 – 83,0	672 – 2.368	China	KAM et al., 1996
60,0 – 87,0	605 – 2.460	Itália	SANTAGOSTINO et al., 1999
57,0 – 85,0	588 – 2.381	Etiópia	TSEGAYE et al., 2003
53,7 – 82,6	769 – 2.798	Tanzânia	URASSA et al., 2003
54,90 – 84,03	536 – 1.787	Suíça	BISSET et al., 2004
49,0 – 80,0	796 – 2.679	China, Malásia e Índia	CHNG; TAN; KUPERAN, 2004
64,0 – 85,0	830 – 2.710	Kuwait	KAABA ET AL., 2004
53,0 – 83,0	780 – 2.240	Alemanha	JENTSCH-ULLRICH et al., 2005
52,30 – 84,64	725 – 2.960	Turquia	YAMAN et al., 2005
57,0 – 80,0	1,069 – 2.921	Burkina Faso	KLOSE et al., 2007
63,0 – 83,0	900 – 2.100	Malásia	MANDALA et al., 2010
55,0 – 81,0	457 – 3.926	Índia	THAKAR et al., 2011
51,3 – 83,5	718 – 2.494	Brasil	Presente estudo

Além do presente estudo, existe outro trabalho realizado no Brasil que avaliou os intervalos de referência das populações linfocitárias em doadores de sangue nos Estados da Bahia e do Pará (TORRES et al., 2009). Nesse estudo o intervalo de referência para as células T CD3+ foi de 718 a 2.721 células/mm<sup>3</sup> no Estado da Bahia e de 648 a 2.259

células/mm<sup>3</sup> no Estado do Pará. Quando esses resultados foram comparados com os apresentados neste estudo, observou-se que o intervalo de referência obtido nos indivíduos de Santa Catarina é mais estreito. Essa diferença pode ser justificada por diferenças metodológicas, fatores ambientais e principalmente pela diversidade étnica. Enquanto a região Sul do país (onde o Estado de Santa Catarina está localizado) foi colonizada por europeus, a região nordeste (onde o Estado da Bahia se localiza) foi colonizada predominantemente por africanos e a região norte (onde o Estado do Pará está inserido) foi colonizada principalmente por indígenas, ou seja, pela população nativa (TORRES et al., 2009).

Na maioria dos estudos analisados não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando os gêneros foram comparados (TSEGAYE et al., 1999; KAABA; FADHLI; KHAMIS, 2002; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; YAMAN et al., 2005; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; KLOSE et al., 2007). No entanto, o presente estudo corrobora os valores obtidos em outros estudos (SANTAGOSTINO et al., 1999; URASSA et al., 2003; AMATYA et al., 2004; ALAMOOTI et al., 2010; THAKAR et al., 2011) nos quais também foram observados valores superiores para o gênero feminino.

Como mostrado na Tabela 23, o valor de referência da contagem de células T CD4+ (relativo e absoluto) encontrado neste estudo foi similar ao encontrado em outros trabalhos de diferentes autores.

Com relação as células T CD4+, no presente estudo tanto valores relativos quanto absolutos foram significativamente mais altos no gênero feminino (Tabela 7). Esses achados são consistentes com valores encontrados em estudos prévios nos quais foram observadas diferenças significativas nos valores relativos, absolutos ou em ambos (KAM et al., 1996; MAINI et al., 1996; SANTAGOSTINO et al., 1999; URASSA et al., 2003; AMATYA et al., 2004; BISSET et al., 2004; KLOSE et al., 2007; NGOWI et al., 2009; TORRES et al., 2009; OLADEPO et al., 2009; ALAMOOTI et al., 2010; MANDALA et al., 2010; THAKAR et al., 2011). Um estudo sugere que uma possível explicação para essa diferença seja o efeito do hormônio sexual (MAINI et al., 1996).

Tabela 23 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos T CD4+.

<b>T CD4+ %</b>	<b>T CD4+ /mm<sup>3</sup></b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
19,0 – 46,0	431 – 1.976	Malásia	DHALIWAL et al., 1995
31,0 – 55,0	510 – 1.700	Arábia Saudita	SHAHABUDDIN, 1995
23,1 – 51,0	292 – 1.366	China	KAM et al., 1996
32,0 – 61,0	493 – 1.666	Itália	SANTAGOSTINO et al., 1999
25,0 – 55,0	374 – 1.362	Etiópia	TSEGAYE et al., 2003
27,0 – 55,0	405 – 1.500	Tanzânia	URASSA et al., 2003
17,56 – 50,63	304 – 1.864	Índia	AMATYA et al., 2004
32,53 – 62,88	309 – 1.139	Suíça	BISSET et al., 2004
23,0 – 48,2	401 – 1.451	China, Malásia e Índia	CHNG; TAN; KUPERAN, 2004
34,0 – 54,0	450 – 1.650	Kuwait	KAABA ET AL., 2004
30,0 – 59,0	490 – 1.640	Alemanha	JENTSCH-ULLRICH et al., 2005
29,0 – 51,0	500 – 1.200	Malásia	MANDALA et al., 2010
27,0 – 51,0	448 – 1.611	Índia	THAKAR et al., 2011
24,4 – 54,2	456 – 1.492	Brasil	Presente estudo

Devido ao fato da contagem absoluta de células T CD4+ ser o marcador mais correlacionado com o estágio da infecção pelo vírus HIV e com o início da terapia antiretroviral, e, ainda, devido à alta incidência de AIDS no Estado de Santa Catarina e da alta taxa de infecção em mulheres, vale a pena ressaltar a importância dessas diferenças entre os gêneros, as quais podem ter implicações no tratamento dos pacientes (PRINS et al., 1999). Considerando-se que os valores relativos e, principalmente, os absolutos da contagem de CD4+ serem um parâmetro importante para a avaliação da necessidade de iniciar a terapia antiretroviral. Sendo que essas contagens apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os gêneros, o presente estudo corrobora o trabalho de Thakar e colaboradores (2011) que julga necessário o desenvolvimento de intervalos de referências distintos para indivíduos do gênero masculino e feminino.

A comparação do presente estudo com o realizado no Brasil por Torres e colaboradores (2009) mostrou algumas diferenças nos valores de referência das células T CD4+. Os resultados encontrados na população proveniente da Bahia apresentaram um limite inferior (422 células/mm<sup>3</sup>) mais baixo e um limite superior mais alto (1.711 células/mm<sup>3</sup>) quando comparados com os resultados deste trabalho. Por outro lado, os resultados observados no Pará apresentaram um limite superior semelhante (1.508 células/mm<sup>3</sup>) e um limite inferior reduzido (342 células/mm<sup>3</sup>) quando comparados com este estudo. Como citado anteriormente, essas variações podem ser devido a diferenças metodológicas, fatores ambientais e também pela diversidade étnica das populações estudadas.

A contagem relativa de linfócitos T CD8+ obtida neste estudo é comparável aos valores relatados em outros estudos (DHALIWAL et al., 1995; SANTAGOSTINO et al., 1999; URASSA et al., 2003; UPPAL; VERMA; DHOT, 2003; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; YAMAN et al., 2005; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; KLOSE et al., 2007). Os valores absolutos também foram similares aos encontrados em estudos prévios (Tabela 24), com exceção dos valores encontrados na população da Alemanha, que foram mais estreitos do que os encontrados neste estudo. Apesar da população de Santa Catarina ser composta por uma maioria de caucasianos, a colonização foi realizada por alemães, italianos, portugueses, espanhóis, poloneses e russos (PIAZZA, 1989); e isso torna a população catarinense mais heterogênea quando comparada com a população estudada por Jentsch-Ullrich e colaboradores (2005).

Com relação às células T CD8+, a maioria dos estudos não encontrou diferença entre os gêneros (MAINI et al., 1996; SANTAGOSTINO et al., 1999; KAABA; FADHLI; KHAMIS, 2002; URASSA et al., 2003; UPPAL; VERMA; DHOT, 2003; AMATYA et al., 2004; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; YAMAN et al., 2005; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; KLOSE et al., 2007). No presente estudo, a comparação entre os gêneros mostrou diferenças apenas para a contagem absoluta de células T CD8+, na qual o gênero feminino apresentou valores mais elevados (Tabela 8). Esses resultados são semelhantes aos encontrados em adultos na região rural do norte da Tanzânia (NGOWI et al., 2009).

Tabela 24 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos T CD8+.

<b>T CD8+</b> %	<b>T CD8+</b> /mm <sup>3</sup>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
17,6 – 49,0	385 – 1.808	Malásia	DHALIWAL et al., 1995
24,0 – 56,0	410 – 1.900	Arábia Saudita	SHAHABUDDIN, 1995
17,9 – 47,5	240 – 1.028	China	KAM et al., 1996
14,0 – 43,0	224 - 1.112	Itália	SANTAGOSTINO et al., 1999
11,0 – 52,0	146 – 1.449	Etiópia	TSEGAYE et al., 2003
15,0 – 41,0	261 – 1.033	Tanzânia	URASSA et al., 2003
20,0 – 43,0	218 – 1.396	Índia	UPPAL; VERMA; DHOT, 2003
14,25 – 53,43	236 – 1.701	Índia	AMATYA et al., 2004
11,55 – 38,60	137 – 823	Suíça	BISSET et al., 2004
13,4 – 41,0	243 – 1.206	China, Malásia e Índia	CHNG; TAN; KUPERAN, 2004
20,0 – 42,0	290 – 1.170	Kuwait	KAABA et al., 2004
10,0 – 40,0	170 – 880	Alemanha	JENTSCH-ULLRICH et al., 2005
17,76 – 39,94	307 – 1.184	Turquia	YAMAN et al., 2005
16,0 – 35,0	328 – 1.167	Burkina Faso	KLOSE et al., 2007
20,0 – 37,0	300 – 1.000	Malásia	MANDALA et al., 2010
12,8 – 40,2	272 – 1.144	Brasil	Presente estudo

A comparação entre o presente estudo e o outro estudo conduzido no Brasil (TORRES et al., 2009) mostrou algumas diferenças no intervalo de referência das células T CD8+. Tanto os resultados encontrados na população da Bahia quanto do Pará apresentaram limites inferiores baixos (214 células/mm<sup>3</sup> e 203 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) e semelhantes ao do presente estudo (Tabela 8). O limite superior encontrado na Bahia (1.056 células/mm<sup>3</sup>) também foi semelhante aos do presente estudo, mas os resultados encontrados no Pará foram inferiores (917 células/mm<sup>3</sup>) quando comparado ao encontrado na população de Santa Catarina. Novamente, essas variações podem ser devido a

diferenças metodológicas, fatores ambientais e, principalmente, devido a diversidade étnica entre as populações estudadas.

Os valores da relação T CD4+/T CD8+ obtidos neste estudo (0,68 a 3,61 (Tabela 9) são comparáveis aos valores obtidos em outros estudos (Tabela 25) (TSEGAYE et al., 1999; URASSA et al., 2003; UPPAL; VERMA; DHOT, 2003; JIANG et al., 2004; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; YAMAN et al., 2005; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; KLOSE et al., 2007; OLADEPO et al., 2009; NGOWI et al., 2009). O mesmo não é observado quando os gêneros foram comparados, pois, em alguns estudos (URASSA et al., 2003; UPPAL; VERMA; DHOT, 2003; AMATYA et al., 2004; JIANG et al., 2004; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; OLADEPO et al., 2009) foi encontrada uma relação superior para o gênero feminino, enquanto em que outros (MAINI et al., 1996; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004; YAMAN et al., 2005; RAY et al., 2006; KLOSE et al., 2007; NGOWI et al., 2009), incluindo este, não encontraram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 25 – Comparação da relação T CD4+ / T CD8+.

