

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Maria Luiza Arrojo

Desenvolvimento e validação de um novo método de citometria de fluxo para a quantificação do conteúdo de hemoglobina fetal em glóbulos vermelhos e sua potencial aplicação clínica na doença falciforme.

Ribeirão Preto
2024

Maria Luiza Arrojo

Desenvolvimento e validação de um novo método de citometria de fluxo para a quantificação do conteúdo de hemoglobina fetal em glóbulos vermelhos e sua potencial aplicação clínica na doença falciforme.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Programa: Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Orientador(a): Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Ribeirão Preto
2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Ficha catalográfica

Arrojo, Maria Luiza

Desenvolvimento e validação de um novo método de citometria de fluxo para a quantificação do conteúdo de hemoglobina fetal em glóbulos vermelhos e sua potencial aplicação clínica na doença falciforme. Ribeirão Preto, 2024

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) – Área de concentração: Células Tronco e Terapia Celular

Orientador(a): Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

1. Hematologia. 2. Doença Falciforme 3. Hemoglobina Fetal. 4. Citometria de Fluxo. 5. Abordagem quantitativa.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Maria Luiza Arrojo

Título: Desenvolvimento e validação de um novo método de citometria de fluxo para a quantificação do conteúdo de hemoglobina fetal em glóbulos vermelhos e sua potencial aplicação clínica na doença falciforme.

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Programa: Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Orientador(a): Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Parecer: _____, ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

RESUMO

Arrojo, M.L. Desenvolvimento e validação de um novo método de citometria de fluxo para a quantificação do conteúdo de hemoglobina fetal em glóbulos vermelhos e sua potencial aplicação clínica na doença falciforme. 2024. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

A base do tratamento da DF continua sendo a hidroxiuréia, a qual induz a HbF, que inibe a polimerização da HbS mutante e a consequente falcização. Porém, os exames laboratoriais que avaliam a indução da HbF não permitem quantificar a % de GVs efetivamente protegidos (%GVprot), i.e. aqueles com conteúdo de HbF (cHbF)>10pg/GV. Enquanto a cromatografia (HPLC) determina a % de HbF dentre a Hb no sangue (%HbF), a citometria de fluxo clássica (CFc) fornece a % de GVs HbF+ (%Fcell), incluindo GVs com pouquíssima HbF. Desenvolvemos um método inédito de CF quantitativa (CFq) que utiliza um controle celular interno, composto por amostras de sangue de cordão umbilical (SCU) e de adulto com os conteúdos médios de HbF (MCHbF) conhecidos, permitindo que a distribuição de cHbF/GV na população seja determinada, incluindo a %GVprot. **Objetivo.** Validar o método e demonstrar seu potencial aplicação clínica na DF. **Métodos.** O MCHbF de 9 amostras de SCU foram pré-calculados, multiplicando a %HbF pelo respectivo MCH obtido com um analisador hematológico, e comparados com o MCHbF derivado por CFq, de forma a avaliar a correlação e a linearidade do método. Um total de 40 amostras de 29 pacientes com DF (SS) tiveram seus dados hematimétricos e a %GVprot determinados. Destas, foram obtidas a %Fcell (n=27) e a %HbF (n=15), totalizando 12 amostras caracterizadas por todos os métodos, os quais foram avaliados quanto à correlação entre si e com os dados hematimétricos. A Hb foi utilizada para dividir as 27 amostras entre pacientes com baixo (n=9) ou alto (n=18) risco clínico (Hb<9/dL), e a capacidade da %Fcell e da %GVprot em prever corretamente os pacientes de alto risco foram comparadas com base na área sob a curva ROC (AUC). **Resultados.** Os valores de MCHbF derivados por CFq das amostras de SCU se correlacionaram significativamente com os pré-calculados (Pearson $r=0,83$; $p=0,002$). Das 12 amostras de pacientes caracterizadas por todos os métodos, as 10 com %HbF>10% tiveram %Fcell>99%. Em contraste, a %GVprot se correlacionou fortemente e de forma linear ao longo de todas as %HbF ($r=0,89$; $p<0,0001$). Em linha, tanto a %HbF como a %GVprot apresentaram correlações significativas positivas com o No de GVs (RBC), Hb, e hematócrito (Ht), e negativas com a % de reticulócitos (%Ret) e com a amplitude de distribuição dos GVs (RDW); porém, %Fcell se correlacionou apenas com Ht. Digno de nota, foram identificadas tanto amostras com %HbF similares e %GVprot diferentes, como o inverso, destacando a capacidade exclusiva do método CFq de avaliar os diferentes padrões de distribuição do cHbF na população de GVs destes pacientes. Ao considerar as 27 amostras avaliadas quanto à %Fcell, esta se correlacionou apenas com Hb e RDW (adicionalmente), porém, a %GVprot se correlacionou (adicionalmente) positivamente com MCHC, e negativamente com No de GBs (WB), No de Ret (Ret abs), e % de Ret imaturos (IRF). Finalmente, o potencial da %GVprot de prever os pacientes com alto risco foi muito superior (AUC=0,969 e $p<0,0001$) à da %Fcell (AUC=0,873 e $p=0,0019$), com uma sensibilidade de 94,4% e uma especificidade de 88,9%, considerando %GVprot<65% como valor de corte.

Palavras-chaves: Hematologia; Doença Falciforme; Hemoglobina Fetal; Citometria de Fluxo

ABSTRACT

Arrojo, M. L. Development and validation of a new flow cytometry method for quantifying fetal hemoglobin content in red blood cells and its potential clinical application in sickle cell disease. 2024. Master's Thesis. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto-University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

The basis of SCD treatment continues to be hydroxyurea, which induces HbF, which inhibits the polymerization of mutant HbS and the consequent sickling. However, laboratory tests that evaluate HbF induction do not allow quantifying the % of effectively protected RBCs (%GVprot), i.e. those with HbF content (cHbF) $>10\text{pg/RBC}$. While chromatography (HPLC) determines the % of HbF among Hb in the blood (%HbF), classical flow cytometry (CFc) provides the % of HbF+ RBCs (%Fcell), including RBCs with very little HbF. We developed an unprecedented method of quantitative CF (CFq) that uses an internal cellular control, composed of umbilical cord blood (UCB) and adult samples with known mean HbF content (MCHbF), allowing the distribution of cHbF/RBC in the population is determined, including %RBCprot. **Goal.** Validate the method and demonstrate its potential clinical application in FD. **Methods.** The MCHbF of 9 UCB samples were pre-calculated, multiplying the %HbF by the respective MCH obtained with a hematological analyzer, and compared with the MCHbF derived by CFq, in order to evaluate the correlation and linearity of the method. A total of 40 samples from 29 patients with SCD (SS) had their hematimetric data and %RBCprot determined. Of these, %Fcell (n=27) and %HbF (n=15) were obtained, totaling 12 samples characterized by all methods, which were evaluated for correlation with each other and with hematimetric data. Hb was used to divide the 27 samples between patients with low (n=9) or high (n=18) clinical risk (Hb $<9\text{dL}$), and the ability of %Fcell and %GVprot to correctly predict patients high-risk patients were compared based on the area under the ROC curve (AUC). **Results.** The CFq-derived MCHbF values of the UCB samples significantly correlated with the pre-calculated ones (Pearson $r=0,83$; $p=0,002$). Of the 12 patient samples characterized by all methods, the 10 with %HbF $>10\%$ had %Fcell $>99\%$. In contrast, %RBCprot correlated strongly and linearly across all %HbF ($r=0.89$; $p<0.0001$). In line, both %HbF and %RBCprot showed significant positive correlations with the number of RBCs (RBC), Hb, and hematocrit (Ht), and negative correlations with the % of reticulocytes (%Ret) and with the distribution amplitude of RBCs. GVs (RDW); however, %Fcell correlated only with Ht. Of note, both samples with similar %HbF and different %RBCprot were identified, as well as the opposite, highlighting the unique ability of the CFq method to evaluate different cHbF distribution patterns in the RBC population of these patients. When considering the 27 samples evaluated for %Fcell, this correlated only with Hb and RDW (additionally), however, %GVprot correlated (additionally) positively with MCHC, and negatively with No of GBs (WB), No of Ret (Ret abs), and % of immature Ret (IRF). Finally, the potential of %GVprot to predict high-risk patients was much higher (AUC=0.969 and $p<0.0001$) than that of %Fcell (AUC=0.873 and $p=0.0019$), with a sensitivity of 94.4% and a specificity of 88.9%, considering %RBC $<65\%$ as a cutoff value.

Keywords: Hematology; Sickle Cell Disease, Fetal Hemoglobin; Flow Cytometry

À minha família, com todo amor
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci pela oportunidade de me orientar, cujo seus ensinamentos, resiliência e compreensão foram fundamentais para a conclusão deste projeto tão desafiador. Obrigada por ter dedicado seu tempo, comprometimento, e sabedoria para minha formação acadêmica, e, pela paciência perante as minhas dificuldades. Espero um dia, ter a oportunidade de transmitir todo aprendizado que obtive com você.

Aos meus pais, Lana e Pedro, e minha avó Irene, dedico este trabalho em reconhecimento a todo apoio e incentivo e amor que vocês proporcionaram durante toda minha vida. Obrigada por sempre estarem presentes e serem meus maiores incentivadores. Cada conquista minha é um reflexo da educação e dos valores que vocês me transmitiram, reconheço e agradeço vocês por todas as inúmeras renúncias que fizeram para que fosse possível a realização dos meus sonhos, e toda compreensão pelos momentos em que estive ausente. Nenhuma palavra seria suficiente para expressar meu amor e gratidão por vocês.

Aos meu irmão Marcelo e minha irmã Marina; minha cunhada Vivian, meu cunhado Gustavo e meus sobrinhos Matheus, Guilherme, Rafaela, e minha tia Rita, deixo meu agradecimento por todo apoio e carinho recebido durante a minha trajetória.

Agradeço a Fundação Hemocentro (FUNDHERP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) Centro de Terapia Celular-CTC (CEPID/FAPESP Proc.2013/08135-2), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular no Câncer-INCTC (CNPq Proc.465539/2014-9) e a CAPES pela estrutura e recursos que foram indispensáveis para realização deste trabalho.

Deixo um agradecimento especial, as professoras Dra. Kellen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias e Dra Simone Kashima Haddad por terem cedido reagentes que foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho, e também ao Jonathan Milhomens que gentilmente me acolheu e compartilhou reagentes que contribuiram imensamente na execução experimentos.

Ao programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular, em especial a Rosana e Silvia pelo suporte e esclarecimento durante toda a trajetória

Ao laboratório de Anemias Hereditárias da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, especialmente a Ana Paula Zanelli, deixo meu agradecimento pela parceria na execução da quantificação de Hemoglobinas nas amostras de Cordão Umbilical, e pela gentileza na aquisição dos dados hematimétricos. Estendo os agradecimentos ao Laboratório de Citometria de Fluxo, em especial a Camila e Patrícia por toda parceria, auxílio e conhecimento trocado.

Agradeço aos meus amigos que tornaram meus dias mais aconchegantes e divertidos (André, Jackson, Auri, Jaira, Lucas, Camila, Bianca) e aos meus colegas de laboratório que trouxeram mais alegria aos meus dias. E especialmente a Dalvinha por todo suporte fornecido durante o mestrado.

Não poderia deixar de agradecer aos pacientes, que foram a principal fonte de inspiração para este estudo. Agradeço a confiança e espero que os frutos deste trabalho possam contribuir no manejo da Doença Falciforme.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular dos genes envolvidos na síntese de globinas e padrão de expressão durante o desenvolvimento embrionário.....	20
Figura 2. Classificação das hemoglobinopatias em desordens quantitativas e desordens estruturais.....	22
Figura 3. Principais eventos fisiopatológicos envolvidos na Doença Falciforme. Principais eventos fisiopatológicos envolvidos na Doença Falciforme.	25
Figura 4. Estratégia de gates para a definição das populações e para obtenção da estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações da Amostra Teste.....	37
Figura 5. Dot Plots e histogramas das diferentes Amostras Teste e respectivos Controles Spike-In.	38
Figura 6. Padrão de distribuição da intensidade de fluorescência de HbF-PE-A e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.....	40
Figura 7. Gráfico representativo da equação de regressão linear derivada das duas populações de RBCs controle contidas no controle interno Spike-In marcado com CFSE.	42
Figura 8. Padrão de distribuição do conteúdo de HbF corpuscular absoluto estimado (cHbF, em pg/RBC) e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.	43
Figura 9. Comparação do padrão de distribuição do conteúdo de HbF (cHbF) entre as diferentes amostras teste.....	44
Figura 10. Padrão de distribuição da intensidade de fluorescência de HbF-PE-A e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.....	45
Figura 11. Gráfico representativo da equação de regressão linear derivada das duas populações de RBCs controle contidas no controle interno Spike-In marcado com CFSE.	46
Figura 12. Padrão de distribuição do conteúdo de HbF corpuscular absoluto estimado (cHbF), em pg/RBC, e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.	47
Figura 13. Comparação do padrão de distribuição do conteúdo de HbF (cHbF) entre as diferentes amostras teste. As porcentagens de células contendo quantidades de HbF acima de diferentes Cutoffs de cHbF foram calculadas dentre as células HbF+ das diferentes Amostras Amostra	48
Figura 14. Estratégia de gates para a definição das populações e para obtenção da estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Testes compostas por 80%RBCs UCB-20%RBCs Adulto.	49