<b>Relação CD4/CD8</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
0,60 – 2,50	China	KAM et al., 1996
0,40 – 2,40	Etiópia	TSEGAYE et al., 1999
0,40 – 3,00	Índia	UPPAL; VERMA; DHOT, 2003
0,50 – 3,90	Etiópia	TSEGAYE et al., 2003
0,61 – 2,73	Tanzânia	URASSA et al., 2003
0,40 – 3,56	Índia	AMATYA et al., 2004
1,00 – 5,00	Suíça	BISSET et al., 2004
0,69 – 2,83	China, Malásia e Índia	CHNG; TAN; KUPERAN, 2004
0,72 – 2,56	China	JIANG et al., 2004
0,90 – 5,00	Alemanha	JENTSCH-ULLRICH et al., 2005
1,06 – 2,76	Turquia	YAMAN et al., 2005
0,90 – 2,80	Burkina Faso	KLOSE et al., 2007
1,10 – 2,50	Tanzânia	NGOWI et al., 2009
0,70 – 5,30	Nigéria	OLADEPO et al., 2009
0,90 – 2,30	Malásia	MANDALA et al., 2010
0,69 – 3,61	Brasil	Presente estudo

Como abordado anteriormente, as células CD4+CD8+ duplo-positivas podem ser encontradas em quantidades aumentadas em diversas doenças, dentre elas em indivíduos HIV soropositivos (CHAUHAN et al., 2012; PAREL; CHIZZOLINI, 2004). Nesse contexto, o estudo de Chauhan e colaboradores (2012) comparou um grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 ( $n = 22$ ) com um grupo controle não infectado ( $n = 10$ ). Nesse estudo, foi observado que não há diferenças estatisticamente significativas na proporção de células duplo-positivas CD4+CD8+ entre os dois grupos. No estudo de Chauhan e colaboradores (2012), o intervalo de referência em indivíduos infectados pelo HIV-1 foi de 0,1% a 2,3% e no grupo controle foi de 0,1% a 1,2%. Todavia, no presente estudo, o resultado encontrado nos 238 indivíduos saudáveis apresentou uma faixa mais ampla (0,01% a 3,6% - Tabela 10) dessas células duplo-positivas. Essa diferença pode ser explicada pelo número de participantes nos estudos, quando um número maior de indivíduos pode resultar em um intervalo mais amplo. Além disso, no presente estudo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas tanto para valores relativos quanto para absolutos quando os gêneros foram comparados.

Até o presente momento, poucos estudos avaliaram os valores relativos e absolutos das células TCR  $\alpha\beta$ + em amostras de sangue periférico. No estudo de Andreu-Ballester e colaboradores (2012), realizado na Espanha, essas células foram avaliadas, todavia, os dados foram apresentados apenas como mediana e intervalo de confiança 95% e não na forma de intervalo de referência. Desse modo, a comparação entre o estudo em questão e o presente foi realizada por meio da avaliação da mediana. O estudo de Andreu-Ballester e colaboradores (2012) encontrou como mediana do valor relativo das células CD3+ TCR  $\alpha\beta$  de 64,82%; o qual é semelhante ao observado no presente estudo, no qual a mediana foi de 66,90% (Tabela 11). A mediana do valor absoluto observada também foi similar em ambos os estudos. Andreu-Ballester e colaboradores (2012) encontraram uma mediana de 1.462 células/mm<sup>3</sup> enquanto que no presente estudo a mediana foi 1.420 células/mm<sup>3</sup>. Em ambos os estudos, quando os gêneros foram avaliados, observou-se diferenças estatisticamente significativas, nas quais o gênero feminino apresentou valores mais altos em comparação ao masculino.

Alguns estudos demonstram que, em pacientes com infecções, há uma expansão significativa dessas células TCR  $\gamma\delta$  (GIRARDI, 2006;

ZHENG et al., 2011). Por exemplo, em indivíduos infectados pelo vírus HIV-1, há alterações na frequência dessas subpopulações na qual ocorre uma expansão da subpopulação V $\delta$ 1+ na mucosa e uma redução da subpopulação V $\delta$ 2+ no sangue periférico (VERDINO et al., 2011). Sendo assim, para avaliar o aumento ou a diminuição dessas células é necessário saber o valor de referência em indivíduos saudáveis. Por isso, um dos objetivos do presente estudo foi estabelecer o intervalo de referência para o valor relativo e absoluto para as células TCR  $\gamma\delta$ . Para o valor relativo foi observada a faixa de 0,99% a 15,9% e para o valor absoluto a faixa de 19 a 345 células/mm<sup>3</sup> (Tabela 12). Esses valores corroboram os encontrados por Mandala e colaboradores (2010), pois, observou-se um intervalo de 2,0 a 10% para o valor relativo e de 0 a 200 células/mm<sup>3</sup> para o valor absoluto (MANDALA et al., 2010). Em 1997, Worku e colaboradores avaliaram a expressão de células TCR  $\gamma\delta$ + em 45 indivíduos adultos saudáveis, dos quais 15 homens eram de Bangladesh, 15 homens da Suécia e 12 homens e 3 mulheres da Etiópia. Nesse trabalho, a média  $\pm$  SD dos valores relativos encontrados para as células CD3+ TCR  $\gamma\delta$ + para os indivíduos de Bangladesh, Etiópia e Suécia foram 15,0%  $\pm$  5,2%, 8,1%  $\pm$  4,4% e 7,3%  $\pm$  3,1%, respectivamente. Quando comparados, os valores de Bangladesh apresentaram valores mais elevados e estatisticamente significativos. A média  $\pm$  SD encontrada no presente estudo (5,2%  $\pm$  3,44%) é inferior a todos os valores encontrados no estudo de Worku e colaboradores (1997). Além de avaliarem o fenótipo CD3+ TCR  $\gamma\delta$ +, o estudo de Worku e colaboradores (1997) também avaliou as células CD3+ CD4- CD8-. Os valores encontrados para os indivíduos dos três países foram: 12,4%  $\pm$  4,1%, 9,3%  $\pm$  5,0% e 6,1%  $\pm$  2,4%, respectivamente. Da mesma forma que observado anteriormente, os valores do presente estudo (4,8%  $\pm$  3,2%) foram inferiores aos encontrados por Worku e colaboradores (1997). Em um outro estudo realizado na Espanha, Andreu-Ballester e colaboradores (2012) expressaram os resultados referentes à expressão de células CD3+ TCR  $\gamma\delta$ + na forma de mediana e intervalo de confiança 95%. A mediana para o valor relativo encontrada foi 3.13% e para o valor absoluto foi de 69,8 células/mm<sup>3</sup>. Ambos os valores foram inferiores aos encontrados no presente estudo (4,4% e 94 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente). Além disso, similar ao observado no presente estudo, o trabalho de Andreu-Ballester e colaboradores (2012) não encontrou diferenças estatisticamente significativas entre os gêneros.

A comparação entre as medidas células TCR  $\gamma\delta^+$  obtidas em tubos distintos (Tubo 1: CD3/CD4/CD8/CD45 e Tubo 4: TCR  $\alpha\beta$ /TCR  $\gamma\delta$ /CD3/CD45) apresentaram correlação excelente tanto para valores relativos quanto para valores absolutos. Quando os gêneros foram avaliados, o coeficiente de correlação intraclasse também se mostrou excelente para valores relativos e absolutos em ambos os gêneros. Logo, devido aos valores obtidos nos tubos 1 e 4 apresentarem uma excelente correlação, a obtenção dos valores das células TCR  $\gamma\delta^+$  pode ser estimada por meio do fenótipo duplo-negativo para os marcadores CD4 e CD8 não necessitando ser avaliada com a utilização do anticorpo específico para o receptor.

Como pode ser observado na Tabela 15 deste trabalho, a contagem relativa e absoluta de linfócitos B foi de 6,3% a 20,8% e de 112 a 622 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente. Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados em trabalhos realizados por diferentes autores (Tabela 26) (DHALIWAL et al., 1995; SANTAGOSTINO et al., 1999; URASSA et al., 2003; BISSET et al., 2004; YAMAN et al., 2005; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; KLOSE et al., 2007). Com relação aos gêneros, na maioria dos estudos não foi observada diferença estatisticamente significativa (SANTAGOSTINO et al., 1999; BISSET et al., 2004; YAMAN et al., 2005; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; KLOSE et al., 2007). Diferentemente do relatado na literatura, o presente estudo encontrou diferenças significativas para os valores absolutos das células B CD19+. No estudo de Urassa e colaboradores (2003) também foram observadas tais diferenças entre os gêneros, no entanto, nesse estudo encontrou-se diferenças tanto para valores relativos quanto para absolutos.

Tabela 26 – Comparação da contagem relativa e absoluta de linfócitos B.

<b>Linfócitos B %</b>	<b>Linfócitos B /mm<sup>3</sup></b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
5,0 – 22,4	130 – 716	Malásia	DHALIWAL et al., 1995
5,0 – 27,0	110 - 890	Arábia Saudita	SHAHABUDDIN, 1995
5,1 – 20,8	82 - 560	China	KAM et al., 1996
5,0 – 20,0	72 – 520	Itália	SANTAGOSTINO et al., 1999
4,0 – 24,0	56 – 436	Etiópia	TSEGAYE et al., 2003
6,0 – 21,0	88 – 654	Tanzânia	URASSA et al., 2003
4,7 – 19,13	72 – 460	Suíça	BISSET et al., 2004
6,0 – 22,0	50 – 610	Kuwait	KAABA et al., 2004
5,0 – 21,0	80 – 490	Alemanha	JENTSCH-ULLRICH et al., 2005
3,9 – 20,79	74 – 586	Turquia	YAMAN et al., 2005
7,0 – 22,0	148 – 658	Burkina Faso	KLOSE et al., 2007
6,0 – 14,0	100 – 300	Malásia	MANDALA et al., 2010
6,3 - 20,8	112 – 622	Brasil	Presente estudo

Na avaliação das células com fenótipo CD19+CD20+ e das células CD19+ totais, observou-se que as células avaliadas pelo último marcador aparecem em maior frequência. Esse fato sugere a presença de células no sangue periférico que são CD19 positivas, mas que não expressam CD20 (Figura 20).

Bisset e colaboradores (2004) também avaliaram a frequência de células CD19+CD20+ em sangue periférico e encontraram os intervalos de referência de 4,63 a 21,0% e de 66 a 259 células/mm<sup>3</sup>, os quais corroboram aos valores estabelecidos no presente trabalho (6,3% a 20,8% – Tabela 16). Entretanto, o presente estudo apresenta uma faixa mais ampla para o valor absoluto (110 a 618 células/mm<sup>3</sup> – Tabela 16) quando comparado com o estudo de Bisset e colaboradores (2004). Com relação aos gêneros, semelhante ao observado no presente estudo, Bisset e colaboradores (2004), também não observaram diferenças na contagem das células positivas para CD19, mas negativas para CD20.