Figura 15. Gráfico representativo da equação de regressão linear derivada das duas populações de RBCs controle contidas no controle interno Spike-In marcado com CFSE ou CTV em diferentes amostras de SCU com MCHBF conhecido.	50
Figura 16. Validação quantitativa do método de citometria, considerando todas as amostras de cordão umbilical.	51
Figura 17. Gráfico comparativo entre os valores estimados por HPLC e os valores derivados por Spike-In em amostras de cordão umbilical.....	51
Figura 18. Gráfico representativo de correlação obtida em decorrência da quantificação de Hemoglobina Fetal obtida pelo método de Spike em comparação com a quantificação estimada por HPLC em amostras de diferentes pacientes.	53
Figura 19. Gráfico representativo de correlação obtida em decorrência da quantificação de Hemoglobina Fetal obtida pelo método de Spike em comparação com exclusão dos pacientes P82, P104, P105.....	53
Figura 20. Padrão de marcação do anti-HbF-PE mostrando a separação entre as populações HbF+ e HbF- do controle Spike-In CFSE+ ou CTV+ contido nas amostras analisadas dos pacientes.	55
Figura 21. Gráfico das equações de regressão linear derivadas do controle interno de diferentes lotes de Spike-In (CTV ou CFSE) presentes em cada uma das amostras dos pacientes	58
Figura 22. Distribuição do conteúdo de HbF corpuscular (cHbF, em pg/RBC) das amostras dos pacientes.....	61
Figura 23. Comparação da distribuição da fluorescência e dos valores de cHbF derivados nas amostras dos pacientes.	62
Figura 24. Determinação gates a partir do método clássico de F-Cell e derivada dos RBC HbF - do método de Spike-In (F-Cell Single Tube).....	63
Figura 25. Comparativo entre os gates definidos pelo método clássico de F-Cell e derivada dos RBC HbF - do método de Spike-In (F-Cell Single Tube).....	64
Figura 26. Comparação entre os métodos clássicos de estimativa de F-Cell com o método desenvolvido por Spike-In.....	65
Figura 27. Gráfico representativo das Análises de correlações positivas obtidas entre os métodos quantitativos de % F-Cell Clássico, F-Cell Single Tube, F-Cell >10pg com dados hematimétricos.....	66
Figura 28. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo Single Tube.	67
Figura 29. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo F-Cell >10 pg.	68
Figura 30. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo F-Cell Classic.....	69
Figura 31. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo quantificação de HbF por HPLC.....	70
Figura 32. Análise de especificidade e sensibilidade comparativa entre os métodos F-Cell Classico, F-Cell Single Tube, e F-Cell cHbF>10 pg em pacientes com Hemoglobina >9 e <9 respectivamente.	71

Figura 33. Porcentagem de F-Cells em amostras analisadas de pacientes com hemoglobina >9 e <9. A figura apresenta os gráficos de distribuição de %F-Cells, entre os diferentes métodos de estimativa.	71
Figura 34. Análise de especificidade e sensibilidade comparativa entre os métodos F-Cell Clássico, F-Cell Single Tube, e F-Cell cHbF>10 pg em pacientes com Hemoglobina >9 e <9 respectivamente.	72
Figura 35. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de três amostras sequenciais do paciente P1.....	73
Figura 36. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells, obtidos das amostras do paciente P1 nas visitas sequenciais avaliadas.	74
Figura 37. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de quatro amostras sequenciais da paciente P54.....	75
Figura 38. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P54, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.	76
Figura 39. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de três amostras sequenciais da paciente P75.....	77
Figura 40. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P75, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.	78
Figura 41. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de duas amostras sequenciais da paciente P3.....	79
Figura 42. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P3, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.	80
Figura 43. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de duas amostras sequenciais da paciente P70.....	81
Figura 44. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P70, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.	82
Figura 45. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de duas amostras sequenciais da paciente P84 com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH).	83
Figura 46. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P84 com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH).	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Equações de regressão linear derivadas dos controles Spike-In.....	41
Tabela 2. Equações de regressão linear derivadas dos controles Spike.	46
Tabela 3. Quantificação de Hemoglobina Fetal por HPLC e dados hematimétricos obtidos das amostras de sangue de cordão umbilical utilizadas para validação.....	49
Tabela 4. Dados hematimétricos e de HPLC derivados de diferentes pacientes. A estimativa de %Hemoglobinas foram obtidas pelo equipamento Biorad Variant II e os dados hematimétricos obtidos pelo analisador Sysmex XE-2100.....	52
Tabela 5. Dados hematimétricos obtidos dos respectivos pacientes. Contagens e parâmetros obtidos pelo equipamento Sysmex XE-5000.....	57
Tabela 6. Equações de regressão linear derivadas dos controles Spike-In em amostras de diferentes.	59