Os intervalos de referência das células CD19+CD20- encontrados no presente estudo foram 0 a 1,3% e 0 a 23 células/mm<sup>3</sup> (Tabela 17). Diferente do observado para as células CD19+CD20+, nas células CD19+CD20- não foi observada diferença estatística tanto para valores relativos quanto para absolutos entre os gêneros. Com relação à presença das células CD19 positivas e CD20 negativas no sangue periférico há duas hipóteses. Na primeira, sugere-se que essas células sejam imaturas. Os estágios de maturação das células B compreendem os estágios pró-B, pré-B-I, pré-B-II, B imatura e célula B madura/virgem (JAFFE et al., 2008; PEREZ-ANDRES et al., 2010). No entanto, as células observadas não são compatíveis com o estágio pré-B-II e nem B imatura, visto que, nessas fases, já existe a expressão de CD20. A avaliação fenotípica sugere que essas células não estejam no estágio pró-B, visto que, nessa fase, a expressão de CD19 encontra-se ausente (PEREZ-ANDRES et al., 2010). Assim, as células encontradas poderiam estar no estágio pré-B-I, visto que, essas células são positivas para CD19 e negativas para CD20 (PEREZ-ANDRES et al., 2010). Contudo, é incomum a presença de células B em estágios precoces no sangue periférico, com exceção dos casos de leucemia linfoblástica aguda nos quais essas células são encontradas na circulação normalmente em grandes quantidades. A segunda hipótese sugere que essas células sejam plasmablastos precoces, pois, a presença de CD19 e a ausência de CD20 são compatíveis com esse estágio de maturação. Além disso, os plasmablastos precoces podem ser encontrados na circulação transitariamente até chegarem aos nichos aos quais foram recrutados (mucosas ou medula óssea) (JOURDAN et al., 2009). Todavia, é necessária a avaliação de outros marcadores celulares para definir o fenótipo completo dessas células e assim confirmar o estágio maturacional que se encontram para enfim definir o exato tipo celular.

Os valores relativos encontrados para as células NK totais (CD16+CD56+CD3-) no presente estudo foram 3,7 a 28,5% e 82 a 760 células/mm<sup>3</sup> (Tabela 18). Esses valores foram semelhantes aos observados nos trabalhos de diferentes autores (Tabela 27) com exceção dos valores observados na Turquia, os quais apresentaram um intervalo de referência mais estreito. Essa diferença pode estar relacionada a fatores étnicos ou metodológicos. Além das variações metodológicas citadas anteriormente, existe variabilidade na quantidade de células NK, de acordo com o fenótipo avaliado. Alguns autores (KAM et al., 1996; SANTAGOSTINO et al., 1999; CHNG; TAN; KUPERAN, 2004;

YAMAN et al., 2005) avaliaram as células por meio do fenótipo CD3 - CD56+ e/ou CD16+; outros (DHALIWAL et al., 1995; SHAHABUDDIN, 1995; TSEGAYE et al., 2003; URASSA et al., 2003; BISSET et al., 2004; JENTSCH-ULLRICH et al., 2005; MANDALA et al., 2010), incluindo o presente estudo, avaliaram a negatividade para CD3 e a dupla positividade, tanto para CD56 quanto para CD16. A diferença entre os gêneros não foi observada no estudo de Kam e colaboradores (1996) e de Yaman e colaboradores (2005). Entretanto, o presente estudo corrobora os dados encontrados nos estudos de Santagostino e colaboradores (1999) e Chng, Tan e Kuperan (2004), nos quais foram observadas diferenças significativas nos valores relativos e absolutos. Ainda, houve estudos que observaram diferenças apenas para os valores relativos (URASSA et al., 2003; BISSET et al., 2004). Além disso, Jentsch-Ullrich e colaboradores (2005) encontraram diferenças significativas para os valores relativos, no entanto, isso apenas foi observado nos indivíduos com idade inferior a 50 anos.

No trabalho realizado por Pasqualetti e colaboradores (2003), a quantificação das células NK em sangue periférico em indivíduos naturais da Itália apresentou valores relativos e absolutos de  $11,69 \pm 4,71\%$  e de  $230,6 \pm 108,4$  células/mm<sup>3</sup>, respectivamente. No mesmo trabalho, os valores encontrados para indivíduos naturais das Filipinas foram estatisticamente superiores ao italiano:  $30,99 \pm 10,61\%$  e  $756,4 \pm 280,7$  células/mm<sup>3</sup>. Essa grande diferença foi atribuída a fatores genéticos, pois, espera-se que indivíduos que vivam na mesma região geográfica sejam expostos aos mesmos tipos antígenos, minimizando esse tipo de influência. A média encontrada no presente estudo tanto para valores relativos quanto para absolutos ( $11,8 \pm 6,2\%$  e  $273 \pm 176$  células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) é semelhante ao encontrado nos indivíduos italianos.

Tabela 27 – Comparação da contagem relativa e absoluta das células NK.

<b>NK %</b>	<b>NK /mm<sup>3</sup></b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
8,0 – 37,4	227 – 1.354	Malásia	DHALIWAL et al., 1995
4,0 – 29,0	90 – 690	Arábia Saudita	SHAHABUDDIN, 1995
7,1 – 38,0	130 – 938	China	KAM et al., 1996
4,0 – 28,0	73 – 654	Itália	SANTAGOSTINO et al., 1999
5,0 – 29,0	62 – 549	Etiópia	TSEGAYE et al., 2003
6,0 – 35,0	118 – 830	Tanzânia	URASSA et al., 2003
5,35 – 30,93	77 – 427	Suíça	BISSET et al., 2004
6,0 – 37,0	115 – 1.009	China, Malásia e Índia	CHNG; TAN; KUPERAN, 2004
4,0 – 22,0	60 – 580	Kuwait	KAABA et al., 2004
0,1 – 13,2	3,08 – 367	Turquia	YAMAN et al., 2005
5,0 – 32,0	80 – 690	Alemanha	JENTSCH-ULLRICH et al., 2005
6,0 – 26,0	100 – 700	Malásia	MANDALA et al., 2010
3,7 – 28,5	82 – 760	Brasil	Presente estudo

Além da quantificação do total de células NK, o presente estudo realizou a distinção entre as células maduras e imaturas presentes em sangue periférico. As células imaturas apresentaram intervalos de referência de 0,08% a 1,1% e de 1 a 23 células/mm<sup>3</sup> (Tabela 18) e as células maduras de 3,1% a 27,4% e de 70 a 745 células/mm<sup>3</sup> (Tabela 19). No entanto, até o presente momento, não foram encontrados estudos que avaliassem separadamente a quantidade de células NK maduras e imaturas em sangue periférico. Sabe-se que essa população compreende cerca de 10% do total de células NK do sangue periférico (FERNANDEZ; GUARÍN; LOPEZ, 2007; GIBSON; SWERDLOW; FELGAR, 2011).

Até o presente momento, poucos trabalhos avaliaram o intervalo de referência das células NKT. O estudo de Yao e colaboradores (2008), realizado na China, encontrou o intervalo de referência do valor relativo de 0,78% a 11,71%. Esse estudo não avaliou a presença de diferença entre os gêneros. Por outro lado, o estudo de Rojas-Pandales e colaboradores (2007), realizado no México, apresentou os valores dessa população celular apenas relacionado aos gêneros. A faixa de referência encontrada foi semelhante ao encontrado no presente estudo. Para o gênero masculino, o intervalo do valor relativo foi de 0,1% a 11% e o do valor absoluto foi de 2,1 células/mm<sup>3</sup> a 323,1 células/mm<sup>3</sup>; para o gênero feminino, o intervalo do valor relativo foi de 0% a 11,3% e o de valor absoluto 2,0 células/mm<sup>3</sup> a 209,8 células/mm<sup>3</sup>. Tanto no estudo realizado no México quanto no presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os gêneros.

Apesar de a metodologia ter sido validada no estudo, há falta de padronização interlaboratorial no que diz respeito às técnicas laboratoriais utilizadas na quantificação das células linfoides por citometria de fluxo e a variada forma de apresentação dos resultados nos diversos estudos dificultou a comparação com os valores obtidos no presente estudo. Ainda assim, as diferenças encontradas podem estar relacionadas à faixa etária, à descendência étnica e racial e a fatores ambientais das populações estudadas. Dessa forma, cada laboratório deve estabelecer o valor de referência referente a sua população e com as técnicas laboratoriais utilizadas na rotina.

## 7 CONCLUSÕES

✓ A quantificação das células linfoides em indivíduos adultos saudáveis por citometria de fluxo pelo método de plataforma dupla foi validada neste estudo por meio da comparação dos valores relativos obtidos na análise das células no citômetro de fluxo FACSCanto II e no citômetro FACSCalibur e, também, por meio da comparação dos valores relativos e absolutos obtidos em dois contadores hematológicos, além da comparação entre a consistência dos valores relativos obtidos no citômetro de fluxo e no contador hematológico. Essa validação foi de extrema importância para os resultados do estudo, visto que as considerações referentes ao uso de plataforma única e dupla são controversas. Além disso, a avaliação da reprodutibilidade de diversos grupos celulares contribuiu para a validação dos resultados.

✓ Para a determinação das células TCR  $\gamma\delta$  positivas não é essencial a utilização do anticorpo específico contra o receptor, pois os resultados mostraram que esses valores podem ser estimados por meio do fenótipo CD3+ CD4 - CD8 -.

✓ Os intervalos de referência para os valores relativos e absolutos encontrados para as células linfoides nos indivíduos saudáveis naturais de Santa Catarina foram CD3+ de 51,3 a 83,5% e de 718 a 2494 células/mm<sup>3</sup>; CD4+ de 24,4 a 54,2% e de 456 a 1492 células/mm<sup>3</sup>; CD8+ de 12,8 a 40,2% e de 272 a 1144 células/mm<sup>3</sup>; relação T CD4+/T CD8+ de 0,68 a 3,61; CD4+ CD8+ duplo-positiva de 0,01 a 3,6% e de 2 a 88 células/mm<sup>3</sup>; TCR  $\alpha\beta$ + de 44,3 a 77% e de 855 a 2384 células/mm<sup>3</sup>; TCR  $\gamma\delta$  de 0,99 a 15,9% e de 19 a 345 células/mm<sup>3</sup>; CD3+ CD4-CD8- de 1,2 a 13,3% e de 28 a 292 células/mm<sup>3</sup>; CD19+ de 6,3 a 20,8% e de 112 a 622 células/mm<sup>3</sup>; CD19+CD20+ de 6,3 a 20,8% e de 110 a 618 células/mm<sup>3</sup>; CD19+CD20- de 0,001 a 1,3% e de 0 a 23 células/mm<sup>3</sup>; NK maduras de 3,1 a 27,4% e de 70 a 745 células/mm<sup>3</sup>; NK imaturas de 0,08 a 1,1% e de 1 a 23 células/mm<sup>3</sup>; NK totais de 3,7 a 28,5% e de 82 a 760 células/mm<sup>3</sup> e NKT de 0,9 a 21,4% e de 18 a 488 células/mm<sup>3</sup>.

✓ Com relação aos gêneros, as células CD3+, CD4+, CD4+CD8+, TCR  $\alpha\beta$ + e CD19+CD20- apresentaram diferenças significativas entre homens e mulheres tanto para valores relativos quanto para absolutos.

Para todos esses tipos celulares o gênero feminino apresentou valores mais elevados.

✓ As células CD8+ e CD19+ apresentaram diferenças apenas relacionadas ao valor absoluto. Os valores superiores também foram observados para o gênero feminino.

✓ As NK maduras, imaturas e NK totais também apresentaram diferenças significativas entre homens e mulheres, tanto para o valor relativo quanto para o absoluto. Foram observados valores superiores para o gênero masculino.

✓ Na relação T CD4+/T CD8+ e para as células NKT, TCR  $\gamma\delta$ +, CD3+CD4-CD8- e CD19+CD20+ não foram observadas diferenças estatísticas quando os gêneros foram avaliados.

✓ A comparação entre o intervalo de referência das populações linfocitárias obtida em indivíduos naturais do Estado de Santa Catarina com os de indivíduos de outros estados e também de outros países afirmou a necessidade de se estabelecer intervalos de referência próprios para a população de nosso estudo. Além disso, observou-se a presença de diferenças significativas entre os gêneros masculino e feminino em algumas subpopulações celulares, e, dessa forma, sugere-se a necessidade de avaliação do estabelecimento de intervalos de referência distintos entre os gêneros para aqueles tipos celulares nos quais possa haver diferenças na identificação do correto diagnóstico e/ou da conduta terapêutica.

## 8 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos neste estudo comparados aos dados apresentados na revisão da literatura e na discussão, as principais perspectivas de trabalho são:

Separação das células CD4+CD8+ duplo-positivas em três subpopulações (CD4+CD8 $\alpha\beta$ ++, CD4++CD8 $\alpha$ + e CD4++CD8 $\alpha\beta$ ++);

Avaliação das células CD4+CD8+ duplo-positivas em processos patológicos, principalmente em indivíduos infectados pelo vírus HIV;

Caracterização fenotípica completa das células CD19+ CD20 negativas.



## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 545p.

ABE-SANDES, K.; SILVA, W. A.; ZAGO JR, M. A. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. **Human Biology**, v. 1, p. 77-86, 2004.

AINA, O.; DADIK, J.; CHARURAT, M.; AMANGAMAN, P.; GURUMDI, S.; MANG, E.; GUYIT, R.; LAR, N.; DATONG, P.; DANIYAM, C.; KANKI, P.; ABIMIKU, A. Reference Values of CD4 T Lymphocytes in Human Immunodeficiency Virus-Negative Adult Nigerians. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 4, p. 525-530, 2005

ALAMOOTI, A. A.; ARDALAN, F. A.; ABDOLAH, A.; ZEIDI, M. Determination of Lymphocyte Subsets Reference Values in Healthy Iranian Men by a Single Platform Flow Cytometric Method. **Cytometry**, v. 77, p. 890-894, 2010.

ALLMAN, D.; PILLAI, S. Peripheral B cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 149-157, 2008.

AMATYA, R.; VAJPAYEE, M.; KAUSHIK, S.; KANSWAL, S.; PANDEY, R. M.; SETHA, P. Lymphocyte immunophenotype reference ranges in healthy Indian adults: implications for management of HIV/AIDS in India. **Clinical Immunology**, v. 112, p. 290- 295, 2004.

ANDREU-BALLESTER, J. C.; GARCÍA-BALLESTEROS, C.; BENET-CAMPOS, C.; AMIGÓ, V.; ALMELA-QUILIS, A.; MAYANS, J.; BALLESTER, F. Values for  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-Lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ Subsets in Healthy Adult Subjects: Assessment by Age and Gender. **Cytometry Part B**, v. 82B, p. 238–244, 2012.

ARCAVI, L.; BENOWITZ, N.L. Cigarette Smoking and Infection. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, p. 2206-2216, 2004.

BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W. **Aplicação Prática em Citometria de Fluxo**. 1º ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 73p.

BECKNELL, B.; CALIGIURI, M. A. Natural killer cells in innate immunity and cancer. **Journal of Immunotherapy**, v. 31, n. 8, p. 685-692, 2008.

BISSET, L. R.; LUNG, T. L.; KAELIN, M.; LUDWIG, E.; DUBS, R. W. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. **European Journal of Haematology**, v. 72, p. 203-212, 2004.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. A note on the use of the intraclass correlation coefficient in the evaluation of agreement between two methods of measurement. **Computers in Biology and Medicine**, v.20, n. 5, p. 337-340, 1990.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S33-S40, 2010.

BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Demográfico, 2010. Disponível em:  
<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=sc>> Acesso em: 30 de dezembro de 2012

CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461-469, 2008.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciência e Cultura**, v. 51, p. 166-174, 1999.

CALVELLI, T.; DENNY, T. N.; PAXTON, H.; GELMAN, R.; KAGAN, J. Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping: A Report From The National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. **Cytometry**, v. 14, p. 702-714, 1993.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3-23, 2010.

CHAUHAN, N. K.; VAJPAYEE, M.; MOJUMDAR, K.; SINGH, R.; SINGH, A. Study of CD4+CD8+ Double Positive T-Lymphocyte Phenotype and Function in Indian Patients Infected With HIV-1. **Journal of Medical Virology**, v. 84, p. 845–856, 2012.

CHEN, Z. W. Immune biology of Ag-specific  $\gamma\delta$  T cells in infections. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 14, p. 2409-2417, 2011.

CHEN, Z. W.; LETVIN, N. L.  $V\gamma 2V\delta 2+$  T cells and anti-microbial immune responses. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 491-498, 2003.

CHNG, W. J.; TAN, G. B.; KUPERAN, P. Establishment of Adult Peripheral Blood Lymphocyte Subset Reference Range for an Asian Population by Single-Platform Flow Cytometry: Influence of Age, Sex, and Race and Comparison with Other Published Studies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 168-173, 2004.

CLSI. **Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition**. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DHALIWAL, J. S.; BALASUBRAMANIAM, C. K.; GILL, H. K.; NASURUDDIN, B. A. Reference ranges for lymphocyte subsets in a defined Malaysian population. **Singapore Medical Journal**, v. 36, p. 288-291, 1995.

EXLEY, M. A.; HOU, R.; SHAULOV, A.; DELLABONA, P.; CASORATI, G.; AKBARI, O.; AKMAN, H. O.; GREENFIELD, E. A.; GUMPERZ, J. E.; BOYSON, J. E.; BALK, S. P.; WILSON, S. B. Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells

with a monoclonal antibody specific for the TCR alphachain CDR3 loop. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 1756–1766, 2008.

FEHNIGER, T. A.; COOPER, M. A.; NUOVO, G. J.; CELLA, M.; FACCHETTI, F.; COLONNA, M.; CALIGIURI, M. A. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 3052-3057, 2003.

FERNANDEZ, M. E. M.; GUARÍN, C. J. M.; LOPEZ, M. T. R. Células NK: generalidades y papel durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). **Iatreia**, v. 20, n. 1, p. 47-63, 2007.

FUENTES-ARDERIU, X.; MAS-SERRA, R.; ALUMÀ -TRULLAS, A.; MARTÍN-MARCET, M. I.; DOT-BACH, D. Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 7, p. 778-782, 2004.

FRENCH, J. D.; ROARK, C. L.; BORN, W. K.; O'BRIEN, R. L. Gammadelta T lymphocyte homeostasis is negatively regulated by beta2-microglobulin. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 1892-1900, 2009.

FREUD, A. G.; YOKOHAMA, A.; BECKNELL, B.; LEE, M. T.; MAO, H. C.; FERKETICH, A. K.; CALIGIURI, M. A. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 4, p. 1033-1043, 2006.

GIBSON, S. E.; SWERDLOW, S. H.; FELGAR, R. E. Natural killer cell subsets and natural killer-like T-cell populations in benign and neoplastic B-cell proliferations vary based on clinicopathologic features. **Human Pathology**, v. 42, n. 5, p. 679-687, 2011.

GIORGI, J. V.; CHENG, H. L.; MARGOLICK, J. B.; BAUER, K. D.; FERBAS, J.; WAXDAL, M.; SCHMIDT, I.; HULTIN, L. E.;

JACKSON, A. L.; PARK, L.; TAYLOR, J. M. G. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. Quality control in the flow cytometric measurement of lymphocyte subsets: The multicenter AIDS to cohort study experience. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 173-186, 1990.

GIRARDI, M. Immunosurveillance and immunoregulation by  $\gamma\delta$  T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 25-31, 2006.

GODFREY, D. I.; HAMMOND, K. J. L.; POULTON, L. D.; SMYTH, M. J.; BAXTER, A. G. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 573-583, 2000.

GODFREY, D. I.; MACDONALD, H. R.; KRONENBERG, M.; SMYTH, M. J.; VAN KAER, L. NKT cells: what's in a name? **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 231-237, 2004.

GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G.; SCHMIEGH, J.; BERRAONDO, P.; OCHOA, L.; TSUJI, M. The involvement of CD1d-restricted NKT cells in infectious processes. **Inmunología**, v. 21, n. 3, p. 145-155, 2002.

GUIDI, G. C.; SALVAGNO, G. L. Reference intervals as a tool for total quality management. **Biochemia Medica**, v. 20, n. 2, p. 165-172, 2010.

HAMMOND, K. J. L.; PELIKAN, S. B.; CROWE, N. Y.; RANDLE-BARRETT, E.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; SMYTH, M. J.; VAN DRIEL, I. R.; SCOLLAY, R.; BAXTER, A. G.; GODFREY, D. I. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 11, p. 3768-3781, 1999.

HOWARD, R. R.; FASANO, C. S.; FREY, L.; MILLER, C. H. Reference Intervals of CD3, CD4, CD8, CD4CD8, and Absolute CD4 Values in Asian and Non-Asian Populations. **Cytometry**, v. 26, p. 231-232, 1996.

HOWE, R.; DILLON, S.; ROGERS, L.; PALMER, B.; MAWHINNEY, S.; BLYVEIS, N.; SCHLICHTEMEIER, R.; D'SOUZA, M.;

- INGOLDBY, L.; HARWOOD, J. E. F.; RIETMEIJER, C.; RAY, G.; CONNICK, E.; WILSON, C. C. Phenotypic and Functional Characterization of HIV-1-Specific CD4+CD8+ Double-Positive T Cells in Early and Chronic HIV-1 Infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 50, p. 444-456, 2009.
- HUGHES, D. A.; HASLAM, P. J.; TOWNSEND, P. J.; TURNER-WARWICK, M. Numerical and functional alterations in circulatory lymphocytes in cigarette smokers. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 61, p. 459-466, 1985.
- HULTIN, L. E.; CHOW, M.; JAMIESON, B. D.; O’GORMAN, M. R. G.; MENENDEZ, F. A.; BOROWSKI, L.; DENNY, T. N.; MARGOLICK, J. B. Comparison of Interlaboratory Variation in Absolute T-Cell Counts by Single-Platform and Optimized Dual-Platform Methods. **Cytometry Part B**, v. 78B, p. 194–200, 2010.
- JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L. STEIN, H.; CAMPO, E.; PILERI, S. A.; SWERDLOW, S. H. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L. JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. (Eds): **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. International Agency for research on Cancer (IARC): Lyon, 2008. 4th., 158p.
- JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 37-53, 1999.
- JENTSCH-ULLRICH, K.; KOENIGSMANN, M.; MOHREN, M.; FRANKE, A. Lymphocyte subsets’ reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults - A monocentric German study. **Clinical Immunology**, v. 116, p. 192-197, 2005.
- JIANG, E.; KANG, L.; LU, H. Z.; PAN, X.; LIN, Q.; PAN, Q.; XUE, Y.; WENG, X.; TANG, Y. W. Normal Values for CD4 and CD8 Lymphocyte Subsets in Healthy Chinese Adults from Shanghai. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 811–813, 2004.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. Natural killer cells and immune surveillance. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. S58-S67, 2008.