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura suplementar 1. Padronização da fixação utilizando diferentes agentes fixadores.	109
Figura suplementar 2. Avaliação de diferentes agentes permeabilizantes	111
Figura suplementar 3. Avaliação de diferentes tempos de permeabilização com Triton x-100.....	113
Figura suplementar 4. Spike de células DiD’Oil e adição em células falciformes com persistência de hemoglobina fetal.....	114
Figura suplementar 5. Teste de marcação, fixação e permeabilização em amostras marcadas com DiD’Oil.....	115
Figura suplementar 6. Avaliação da marcação com PKH26.	116
Figura suplementar 7. Teste de concentração do CFSE em eritrócitos de cordão umbilical.	117
Figura suplementar 8. Marcação do CFSE e teste de perda de fluorescência após fixação em glutaraldeído 0,05% e permeabilização com Triton X-100 0,1%.	119
Figura suplementar 9. Padrão de marcação com CellTrace Violet.	120
Figura suplementar 10. Caracterização da marcação utilizando CellTrace Violet em eritrócitos submetidos ao processo de fixação e permeabilização.	121
Figura suplementar 11. Marcação de anti-HbF em eritrócitos de cordão umbilical provenientes de diferentes amostras.	122
Figura suplementar 12. Comparação da intensidade de marcação com métodos alternativos de permeabilização e alíquotas distintas do anticorpo anti-HbF.	123
Figura suplementar 13. Caracterização de distribuição de hemoglobina fetal em amostras utilizadas para o preparo do spike in.	125
Figura suplementar 14. Caracterização de células NU com adição de spike in	126
Figura suplementar 15. Caracterização do Spike-In marcado com CFSE.....	127
Figura suplementar 16. Caracterização do padrão de distribuição de HbF nos diferentes lotes avaliados.....	127

LISTA DE TABELA SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1. Quantificação de hemoglobinas via HPLC em diferentes amostras de cordão umbilical.	107
Tabela suplementar 2. Dados hematimétricos obtidos das amostras de cordão umbilical.	108
Tabela suplementar 3. Avaliação da eficácia da fixação e detecção de hemoglobina livre.	110
Tabela suplementar 4. Intensidade de fluorescência média de amostras de cordão marcadas com anti-HbF PE.	123

LISTA DE ANEXO

Anexo 1. Aprovação e Parecer Consubstanciado do comitê de Etica e Pesquisa HCRP	139
Anexo 2. Aprovação do Comitê de Etica e Pesquisa referente ao Centro de Referência da Saúde da Mulher (MATER).	140
Anexo 3. Gráficos derivados de HPLC obtidos das amostras de cordão umbilical.	141
Anexo 4. Gráficos de correlação e de comparação obtidos das amostras de Cordão umbilical recalculadas com base no percentual de Hemoglobina Fetal acetilada ou não.	148
Anexo 5. Gráficos de correlação e de comparação obtidos das amostras de pacientes que tiveram o MCHbF estimado por HPLC.	149
Anexo 6. Padrão de distribuição da marcação com anti-HbF nas amostras de Spike contidas em pacientes com alto MCHbF e baixo MCHbF	150
Anexo 7. Comparação entre a média da intensidade de fluorescência do Spike-In considerando a marcação com anti-HbF contidos nas amostras com baixo MCHbF e alto MCHbF	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **AF**=Anemia Falciforme
- **BSA**= do inglês, *Bovine Serum Albumin*
- **CFSE**= do inglês, *Carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester*
- **CHr**= Concentração de hemoglobina do reticulócito
- **CTV**= do inglês, *Cell Trace Violet*
- **DF**=Doença Falciforme
- **DMSO**=Dimetil Sulfóxido
- **EDTA**=Acido Etilenodiamino tetra-acético
- **F-Cell**= Célula com Hemoglobina fetal
- **FITC**=do inglês, *Fluorescein Isothiocyanate*
- **Hb**=Hemoglobina
- **HbF**=Hemoglobina Fetal
- **HPLC**=do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*
- **Ht**= Hematocrito
- **IRF**=do inglês, *Imature Reticulocyte Fraction*
- **Mm**=Milimolar
- **MCH**= do inglês, *Mean Corpuscular Hemoglobin*
- **MCHC**=do inglês, *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*
- **MCV**=do inglês, *Mean Corpuscular Volume*
- **PBS**=do inglês, Phosphate Buffered Saline
- **PE**=do inglês, *Phycoeritrin*
- **RBC**=do inglês, *Red Blood Cell*
- **RDW**=do inglês, *Red Cell Distribution Width*
- **Retic %**= do inglês, *Percentual Reticulocytes*
- **Retic Abs**= do inglês, *Absolut Reticulocytes*
- **µL**= Microlitro
- **µM**= Micromolar
- **UCB**=do inglês, *Umbilical Coord Blood*
- **WB**=do inglês, *White Blood Cells*

1	SUMÁRIO	
2	INTRODUÇÃO	18
2.1	Eritrócitos e a molécula de Hemoglobina	18
2.2	Distúrbios da hemoglobina	21
2.3	Anemia Falciforme: Fisiopatologia	24
3	Objetivo	28
3.1	Objetivos Específicos	28
4	Material e métodos	29
4.1	Aspectos éticos e aquisição das amostras	29
4.2	Lavagem e contagem de RBCs	29
4.3	Marcação com CFSE e CellTrace Violet	30
4.4	Fixação e Permeabilização para Citometria de Fluxo	30
4.5	Glicerolização	31
4.6	Desglicerolização	32
4.7	Citometria de Fluxo	32
5	Resultados	33
5.1	Quantificação de HbF ao Nível Unicelular por Citometria de Fluxo	33
5.2	Avaliação do Método de Quantificação de HbF em Amostras Teste	35
5.2.1	Condição Experimental 1: 1x10 ⁶ RBCs por tubo (2µl de anti-HbF)	35
5.2.2	Caracterização em amostras com HbF conhecida	48
5.3	Avaliação em Pacientes	54
5.4	Seguimento de Pacientes	72
6	Discussão	85
6.1	Discussão suplementar	99
6.2	Etapas de validação- Controle de qualidade e seus interferentes	99
6.2.1	Processo de validação	103
6.2.1	Efeito das modificações pós-translacionais sobre a quantificação da HbF pelos diferentes métodos e implicações para este estudo	105
7	Conclusão	106
8	Informações Suplementares - Citometria de Fluxo	107
9	Referências	128