JOURDAN, M.; CARAUX, A.; DE VOS, J.; FIOL, G.; LARROQUE, M.; COGNOT, C.; BRET, C.; DUPERRAY, C.; HOSE, D.; KLEIN, B. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. **Blood**, v. 114, p. 5173-5181, 2009.

KAABA, S. A.; FADHLI, S. A.; KHAMIS, A. Reference values of lymphocyte subsets in the normal healthy adult Kuwaiti Arab population, **Immunology Letters**, v. 81, p. 199-203, 2002.

KABELITZ, D.; WESCH, D.; HE, W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 5-8, 2007.

KLOSE, N.; COULIBALY, B.; TEBIT, D. M.; NAUWELAERS, F.; SPENGLER, H. P.; KYNAST-WOLF, G.; KOUYATÉ, B.; KRÄUSSLICH, H. G.; BÖHLER, T. T. Immunohematological Reference Values for Healthy Adults in Burkina Faso. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 782-784, 2007.

KOEPSSELL, S. A.; MILLER, J. S.; MCKENNA JR, D. H. Natural killer cells: a review of manufacturing and clinical utility. **Transfusion**, v. 7, p. 1-7, 2012.

LIN, H.; NIEDA, M.; HUTTON, J. F.; ROZENKOV, V.; NICOL, A. J. Comparative gene expression analysis of NKT cell subpopulations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 1, p. 164-73, 2006.

LLINÀS, L.; LÁZARO, A.; DE SALORT, J.; MATESANZ-ISABEL, J.; SINTES, J.; ENGEL, P. Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry. **Immunology Letters**, v. 134, n. 2, p. 113-21, 2011.

LOKEN, M. R.; MEINERS, H.; TERSTAPPEN, L. W. M. Comparison of sample preparation techniques for flow cytometric analysis of immunofluorescence. **Cytometry Supplement**, v. 2, n. 53, 1988.

LÚCIO, P.; PARREIRA, A.; VAN DEN BEEMD, M. W. M.; VAN LOCHEM, E. G.; VAN WERING, E. R.; BAARS, E.; PORWIT-MacDONALD, A.; BJORKLUND, E.; GAIPA, G.; BIONDI, A.; ORFAO, A.; JANOSSY, G.; VAN DONGEN, J. J. M.; SAN MIGUEL, J.F. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. **Leukemia**, v.13, p. 419-427, 1999.

MACEY, M. G. Principles of Flow Cytometry In: MACEY, M. G. **Flow Cytometry: Principles and Applications**. Totowa: Humana Press Inc., 2007.

MACHADO, P. R. L.; ARAUJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia.**, v. 79, n. 6, p. 647-662, 2004.

MAINI, M.K.; GILSON, R. J. C.; CHAVDA, N.; GILL, S.; FAKOYA, A.; ROSS, E. J.; PHILLIPS, A. N.; WELLER, I. V. D. Reference ranges and sources of variability of CD4 counts in HIV-seronegative women and men. **Genitourinary Medicine**, v. 72, p. 27-31, 1996.

MANDALA, W. L.; MACLENNAN, J. M.; GONDWE, E. N.; WARD, S. A.; MOLYNEUX, M. E.; MACLENNAN, C. A. Lymphocyte subsets in healthy Malawians: Implications for immunologic assessment of HIV infection in Africa. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 1, p. 203-208, 2010.

MATESANZ-ISABEL, J.; SINTES, J.; LLINÀS, L.; DE SALORT, J.; LÁZARO, A.; ENGEL, P. New B-cell CD molecules. **Immunology Letters**, v. 134, n. 2, p. 104-12, 2011.

McCOY; J. P.; OVERTON, W. R. Quality Control in Flow Cytometry for Diagnostic Pathology: II. A conspectus of Reference Ranges for Lymphocyte Immunophenotyping. **Cytometry**, v. 18, p.129-139, 1994.

MENARD, D.; MANDENG, M. J.; TOTHY, M. B.; KELEMBHO, E. K.; GRESENGUET, G.; TALARMIN, A. Immunohematological Reference Ranges for Adults from the Central African Republic.

**Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 3, p. 443-445, 2003.

MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MILI, F.; FLANDERS, W. D.; BORING, J. R.; ANNEST, J. L.; DESTEFANO, F. The associations of race, cigarette smoking, and smoking cessation to measures of the immune system in middle-aged men. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 59, p. 187-200, 1991.

MILLER, L. G.; GOLDSTEIN, G.; MURPHY, M.; GINNS, L. C. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. **Chest**, v. 82, p. 526-529, 1982.

**NCCLS. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline.** NCCLS document H42-A (ISBN 1-56238-364-7). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 USA, 1998.

NGOWI, B. J.; MFINANGA, S. G.; BRUUN, J. N.; MORKVE, O. Immunohaematological reference values in human immunodeficiency virus-negative adolescent and adults in rural northern Tanzania. **BMC Infectious Disease**, v. 9, p. 1-7, 2009.

OLADEPO, D. K.; IDIGBE, E. O.; AUDU, R. A.; INYANG, U. S.; IMADE, G. E.; PHILIP, A.O.; OKAFOR, G. O.; OLALEYE, D.; MOHAMMED, S. B.; ODUNUKWE, N. N.; HARRY, T. O.; EDYONG-EKPA, M.; IDOKO, J.; MUSA, A. Z.; ADEDEJI, A.; NASIDI, A.; YA'ABA, Y.; IBRAHIM, K. Establishment of Reference Values of CD4 and CD8 Lymphocyte Subsets in Healthy Nigerian Adults. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, p. 1374-1377, 2009.

OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M. E. **Gestão da fase analítica do laboratório : como assegurar a qualidade na prática**. 1.ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010.

ORANGE, J. S.; BALLAS, Z. K. Natural killer cells in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 118, n. 1, p. 1-10, 2006.  
PAPAMICHAIL, M.; PEREZ, S.A.; GRITZAPIS, A. D.;  
BAXEVANIS, C. N. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 3, p. 176-86, 2004.

PAREL, Y.; CHIZZOLINI, C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 3, p. 215-220, 2004.

PARRA, M. Epigenetic events during B lymphocyte development. **Epigenetics**, v. 4, n. 7, p. 462-468, 2009.

PARSLOW, T. G. Linfócitos e tecidos linfóides. In: PARSLOW, T. G.; STITES, D. P.; TERR, A. I.; IMBODEN, J. B. **Imunologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 3, p. 34, 47 e 48.

PASQUALETTI, D.; GHIRARDINI, A.; CAFOLLA, A.; BIFFONI, M.; COLUZZI, S.; VAGLIO, S.; GIRELLI, G. Lymphocyte T subsets and natural killer cells in Italian and Philippino blood donors, **Vox Sanguinis**, v. 84, p. 68-72, 2003.

PEREZ-ANDRES, M.; PAIVA, B.; NIETO, W. G.; CARAUX, A.; SCHMITZ, A.; ALMEIDA, J.; VOGT, R. F.; MARTI, G. E.; RAWSTRON, A. C.; VAN ZELM, M. C.; VAN DONGEN, J. J.; JOHNSEN, H. E.; KLEIN, B.; ORFAO, A. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B**, v. 78, p. S47-S60, 2010.

PIAZZA, W. F. **Santa Catarina: história da gente**. Ed. Lunardelli, 1989. Disponível em <  
<http://www.sc.gov.br/conteudo/santacatarina/historia/paginas/02reconhecimento.html>>. Acesso em 20 de novembro de 2012.

PRINS, M.; ROBERTSON, J. R.; BRETTE, R. P.; AGUADO, I. H.; BROERS, B.; BOUFASSA, F.; GOLDBERG, D. J.; ZANGERLE, R.; COUTINHA, R. A.; VAN DEN HOEK, A. Do gender differences in CD4 cell counts matter? **AIDS**, v. 13, p. 2361–2364, 1999.

QOUZI, A. A.; SALAMAH, A. A.; RASHEED, R. A.; MUSALAM, A. A.; KHAIRY, K. A.; KHEIR, O.; AJAJI, S. A.; HAJEER, A. H. Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes in Saudi Men. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 279-281, 2002.

RAHEMTULLAH, A.; REICHARD, K. K.; PREFFER, F. I.; HARRIS, N. L.; HASSERJIAN, R. P. A. Double-Positive CD4+CD8+ T-Cell Population Is Commonly Found in Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 26, p. 805-814, 2006.

RAY, K.; GUPTA, S. M.; BALA, M.; MURALIDHAR, S.; KUMAR, J. CD4/CD8 lymphocyte counts in healthy, HIV-positive individuals & AIDS patients. **Indian Journal of Medical Research**, v. 124, p. 319-330, 2006.

REIMANN, K. A.; O’GORMAN, M. R. G.; SPRITZLER, J.; WILKENING, C.; SABATH, D. E.; HELM, K.; CAMPBELL, D. E.; and The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. Multisite comparison of CD4 and CD8 Tlymphocyte counting by single- *versus* multiple-platform methodologies: Evaluation of Beckman coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 344-351, 2000.

ROJAS-PANDALES, F.; BOLAÑOS, N.; MERCADO, M.; GONZÁLEZ, J. M.; CUÉLLAR, A.; CIFUENTES-ROJAS, C. Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá. **Acta Médica Colombiana**, v. 32, n. 3, p. 124-128, 2007.

SANDERSON, J. P.; WALDBURGER-HAURI, K.; GARZÓN, D.; MATULIS, G.; MANSOUR, S.; PUMPHREY, N. J.; LISSIN, N.; VILLIGER, P. M.; JAKOBSEN, B.; FARALDO-GOMEZ, J. D.;

GADOLA, S. D. Natural variations at position 93 of the invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18  $\alpha$  chain of human iNKT-cell TCRs strongly impact on CD1d binding. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 1, p. 248-55, 2012.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Sistema Único de Saúde. **Plano Diretor de Regionalização: PDR 2008**, Secretaria de Estado da Saúde – Florianópolis: IOESC, 2008. 128p

SANTAGOSTINO, A.; GARBACCIO, G.; PISTORIO, A.; BOLIS, V.; CAMISASCA, G.; PAGLIARO, P.; GIROTTO, M. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. **Haematologica**, v. 84, p. 499-504, 1999.

SAKAMOTO, A.; OISHI, Y.; KURASAWA, K.; KITA, Y.; SAITO, Y.; IWAMOTO, I. Characteristics of T-cell receptor V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 T cells, a human counterpart of murine NK1 T cells, from normal subjects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 5, p. S445-S451, 1999.