2 INTRODUÇÃO

2.1 *Eritrócitos e a molécula de Hemoglobina*

Os eritrócitos humanos normais, também conhecidos como células vermelhas do sangue (*RBC do inglês “red blood cells”*) ou hemácias, são estruturas bicôncavas em formato discóide, altamente flexíveis que carregam em seu interior a molécula de hemoglobina (Hb) (HAMASAKI; YAMAMOTO, 2000; KUHN; DIEDERICH; KELLER; KRAMER *et al.*, 2017). A principal função das hemácias é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos, onde é utilizado como substrato para a geração da cadeia respiratória e síntese de ATP mitocondrial. Esse transporte é feito pela molécula de hemoglobina (Hb), um heterotetrâmetro com massa molecular de 64,58 KDa, composto de duas subunidades polipeptídicas de globina α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e duas subunidades β ($\beta 1$ e $\beta 2$), cada qual, encontram-se ligadas de maneira covalente a um grupamento protético heme, formado por um anel de porfirina e um íon de ferro no estado reduzido, isto é ferroso (Fe^{2+}), ligado ao N-terminal da histidina, constituindo assim, uma proteína carreadora de duas vias, com capacidade tanto de transportar o oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos periféricos (sustentando o metabolismo oxidativo), quanto facilitar o transporte de retorno do dióxido de carbono (CO_2), para sua eliminação (MARENGO-ROWE, 2006; OGAWA; TSUCHIYA; MAEDA, 2020). A ligação do O_2 à Hb é um fenômeno cooperativo e reversível, modulado alostéricamente, isto é, uma vez ligado um O_2 , a afinidade de outros grupamentos heme é aumentada, favorecendo o carregamento de O_2 no pulmão. Por sua vez, a liberação de O_2 nos tecidos também é facilitada a cada O_2 liberado pela Hb, tornando a entrega mais eficiente (BELLELLI; TAME, 2022; THOMAS; LUMB, 2012).

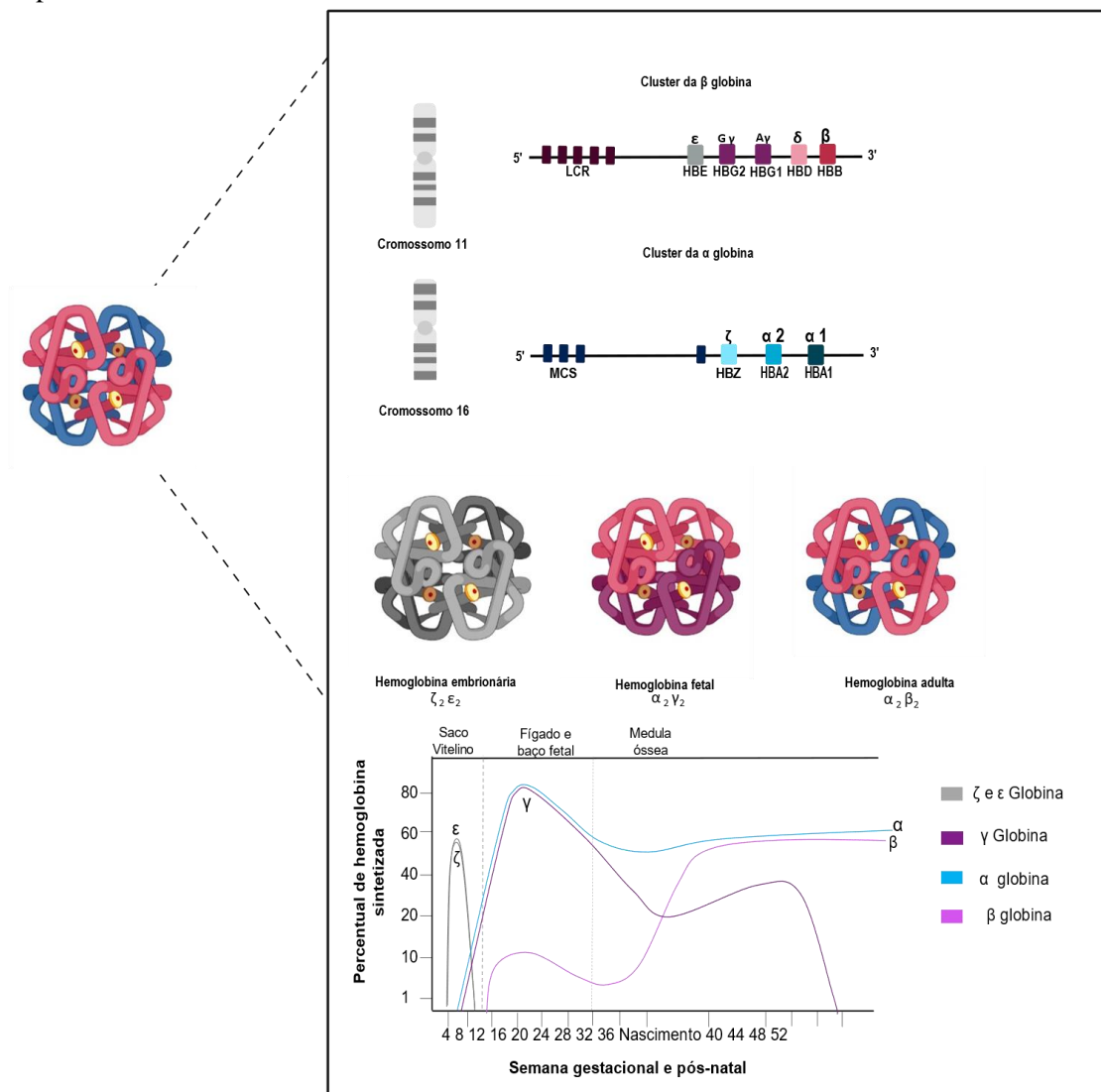
Cada subunidade de globina se liga a uma cadeia diferente, formando os heterodímeros denominados de $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 1\beta 2$, os quais interagem entre si, mediando a formação do tetrâmero de Hb (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020; DZIERZAK; PHILIPSEN, 2013). A hemoglobina pode assumir dois estados conformacionais distintos: oxigenado e desoxigenado, também conhecidos por estado relaxado (R) e estado tenso (T). Na forma oxigenada a ligação do O_2 desencadeia uma mudança quaternária que favorece a exposição das fendas do agrupamento heme localizado no interior das globinas, o que facilita a oxigenação. Ao contrário da forma Tensa onde as fendas se encontram em menor tamanho, restringindo o acesso do oxigênio ao agrupamento heme (THOMAS; LUMB, 2012).

Molecularmente, a transcrição gênica das cadeias de globina é controlada por dois agrupamentos multigênicos localizados nos cromossomos 16 (genes codificando cadeias de α -globina) e 11 (genes das cadeias de β -globina). Embora em cromossomos distintos, ambos exibem o mesmo padrão ordenado e temporal de expressão (VOON; VADOLAS, 2008). Em humanos, o cluster da de α -globina contém três genes funcionais: ($\zeta, \alpha 2, \alpha 1$) e dois pseudogenes sem função conhecida. A montante dos genes, em uma região localizada de 30 a 70kb, quatro elementos regulatórios conservados (MCS) são necessários para regular a expressão da α -globina (VOON; VADOLAS, 2008). Por sua vez, o cluster da β -globina abrange cinco genes: HBE (ϵ -globina), os dois genes fetais HBG2 e HBG1 altamente homólogos ($G\gamma$ - e $A\gamma$ -globina, respectivamente), e os dois genes HBD e HBB adultos (δ - e β -globina) responsáveis por compor 98% das cadeias de B-globina adultas (BARBARANI; LABEDZ; STUCCHI; ABBIATI *et al.*, 2021). Interessantemente, ao longo do desenvolvimento embrionário diferentes genes de globina são expressos e/ou silenciados, formando subunidades com diferentes propriedades fisiológicas, necessárias para suprir a demanda de oxigênio durante a ontogenia (METTANANDA; GIBBONS; HIGGS, 2015).

Em mamíferos, a produção de hemoglobina tem início a partir da geração de progenitores eritróides primitivos presentes no saco vitelino (por volta de E7-E9, em camundongos) que originam glóbulos vermelhos nucleados expressando somente a hemoglobina do tipo embrionária (também conhecida como ϵ -globina). Logo após (aproximadamente em E8.25), progenitores eritromielóides (EMPs) emergem diretamente do endotélio hemogênico vascular do saco vitelínico, migrando para o fígado fetal posteriormente (E10), onde geram glóbulos vermelhos maduros expressando hemoglobina do tipo γ -globina semelhante à β -globina, favorecendo a combinação do tetrâmero entre α -globina e γ -globina para formação da hemoglobina do tipo fetal (HbF). As cadeias de γ -globina são codificadas por dois genes quase idênticos (HBG2 e HBG1) dentro do agrupamento da β -globina, os quais diferem da hemoglobina adulta, apenas pela presença de um resíduo de glicina e alanina na posição do aminoácido $\gamma 136$ (ADACHI; KIM; ASAKURA; SCHWARTZ, 1990) Desta maneira, durante a maior parte da gestação, e nos primeiros seis meses de vida pós-natal, a HbF é a hemoglobina predominante; de forma que os eritrócitos presentes no sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) ao nascimento expressam homogeneamente níveis muito altos de HbF, com cerca de 70% de cadeia de γ -globina (ADACHI; KIM; ASAKURA; SCHWARTZ, 1990; ONEAL; GANTT; SCHWARTZ; BHANU *et al.*, 2006). Passado

esse período, as mudanças transcricionais nos progenitores eritróides promovem a troca definitiva para a síntese de β -globina (um fenômeno chamado *hemoglobin-switch*), originando a hemoglobina adulta ($\alpha_2\beta_2$; *HbA*) (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020; GELL, 2018; SANKARAN; ORKIN, 2013; WANG; THEIN, 2018). A figura 1 a seguir ilustra a estrutura gênica e o padrão de expressão durante o desenvolvimento embrionário.

Figura 1. Estrutura molecular dos genes envolvidos na síntese de globinas e padrão de expressão durante o desenvolvimento embrionário



Em modelos de eritropoiese murinos, eritrócitos primitivos produzidos pelo saco vitelino em (E7.6-) são encontrados na circulação, e são compostos predominantemente pela hemoglobina embrionária (ϵ , γ e ζ) Por volta de 6 semana gestacional em humanos e E10.5 em camundongos a mudança de progenitores para o fígado fetal silencia a hemoglobina embrionária e passa a produzir eritrócitos contendo hemoglobina fetal (HbF) $\alpha_2\gamma_2$ que permitem que o feto extraia oxigênio com maior eficiência, fornecendo suporte para o desenvolvimento. Próximo ao nascimento, a hematopoiese definitiva se instala na medula óssea e até 06 meses da vida pós-natal a HbF é silenciada, e a produção de hemoglobina adulta instalada. Figura de autoria própria.

Curiosamente, a mudança do padrão de expressão de hemoglobina não é um fenômeno totalmente controlado, pois alguns adultos retêm a capacidade de produzir níveis residuais de HbF, levando à presença de cerca de 1- 2% de uma população de células expressando HbF, denominadas células F (ou *F-cells*) sem causar prejuízos funcionais (DANA; FIBACH, 2018; WANG; THEIN, 2018).

2.2 *Distúrbios da hemoglobina*

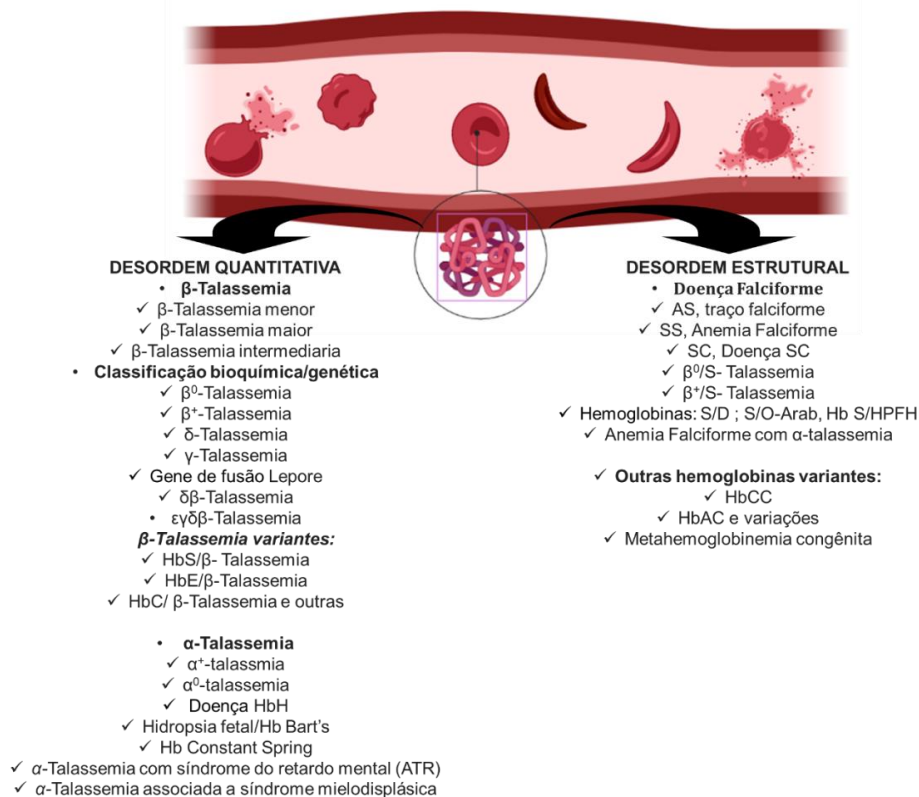
Os distúrbios da molécula de hemoglobina, também relatados como hemoglobinopatias, são um grupo de doenças clinicamente distintas, de características hereditárias e monogênicas, com maior frequência mundial, onde estima-se que 7% da população total, é portadora de pelo menos um gene variante das cadeias de globina (KOHNE, 2011). Estas doenças podem envolver mutações de aminoácidos únicos diretamente nos produtos gênicos da globina, afetando a sua estrutura e função, ou envolver diferentes alterações genéticas que afetam quantitativamente a síntese de cadeias alfa (α) e beta (β), resultando predominantemente em anemia (FUCHAROEN; WINICHAGOON, 2012).