SCHNIZLEIN-BICK, C. T.; SPRITZLER, J.; WILKENING, C. L.; NICHOLSON, J. K. A.; O'GORMAN, M. R. G. Site Investigators, and The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. Evaluation of TruCOUNT absolute-count tubes for determining CD4 and CD8 cell numbers in human immunodeficiency virus- positive adults. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 336-343, 2000.

SEINO, K.; TANIGUCHI, M. NKT Cells: A Regulator in Both Innate and Acquired Immunity. **Current Medicinal Chemistry**. v. 4, n. 1, p. 59-64, 2005a.

SEINO, K.; TANIGUCHI, M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1623-1626, 2005b.

SEPSTRUP, S. E.; SARGENT, J. M. Change from dual- to single-platform reporting of CD4 /CD8 values: experience from a small district

general hospital laboratory. **British Journal of Biomedical Science**, v. 60, n. 2, p. 92-96, 2003.

SHAHABUDDIN, S. Quantitative differences in CD8+ lymphocytes, CD4/CD8 ratio, NK cells and HLA-DR+-activated T cells of racially different male populations. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 75, n. 2, p. 168-170, 1995.

SOLBERG, H. E. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n.7, p. 710-714, 2004.

TARAZONA, R.; DELAROSA, O.; PERALBO, E.; CASADO, J. G.; PEÑA, J.; SOLANA, R. Human NKT cells in health and disease. **Inmunología**, v. 22, n. 4, p. 359-370, 2003.

THAKAR, M. R.; ABRAHAM, P.R.; ARORA, S.; BALAKRISHNAN, P.; BANDYOPADHYAY, B.; JOSHI, A. A.; DEVI, K. R.; VASANTHAPURAM, R.; VAJPAYEE, M.; DESAI, A.; MOHANAKRISHNAN, J.; NARAIN, K.; RAY, K.; PATIL, S. S.; SINGH, R.; SINGLA, A.; PARANJAPE, R. S. Establishment of reference CD4+ T cell values for adult Indian population, **AIDS Research Therapy**, v. 8, p. 2-9, 2011.

TSEGAYE, A.; MESSELE, T.; TILAHUN, T.; HAILU, E; SAHLU, T.; DOORLY, R.; FONTANET, A. L.; RINKE DE WIT, T. F. Immunohematological Reference Ranges for Adult Ethiopians. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 410-414, 1999.

TSEGAYE, A.; WOLDAY, D.; OTTO, S.; PETROS, B.; ASSEFA, T.; ALEBACHEW, T.; HAILU, E.; ADUGNA, F.; MEASHO, W.; DORIGO, W.; FONTANET, A. L.; VAN BAARLE, D.; MIEDEMAB, F. Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians. **Clinical Immunology**, v. 109, p. 338-346, 2003.

TORRES, A. J. L.; ANGELO, A.L.D.; NETTO, E.M.; SAMPAIO, G. P.; SOUZA, D. F. C.; INOCÊNCIO, L. A.; LEMOS, J. A. R.; BRITES, C. Reference Range for T Lymphocytes Populations in Blood Donors

from Two Different Regions in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 221-225, 2009.

UPPAL, S. S.; VERMA, S.; DHOT, P. S. Normal Values of CD4 and CD8 Lymphocyte Subsets in Healthy Indian Adults and the Effects of Sex, Age, Ethnicity, and Smoking. **Cytometry Part B**, v. 52, p. 32-36, 2003.

URASSA, W. K.; MBENA, E. M.; SWAI, A. B.; GAINES, H.; MHALU, F. S.; BIBERFELD, G. Lymphocyte subset enumeration in HIV seronegative and HIV-1 seropositive adults in Dar es Salaam, Tanzania: determination of reference values in males and females and comparison of two flow cytometric methods. **Journal of Immunological Methods**, v. 277, p. 65-74, 2003.

VAN LOCHEM, E. G.; VAN DER VELDEN, V. H. J.; WIND, H. K.; TE MARVELDE, J. G.; WESTERDAAL, N. A. C.; VAN DONGEN, J. M. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry Part B**, v. 60, n. 1, p. 1-13, 2004.

VERDINO, P.; WITHERDEN, D. A.; FERGUSON, M. S.; CORPER, A. L.; SCHIEFNER, A.; HAVRAN, W. L.; WILSON, I. A. Molecular insights into  $\gamma\delta$  T-cell costimulation by an anti-JAML antibody. **Structure**, v. 12, p. 80-89, 2011.

VIVIER, E.; UGOLINI, S.; BLAISE, D.; CHABANNON, C.; BROSSAY, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 4, p. 239-252, 2012.

WORKU, S.; CHRISTENSSON, B.; BJIIRKMAN, A.; ISLAM, D. Higher proportion of CD8+ T cells in the blood in healthy adults from Ethiopia and Bangladesh compared with Sweden. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 618-622, 1997.

WRIGHT, E. M.; ROYSTON, P. Calculating reference intervals for laboratory measurements. **Statistical Methods in Medical Research**. v. 8, p. 93-112, 1999.

YAMAN, A.; ÇETINER, S.; KIBAR, F.; TAŞOVA, Y.; ŞEYDAOĞLU, G.; DÜNDAR, Í. H. Reference ranges of lymphocyte subsets of healthy adults in Turkey. **Medical Principles and Practice**, v. 14, p. 189-193, 2005.

YAO, C.; JIN, Q.; JIANG, L.; TANG, J.; LI, B.. Percentage of natural killer T cells (CD3+CD16+CD56+) in peripheral blood of healthy adults detected. **Journal of Bengbu Medical College**, v. 04, 2008.

ZHENG, N. N.; MCELRATH, M. J.; SOW, P. S.; MESHER, A.; HAWES, S. E.; STERN, J.; GOTTLIEB, G. S.; DE ROSA, S. C.; KIVIAT, N. B. Association between peripheral  $\gamma\delta$  T-cell profile and disease progression in individuals infected with HIV-1 or HIV-2 in West Africa. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 57, n. 2, p. 92-100, 2011.

ZU, Y.; SHAHJAHAN, M.; CHANG, CC. Basic Principles of Flow Cytometry, In: CAGLE, P. T.; ALLEN, T. C. **Basic Concepts of Molecular Pathology**, Springer Science: 2009.



## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Análises Clínicas

Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil

Tel: (048) 3721 8146 Fax: (048) 3721 9542

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Análise do Perfil Imune em Indivíduos Adultos Saudáveis por Citometria de Fluxo.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

#### QUAL OBJETIVO DESTES ESTUDO?

O estudo é um projeto de pesquisa que tem como objetivo avaliar a quantidade de alguns tipos de células presentes no sangue (linfócitos) em indivíduos adultos saudáveis para obtenção de dados referentes a população que reside em Santa Catarina.

#### EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

#### EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

Não, pois a amostra que será coletada do(a) senhor(a) é de sangue periférico e será colhida na mesma punção da doação de sangue, desta forma o procedimento de coleta não traz nenhum desconforto adicional.

#### QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE?

Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.

**TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR?**

Não, por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque a participação do(a) senhor(a) será apenas com a doação da amostra de sangue, que será colhida juntamente com a doação de sangue que estarei realizando.

**MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?**

Todos os resultados dos testes laboratoriais feitos com a amostra do(a) senhor(a) serão sigilosas (não serão divulgadas) e somente serão utilizadas para esta pesquisa.

**COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?**

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: (048) 3721-8146 (Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias)

Pesquisadora: Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira Fone: (048) 9121 1327

E-mail: renatarudolf@gmail.com

Eu, \_\_\_\_\_ confirmo que:

Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;

Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo;

Estou ciente que coletarei uma amostra de sangue periférico para o exame, juntamente com a bolsa de sangue que estarei doando a este centro e que minha identidade não será revelada.

Confirmo ainda que entendi que esta amostra coletada não será utilizada para os outros exames e que apenas é uma amostra que estou doando para pesquisa.

Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Concordo em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Data..../...../.....

\_\_\_\_\_  
Nome do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do entrevistador

\_\_\_\_\_  
Nome do entrevistador

**APÊNDICE B – Valores de Referência das Populações Linfocitárias Estabelecidos no Presente Estudo**

<b>Subpopulação</b>	<b>Relativo</b>	<b>Absoluto</b>	<b>Masculino Relativo</b>	<b>Masculino Absoluto</b>	<b>Feminino Relativo</b>	<b>Feminino Absoluto</b>
T CD3+	51,3 – 83,5	718 – 2494	48,0 – 82,6	735 – 2271	56,8 – 84,1	1259 – 2702
T CD4+	24,4 – 54,2	456 – 1492	23,0 – 52,6	427 – 1372	26,9 – 55,5	538 – 1850
T CD8+	12,8 – 40,2	272 – 1144	12,6 – 39,2	243 – 1068	13,3 – 41,5	291 – 1238
CD4+CD8+	0,01 – 3,6	2 – 88	0,06 – 3,4	2 – 86	0,1 – 4,1	3 – 89
TCR $\alpha\beta$ +	44,3 – 77,0	855 – 2384	43,5 – 76,2	756 – 2056	51,8 – 78,2	975 – 2673
TCR $\gamma\delta$ +	0,99 – 15,9	19 – 345	0,85 – 16,6	17 – 355	0,92 – 14,6	21 – 349
CD3+CD4-CD8-	1,2 – 13,3	28 – 292	1,1 – 14,6	21 – 296	1,2 – 11,4	31 – 282
CD19+	6,3 – 20,8	112 – 622	6,2 – 21,2	108 – 586	5,9 – 20,6	115 – 661
CD19+CD20+	6,3 – 20,8	110 – 618	6,1 – 21,6	101 – 585	5,9 – 20,5	113 – 658
CD19+CD20-	0,001 – 1,3	0 – 23	0,004 – 1,3	0 – 26	0,008 – 1,4	0 – 31
NK imaturas	0,08 – 1,1	1 – 23	0,08 – 1,1	1 – 20	0,04 – 1,2	1 – 25
NK maduras	3,1 – 27,4	70 – 745	4,3 – 31,2	92 – 806	2,8 – 24,1	60 – 663
NK totaisl	3,7 – 28,5	82 – 760	5,0 – 31,3	111 – 829	3,5 – 24,9	65 – 689
NKT	0,9 – 21,4	18 – 488	0,9 – 19,4	20 – 436	0,5 – 21,5	12 – 610
Relação T CD4+/ T CD8+	0,68 – 3,61		0,69 – 3,58		0,61 – 3,79	



**APÊNDICE C – Tabela Comparativa dos Marcadores CD3+, CD4+ e CD8+ entre os Diversos Artigos.**

<b>Referência Local Citômetro Cores Plataforma n Idade Estatística</b>	<b>CD3 %</b>	<b>CD3 mm<sup>3</sup></b>	<b>CD4 %</b>	<b>CD4 mm<sup>3</sup></b>	<b>CD8 %</b>	<b>CD8 mm<sup>3</sup></b>
Yaman et al., 2005 Turquia EPICS XL-MCL 2 cores Dupla 220 (115M, 105 F) 18 – 80 p 2,5% e 97,5%	52,30 – 84,64	725 – 2.960	30,0 -60,34	437 -2.072	17,76 – 39,94	307 -1.184
Santagostino et al., 1999 Itália BD, Coulter, Ortho 2 cores - 968 (532M, 436F) 18 – 70 média ± 2SD/p 2,5% e 97,5%	60 – 87	605 – 2.460	32 – 61	493 –1.666	14 – 43	224 – 1.112
Jentsch-Ullrich et al., 2005 Alemanha FACSCalibur	<50 anos 53 – 83 > 50 anos	<50 anos 780 – 2.240 > 50 anos	<50 anos 30 – 59 > 50 anos	<50 anos 490 – 1.640 > 50 anos	<50 anos 10 – 40 > 50 anos	<50 anos 170 – 880 > 50 anos