Com o aprimoramento das técnicas de biologia molecular, até o presente momento, cerca de 1861 mutações variantes no gene da globina, desde alterações de base única até rearranjos foram caracterizados e estão descritos no banco de dados HbVar (<https://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>). Estima-se que 5% da população mundial seja portadora de pelo menos um traço de hemoglobina variante (MAGRIN; MICCIO; CAVAZZANA, 2019) e que mais de 340.000 crianças nasçam anualmente com distúrbios significativos da hemoglobina, 90% das quais estão geograficamente distribuídas em países de baixa renda. (SHANG; PENG; YE; ASAN *et al.*, 2017). A presença de variantes de hemoglobina e suas diferentes combinações resultam em uma ampla gama de desordens que variam consideravelmente no contexto de severidade clínica (HARTEVELD; ACHOUR; ARKESTEIJN; TER HUURNE *et al.*, 2022)

A classificação das hemoglobinopatias divide-se em dois grandes grupos (Figura 2) compostos pela doença falciforme (defeito estrutural) e talassemias (causadas pela diminuição da síntese de cadeias de globina), cujas diferenças bioquímicas e genéticas subdividem essas doenças em subgrupos específicos (FORGET; BUNN, 2013). Devido à ampla heterogeneidade em termos genéticos e clínicos, o diagnóstico definitivo de portadores de hemoglobinopatias, o aconselhamento genético, e o diagnóstico pré-natal são ainda desafiantes e ferramentas de sequenciamento de nova geração podem ser úteis

para elucidação de casos para os quais as metodologias de detecção usuais não são suficientes (HARTEVELD; ACHOUR; ARKESTEIJN; TER HUURNE *et al.*, 2022)

Figura 2. Classificação das hemoglobinopatias em desordens quantitativas e desordens estruturais.



As desordens da hemoglobina podem ser classificadas em dois grandes grupos: Defeitos na síntese, que são caracterizados pela diminuição da expressão ou ausência total da síntese das cadeias alfa ou beta globina, correspondendo as talassemias, e os defeitos estruturais onde mutações alteram a estabilidade das cadeias de beta globina que podem favorecer mudanças estruturais na morfologia celular, sendo composto predominantemente pelas doenças falciformes. Outras hemoglobinas variantes como (HbCC e suas variações heterozigóticas) podem causar cristalização da hemoglobina em condições saturadas, ou em casos de alterações na afinidade de ligação ao oxigênio (HbM) sem ocasionar mudança de formato celular. Figura de autoria própria.

Especialmente, a doença falciforme compreende um grupo de hemoglobinopatias clinicamente significativas que embora sejam heterogêneas do ponto de vista genético, compartilham pelo menos uma mutação de substituição no gene HBB, resultando em uma hemoglobina anormal, também conhecida como HbS. Essa variante da hemoglobina adulta normal (HbA) é herdada de ambos os pais (homozigidade para o gene HbS) ou de um dos pais, juntamente com outra variante da hemoglobina, como a hemoglobina C (HbC), ou com β-talassemia (heterozigidade composta) dentre a ocorrência de outras

variantes de globina (BALLAS, 2018; PIEL; STEINBERG; REES, 2017). As estimativas sugerem que a cada ano cerca de 300,000 crianças nascem sendo portadoras da forma mais grave da doença (HbSS) também conhecida como Anemia Falciforme (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

Globalmente, cerca de três quartos de todas as pessoas afetadas com Doença Falciforme vivem na África Subsaariana, onde cerca de 240.000 bebês com HbSS nascem todos os anos e cerca de 50 a 90% das crianças nascidas morrem antes de completarem 5 anos, deixando claro que a Doença Falciforme é um grave problema de saúde pública. (UYOGA; MACHARIA; MOCHAMAH; NDILA *et al.*, 2019). Do ponto de vista clínico, as principais causas de óbito na doença falciforme resultam de comprometimento crônico de órgãos (18-23%); síndrome torácica aguda (17%); infecções (17%); hemorragia cerebral (10%); Insuficiência cardíaca direita (5%) hemólise tardia relacionada à transfusão (4%). (NGO; BARTOLUCCI; LOBO; MEKONTSO-DESSAP *et al.*, 2014) (KINGER; MORENO; MILLER; MITTAL, 2021)

Embora estudos de modelagem estimem que em 2050 cerca de 404.200 novos nascimentos com AF ocorram, a implementação de políticas de triagem neonatal, uso profilático de penicilina, vacinação abrangendo *Pneumococo, meningococo e Haemophilus* juntamente com os programas de treinamento para reconhecimento precoce de complicações relacionados a doença, demonstrou diminuir os níveis de mortalidade em crianças portadoras de DF com idade > 5 anos, essa redução foi estimada em 3% ano, no período de 1970 a 2005 (ALLALI; CHALUMEAU; LAUNAY; BALLAS *et al.*, 2018; LANZKRON; CARROLL; HAYWOOD, 2013; PLATT; BRAMBILLA; ROSSE; MILNER *et al.*, 1994). A grande maioria dos recém-nascidos portadores de DF nascem em países de baixa e média renda, onde a dificuldade de diagnóstico e de acesso ao tratamento eleva em até 92% a mortalidade nos primeiros anos de vida (PIEL; HAY; GUPTA; WEATHERALL *et al.*, 2013).