2 cores Dupla 100 (50M, 50F) 19 – 85 p 2,5% e 97,5%	54 – 88	670 – 2.180	36 – 66	480 – 1.670	9 – 41	120 – 830
	<50 anos M 52 – 77 F 64 – 82	<50 anos M 750 – 2.240 F 950 – 2.750	<50 anos M 27 – 52 F 33 – 56	<50 anos M 450 – 1240 F 620 – 1990	<50 anos M 11 – 40 F 15 – 36	<50 anos M 190 – 940 F 210 – 820
Thakar et al., 2011 Índia FACSCalibur/EPICS XL-MCL 3 cores Única 1206 (645M, 561F) 18 – 50 p 2,5% e p 97,5%	55 – 81	457 – 3926	27 – 51	448 – 1611		
	M 54 – 81 F 56 – 81	M 776 – 2.785 F 826 – 2.997	M 25 - 49 F 27 - 54	M 381 – 1.565 F 447 – 1.846		
Oladepo et al., 2009 Nigéria Cyflow counter - - 2570 (1363M, 1207F) 18 - >60 p 2,5% e 97,5%				365 – 1.571		145 – 884
				M 351 – 1.455 F 383 – 1.654		M 155 – 863 F 133 – 919
Klose et al., 2007	57 – 80	1.069 – 2.921	30 – 53	631 – 1.696	16 – 35	328 – 1.167

Burkina Faso BD FACScan 3 cores Única 186 (89M, 97F) 18 – 78 p 5% e 95%	M 56 – 79 F 60 – 81	M 1.036 – 2.963 F 1.176 – 2.921	M 26 – 48 F 32 – 53	M 546 – 1.696 F 716 – 1.749	M 17 – 37 F 15 – 35	M 324 – 1.164 F 328 – 1.202
Alamooti et al., 2010 Iran Partec PAS 2 cores Única 142M - média ± 2SD e p 2,5% e 97,5%		681 – 2.030		351 – 1.207		192 – 752
Tsegaye et al., 1999 Etiópia FACScan 2 cores Dupla 485 (280M, 205F) 15 – 45 p 2,5% e 97,5%	M 62.0 – 90.7 F 58.3 – 87.0	854 – 2.556		366 – 1.235	M 23.0 – 60.7 F 17.4 – 50.1	311 – 1.618
Kaaba, Al Fadhli, Khamis, 2002 e Kaaba et al., 2004 Kuwait Coulter EPICS Profile II - -	64 – 85	830 – 2.710 M 780 – 2.850 F 890 – 2.650	34 – 54	450 – 1.650 M 410 – 1.690 F 490 – 1.610	20 – 42	290 – 1.170 M 290 – 1.170 F 290 – 1.170

127 (64M, 63F) 18 - 59 -						
Dhaliwal et al., 1995 Malásia, China e Índia FACSCan 2 cores Dupla 152 (99M, 53F) 13 - 68 p 5% e 95%	53 - 80	988 - 3.912	19 - 46	431 - 1.976	17,6 - 49	385 - 1.808
Dhaliwal et al., 1995 Malásia FACSCan 2 cores Dupla 85 (54M, 31F) 13 - 68 p 5% e 95%	53 - 79,7	1.059 - 4.026	19 - 46	452 - 2.079	17,3 - 42,8	421 - 1.821
Dhaliwal et al., 1995 China FACSCan 2 cores Dupla 40 (26M, 14F) 13 - 68 p 5% e 95%	54,1 - 82,8	711 - 3.646	16,3 - 46,9	268 - 1.709	17 - 53,8	283 - 1.939
Dhaliwal et al., 1995	50,4 - 80	1.268 - 3.709	21,8 - 46	581 - 2.028	20,8 - 52,6	524 - 2.010

Índia FACSCan 2 cores Dupla 27 (19M, 8F) 13 - 68 p 5% e 95%						
Aina et al., 2005 Nigéria Coulter 1 cor Cytosphere technique 864 (94M e 770F) 10 - 69 p 2,5% e 97,5%				547 - 1.327		
Ray et al., 2006 Índia FACS 2 cores - 125 (88M, 37F) 17 - 60 media ± 2SD		M 1.319 - 1.515 F 1.216 - 1.504		M 640 - 734 F 656 - 824		M 550 - 672 F 465 - 627
Chng; Tan; Kuperan, 2004 Ásia FACScalibur	49,0 - 80,0	796 - 2.679	23,0 - 48,2	401 - 1.451	13,4 - 41,0	243 - 1.206

2 cores Única 232 (104, 128F) 16 – 65 média ± 2SD/p 2,5% e 97,5%	M 47,1 – 79,4 F 49,2 – 80,0	M 701 – 2.517 F 800 – 2.751	M 23,0 – 47,0 F 21,5 – 48,8	M 313 – 1.361 F 399 – 1.489	M 14,3 – 40,3 F 12,6 – 41,4	M 228 – 1.243 F 254 – 1.193
Jiang et al., 2004 China Bryte-HS 2 cores Dupla 614 (377M, 237F) 16-50 p 2,5% e 97,5%				415 – 1.189		336 – 780
Uppal; Verma; Dhot, 2003 Índia EPICS-XL 2 cores Dupla 94 (55M, 39F) 18 – 74 média ± 2SD			31 – 50	430 – 1.740	20 – 43	218 – 1.396
			M 34,24 – 43,94 F 37,61 – 45,81	M 395 – 1.627 F 511 – 1.817	M 26,21 – 38,61 F 25,45 – 33,97	M 196 – 1.646 F 264 – 1.065
Howard et al., 1996 Coulter Profile II/ Coulter XL- MCL	60 - 86 caucasianos 60 - 85		33 - 60 caucasianos 32 - 59		10 - 39 caucasianos 10 - 39	

Ásia e não-Ásia - Dupla 215 (109M, 106F) 18 – 67 -	hispanicos 54 - 88 afro-americanos	hispanicos 33 - 57 afro-americanos	hispanicos 9 - 38 afro-americanos				
Maini et al., 1996 Inglaterra Coulter EPICS Profile II 2 cores Dupla 286 (91M, 195F) 16 – 66 média ± 2SD				M 29,5 – 61,6 F 34,4 – 60,5	M 330 – 1.280 F 430 – 1.350	M 15 – 47,5 F 17,4 – 39,6	M 170 – 1.000 F 230 – 830
Urassa et al., 2003 Tanzânia FACScan 3 cores - 214 (107M, 107F) 17 – 61 p 2,5% e 97,5%	53,7 – 82,6	769 – 2.798	27,0 – 55,0	405 – 1.500	15,0 – 41,0	261 – 1.033	
	M 49,8 – 82,3 F 56,0 – 83,0	M 714 – 2.407 F 881 – 3.016	M 24,4 – 55,3 F 31,0 – 55,3	M 383 – 1.321 F 514 – 1.686	M 15,0 – 43,5 F 15,7 – 41,0	M 222 – 1.007 F 300 – 1.300	
Ngowi, et al., 2009				312.2 – 1367.6		168.2–996.8	

Tanzania FACSCount 2 cores Dupla 102 (42M, 60F) - p 2,5% e 97,5%							
Bisset et al., 2004 Suíça EPICS XLMCL 3 cores Única 70 (44M, 26F) - p 2,5% e 97,5%	54,90 – 84,03	536 – 1.787	32,53 – 62,88	309 – 1.139	11,55 – 38,60	137 – 823	
Kam et al., 1996 China FACScan 2 cores Dupla 208 (78M, 130F) 18 – 71 p 2,5% e p 97,5%	54,8 – 83,0	672 – 2.368	23,1 – 51,0	292 – 1.366	17,9 – 47,5	240 – 1.028	
Menard et al., 2003 República Africana Central FACSCalibur 2 cores Dupla 150 (68M, 82F)				M 380 – 1.617 F 386 – 1.454		M 267 – 1.545 F 226 – 1.225	

15 – 60 p 2,5% e p 97,5% Shahabuddin, 1995 Arábia Saudita FACScan - Dupla 115 M 18 – 44 -	61 – 87	890 – 3.200	31 – 55	510 – 1.700	24 – 56	410 – 1.900
Shahabuddin, 1995 Arábia Saudita (caucasianos) FACScan - Dupla 32 M 18 – 44 -	56 – 84	920 – 2.260	30 – 62	460 – 1.430	24 – 48	360 – 1.070
Tsegaye et al., 2003 Etiópia FACScan 2 cores Dupla 52 18 – 40 IC 95%	57 – 85	588 – 2.381	25 – 55	374 – 1.362	11 – 52	146 – 1.449
Amatya et al., 2004 India	42,83 – 88,87		17,56 – 50,63	304 – 1.864	14,25 – 53,43	236 – 1,701

FACSCalibur 2 cores Dupla 200(M 116, F 84) 18 – 55 -	M 42,83 – 85,2 F 50,6 – 88,87		M 17,56 – 50,63 F 21,31 – 50,55	M 304 – 1.385 F 318 – 1.864	M 14,25 – 53,43 F 15,76 – 53,02	M 236 – 1.701 F 258 – 1.434
Mandala et al., 2010 Malásia FACSCalibur 4 cores Dupla 49 20 – 60 p 10% - 90%	63,0 – 83,0	900 – 2.100	29,0 – 51,0	500 – 1.200	20 - 37	300 – 1.000

**APÊNDICE D – Tabela comparativa dos marcadores CD19+, CD16+CD56+ e relação CD4+/CD8+ entre os diversos artigos.**

<b>Referência</b>	<b>CD19</b>	<b>CD19</b>	<b>CD56</b>	<b>CD56</b>	<b>CD4/CD8</b>
<b>País</b>	<b>%</b>	<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>%</b>	<b>mm<sup>3</sup></b>	
<b>Citômetro</b>					
<b>Cores</b>					
<b>Plataforma</b>					
<b>n</b>					
<b>Idade</b>					
<b>Estatística</b>					
Yaman et al., 2005	3,9 – 20,79	74 – 586	0,1 – 13,20	3.08 – 367	1,06 – 2,76
Turquia					
EPICS XL-MCL					
2 cores					
Dupla					
220 (115M, 105 F)					
18 – 80	M 3,98 – 22,18	M 79 – 617	M 0,10 – 12,48	M 3 – 325	M 1,04 – 2,57
p 2,5% e 97,5%	F 3,70 – 20,11	F 62 – 551	F 0,40 – 13,33	F 8 – 449	F 1,08 – 3,00

Santagostino et al., 1999 Itália BD, Coulter, Ortho 2 cores - 968 (532M, 436F) 18 – 70 média ± 2SD/p 2,5% e 97,5% e p 97,5%	5 – 20	72 – 520	4 – 28	73 – 654	
Jentsch-Ullrich et al., 2005 Alemanha FACSCalibur 2 cores Dupla 100 (50M, 50F) 19 – 85 p 2,5% e 97,5%	<50 anos 5 – 21 >50 anos 2 – 19 <50 anos M 8 – 24 F 9 – 20	<50 anos 80 – 490 >50 anos 30 – 450 <50 anos M 140 – 600 F 140 – 450	<50 anos 5 – 32 >50 anos 6 – 32 <50 anos M 4 – 27 F 3 – 24	<50 anos 80 – 690 >50 anos 80 – 730 <50 anos M 70 – 680 F 60 – 570	<50 anos 0,9 – 5,0 >50 anos 1,0 – 5,6 <50 anos M 0.7 – 3.6 F 0.9 – 3.2

Oladebo et al., 2009					
Nigéria					
Cyflow counter					
-					
-					
2570 (1363M, 1207F)					
18 - >60					
p 2,5% e 97,5%					
Klose et al., 2007					
7 - 22					
148 - 658					
7 - 28					
150 - 1.047					
0,9 - 2,8					
Burkina Faso					
BD FACScan					
3 cores					
M 7 - 21					
M 141 - 633					
M 8 - 30					
M 185 - 1.294					
M 0,9 - 2,5					
Única					
F 7 - 23					
F 181 - 716					
F 6 - 21					
F 141 - 681					
F 1,1 - 3,1					
186 (89M, 97F)					
18 - 78					
p 5% e 95%					
Alamooti et al., 2010					
Iran					
Partec PAS					
2 cores					
82 - 500					
91 - 393					
0,77 - 3,70					
Única					
142M					
-					

---

média ± 2SD e p 2,5% e 97,5%					
Tsegaye et al., 1999					
Etiópia					
FACScan					
2 cores					
M 3,0 – 18,0		51–419		M 4,0 – 29,0	
F 3,3 – 27,7				F 5,3 – 29,7	
Dupla				75–581	
485 (280M, 205F)				0,4 – 2,4	
15 – 45					
p 2,5% e 97,5%					
Kaaba, Al Fadhli, Khamis, 2002 e Kaaba et al., 2004					
Kuwait					
Coulter EPICS Profile		6 – 22		50 – 610	
II				4 – 22	
-		M 50 – 610		60 – 580	
-		F 60 – 620		M 20 – 620	
127 (64M, 63F)				F 10 – 540	
18 – 59					
-					

---

Dhaliwal et al., 1995				
Malásia, China e Índia				
FACSCan				
2 cores	5 – 22,4	130 - 716	8 – 37,4	227 – 1.354
Dupla				
152 (99M, 53F)				
13 - 68				
p 5% e 95%				
Dhaliwal et al., 1995				
Malásia				
FACSCan				
2 cores	6 – 25,4	152 – 849	8,3 – 40,5	286 – 1.378
Dupla				
85 (54M, 31F)				
13 - 68				
p 5% e 95%				
Dhaliwal et al., 1995				
China				
FACSCan				
2 cores	2 – 20	33 – 559	8 – 37,8	149 – 1.333
Dupla				
40 (26M, 14F)				

13 - 68 p 5% e 95%					
Dhaliwal et al., 1995					
Índia					
FACSCan					
2 cores	6 - 23	152 - 715	7,4 - 37,8	173 - 1.392	
Dupla					
27 (19M, 8F)					
13 - 68 p 5% e 95%					
Ray et al., 2006					
Índia					
FACS					
2 cores					M 1,17 - 1,38
-					F 1,31 - 1,71
125 (88M, 37F)					
17 - 60					
media ± 2SD					
Chng; Tan; Kuperan, 2004	7,0 - 28,0	133 - 714	6,0 - 37,0	115 - 1.009	0,69 - 2,83
Ásia					
FACScalibur	M 7,0 - 22,0	M 109 - 802	M 7,6 - 37,4	M 140 - 1.103	M 0,68 - 2,73
2 cores	F 7,2 - 31,1	F 138 - 645	F 5,2 - 36,6	F 96 - 998	F 0,70 - 3,22
Única					

232 (104, 128F)  
 16 – 65  
 média  $\pm$  2SD/p 2,5%  
 e 97,5%

Jiang et al., 2004

China

Bryte-HS

2 cores

Dupla

614 (377M, 237F)

16-50

p 2,5% e 97,5%

0,72 – 2,56

Uppal; Verma; Dhot,

2003

Índia

EPICS-XL

2 cores

Dupla

94 (55M, 39F)

18 – 74

média  $\pm$  2SD

0,4 – 3,0

M 0,89 – 2,21

F 1,32 – 2,52

Urassa et al., 2003					
Tanzânia					
FACScan	6,0 – 21,0	88 – 654	6,0 – 35,0	118 - 830	0,61 – 2,73
3 cores					
-	M 6,0 – 20,6	M 75 – 595	M 5,7 - 37,2	M 122 – 972	M 0,59 – 2,43
214 (107M, 107F)	F 7,0 – 21,3	F 131 – 819	F 6,0 – 30,6	F 109 – 820	F 0,74 – 2,92
17 – 61					
p 2,5% e 97,5%					
Ngowi, et al., 2009					
Tanzania					
FACSCount					1,1 – 2,5
2 cores					
Dupla					M 1,0 – 3,7
102 (42M, 60F)					F 1,1 – 2,4
-					
p 2,5% e 97,5%					
Bisset et al., 2004					
Suíça					
EPICS XLMCL	CD19+ 4,70 – 19,13	CD19+ 72 – 460	5,35 – 30,93	77 – 427	1,0 – 5,0
3 cores	CD20+ 4,63 – 21,00	CD20+ 66 – 529			
Única					
70 (44M, 26F)					
-					

p 2,5% e 97,5%					
Kam et al., 1996					
China					
FACScan					
2 cores	5,1 – 20,8	82–560	7,1 – 38,0	130 – 938	0,6 – 2,5
Dupla					
208 (78M, 130F)					
18 – 71					
p 2,5% e p 97,5%					
Menard et al., 2003					
República Africana					
Central					
FACSCalibur					M 0.34 1.88
2 cores					F 0.60 2.27
Dupla					
150 (68M, 82F)					
15 – 60					
p 2,5% e p 97,5%					
Shahabuddin, 1995					
Arábia Saudita					
FACScan	5 – 27	110 – 890	4 – 29	90 – 690	
-					
Dupla					

---

115 M  
18 – 44  
-

Shahabuddin, 1995  
Arábia Saudita  
(caucasianos)  
FACScan  
-  
Dupla  
32 M  
18 – 44  
-

5 – 25

60 – 530

9 – 32

120 – 770

Tsegaye et al., 2003  
Etiópia  
FACScan  
2 cores  
Dupla  
52  
18 – 40  
IC 95%

4 – 24

56 – 436

5 – 29

62 – 549

0,5 – 3,9

Amatya et al., 2004						
India						
FACSCalibur						
2 cores						
Dupla						
200(M 116, F 84)						
18 – 55						
-						
Mandala et al., 2010						
Malásia						
FACSCalibur						
4 cores						
Dupla						
49						
20 – 60						
p 10% - 90% 20 – 60						
P 10% - 90%						



## ANEXO A – Questionário aplicado aos doadores no Serviço de Hemoterapia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO - SERVIÇO DE HEMOTERAPIA  
FICHA DE DOAÇÃO

Identificação  
Nome completo \_\_\_\_\_ Data nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nº Identidade: \_\_\_\_\_ Tipo documento \_\_\_\_\_ Órgão Exp: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Natural de (Cidade e estado): \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_ Raça \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Nome Pai: \_\_\_\_\_ Nome Mãe: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Nº apto \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Fone res: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_ Curso: \_\_\_\_\_ Fase: \_\_\_\_\_

Local Trabalho: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Voluntário: ( ) Reposição p/ : \_\_\_\_\_

Dados: Peso: \_\_\_\_\_ Estatura \_\_\_\_\_ Volume: \_\_\_\_\_ Nº SANGUE: \_\_\_\_\_

Hemogl \_\_\_\_\_ Temp \_\_\_\_\_ PA \_\_\_\_\_ Pulso \_\_\_\_\_ SEGMENTO: \_\_\_\_\_

TRIAGEM	S	N		S	N
01. Já doou sangue ? Há quanto tempo ?			20. Acupuntura ? Tratamento dentário 72 hs		
02. Teve recusa / Teste alterado em doação ?			21. Tatuagem ? Piercing? Outros? Quanto tempo?		
03. Alimentou-se hoje ? O quê ? Hora ?			22. Tá menstruada? Grávida ? Amamentando?		
04. Repousou durante a noite ?			23. Aborto ou parto há menos de 3 meses ?		
05. Ingeriu bebida alcoólica nas últimas 24 hs ?			24. Vacina após um parto ou após aborto?		
06. Costuma beber diariamente ?			25. Vacinas no último ano? Quais? .		
07. Fuma ? Orientar.			26. Teve diarreia nos últimos 15 dias ?		
08. Está resfriado ? Está com febre ?			27. Alguma doença de pele, manchas ? Herpes?		
09. Medicação nos últimos 15 dias ?			28. Lesões esbranquiçadas na boca/garganta ? Afias		
10. Cirurgia ? Tempo ?			29. Perda de peso e/ou ingua pelo corpo ?		
11. Transusão ? Acidente ?			30. Portador ou já teve sífilis ?		
12. Já esteve internado ? Motivo ?			31. Usou ou usa algum tipo de droga ? Qual ?		
13. Teve hepatite ou contato com doente ?			32. Já foi preso? Internado clin. Recuperação ?		
14. Teve malária ou esteve em zona endêmica ?			33 Parceiros sexuais diferentes último ano ?		
15. Doença de Chagas ? Dengue?			34. Teve relação sexual com prostituta ?		
16. Teve ou tem alguma doença ?			35. Teve relação sexual com o mesmo sexo ?		
17. Alergias ? Tipo?			36. Veio para fazer exame ? Já fez. exames HIV? .		
18. Já teve desmaio e / ou convulsão ?			37. Qual motivo da doação ?		
19. Tem doença do sangue ou hemorragia ?					

GRAVIDEZ: QUANTAS ? \_\_\_\_\_ Obs: \_\_\_\_\_

( Investigar : asma - bronquite, anemia, coração, diabete, pulmão, pressão rim, tireóide, TB, úlcera- endoscópia )

AVALIAÇÃO  
DOADOR APTO: \_\_\_\_\_ INAPTO DEFINITIVO: \_\_\_\_\_ INAPTO TEMPORÁRIO: \_\_\_\_\_

ASSINATURA DO ENTREVISTADOR \_\_\_\_\_

Data da Doação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ASSINATURA DO DOADOR: \_\_\_\_\_

Intercorrências: \_\_\_\_\_

Conduta: \_\_\_\_\_



## ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

**CERTIFICADO** Nº 1163

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 584 GR-99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

**APROVADO**

**PROCESSO:** 1163      **FR:** 390257

**TÍTULO:** ANÁLISE DO PERFIL IMUNE EM INDIVÍDUOS ADULTOS SAUDÁVEIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

**AUTOR:** Maria Cláudia Santos Silva, Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

FLORIANÓPOLIS, 15 de Fevereiro de 2011.

  
Coordenador do CEPSH/UFSC  
Prof. Washington Portela de Souza  
Coordenador do CEP/PRPe/UFSC