Só no Brasil há cerca de dois milhões de portadores, enquanto que 25.000–50.000 pessoas vivem com a forma homozigótica (HbSS) da doença, sendo que 3.500 novos nascimentos são documentados a cada ano; com uma taxa de incidência que varia de 1 caso a cada 650 nascidos vivos no estado da Bahia a 1 em 13.500 nascidos vivos nascimentos no estado do Rio Grande do Sul (SANTO, 2022; SILVA-PINTO; ALENCAR DE QUEIROZ; ANTONIAZZO ZAMARO; ARRUDA *et al.*, 2019).

Particularmente no Brasil, a sobrevida média dos pacientes com Anemia Falciforme é de 53,3 anos, sendo 21,3 anos menor que a população em geral. (LOBO;

NASCIMENTO; JESUS; FREITAS *et al.*, 2018). Ainda, no período de 2000 a 2019 cerca de 2422 óbitos por doença falciforme entre crianças e adolescentes foram documentados, com maior predominância na região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (NASCIMENTO; PRZIBILSKI; COELHO; LEITE *et al.*, 2022).

2.3 Anemia Falciforme: Fisiopatologia

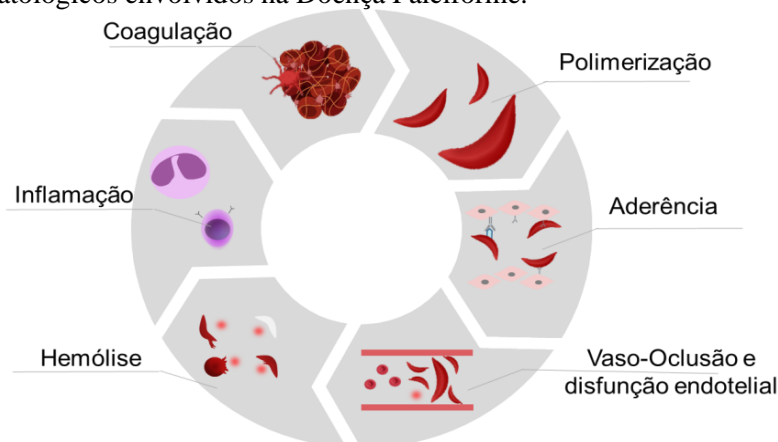
A Anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica causada por uma substituição *missense* de um único nucleotídeo (A para T) do gene HBB, que converte um códon de ácido glutâmico (GAG) hidrofílico em um códon de valina (GTG) hidrofóbica, resultando em uma substituição na posição 6 da subunidade β -globina (β S) da hemoglobina adulta (HbA), gerando assim a variante estrutural Hemoglobina falciforme (HbS) (HBB; Glu(E)6Val(A); GAG-GTG; dbSNP rs334).. Quando presente em homozigose corresponde a forma mais severa da doença. (HABARA; STEINBERG, 2016). Em condições de desoxigenação, a interação de resíduos hidrofóbicos da valina interage com outros resíduos hidrofóbicos, tais como β Ala70, β Phe85, β Leu88, presentes em cadeias de β -globina de outra molécula de desoxi-HbS adjacentes, criando assim, longos polímeros que levam à distorção da forma eritrocitária bicôncava normal, resultando em um formato alongado semelhante á uma foice, daí o termo proveniente de falciforme (GHATGE; AHMED; OMAR; PAGARE *et al.*, 2016; ODIEVRE; VERGER; SILVA-PINTO; ELION, 2011; WU; SUN; RYAN; PAWLIK *et al.*, 2006).

Ensaio de difração de raios X, e microscopia eletrônica revelaram que a polimerização da desoxi-HbS resulta em uma estrutura polimérica helicoidal composta de 14 filamentos de HbS por seção. Mediante a desoxigenação, um mecanismo de dupla enucleação é desencadeado, onde uma fase inicial de latência, caracterizado pela organização das moléculas em pequenos agrupamentos que servem como núcleos de polimerização, que é seguida por uma fase de rápido crescimento das estruturas poliméricas (HARRINGTON; ADACHI; ROYER, 1997; VEKILOV, 2007). A taxa de extensão polimérica de HbS pode ser afetada por diferentes fatores, incluindo, a concentração de hemoglobina S intra-eritrocitária, pressão parcial de oxigênio, temperatura, equilíbrio hidro-eletrolítico, concentração de 2,3-BPG, e a presença de hemoglobina fetal (IQBAL; LI; MCKENDRY; HORTON *et al.*, 2013; KATO; PIEL; REID; GASTON *et al.*, 2018).

Nos eritrócitos falciformes, a auto-oxidação da HbS e a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, alteram as propriedades de membrana, tornando as hemácias

propensas a lise prematura, resultando em hemólise e anemia (WANG; ZENNADI, 2021). A formação dos polímeros e o aumento da concentração de oxigênio não ligado no interior dos eritrócitos, induzem danos oxidativos na membrana celular, conduzindo uma perda de deformabilidade de membrana, e quando reproduzida em diferentes ciclos, tornam as hemácias propensas a lise, o que resulta em anemia, eritropoiese ineficaz e liberação da heme presente na molécula de hemoglobina (WANG; ZENNADI, 2021). A liberação do heme, proveniente da hemólise prematura, afeta a biodisponibilidade do óxido nítrico, além de promover um estado pró-inflamatório, por intermédio de “padrões moleculares associados ao dano eritróide” (eDAMP), aumentando as chances de complicações falciformes como vaso oclusão (VOC) e síndrome torácica aguda (BELCHER; CHEN; NGUYEN; MILBAUER *et al.*, 2014; GLADWIN; OFORI-ACQUAH, 2014). Estudos de microfluídica utilizando chips que mimetizam o canal vascular, demonstraram que os eritrócitos falciformes, além de rígidos, são mais aderentes. Quando o sistema endotelial sofre exposição à heme e repetidos ciclos de hipóxia, a expressão de moléculas de adesão é estimulada, o que favorece a ligação entre eritrócito e endotélio, predispondo à vaso-oclusão, principal responsável pelas manifestações clínicas da doença (KUCUKAL; ILICH; KEY; LITTLE *et al.*, 2018; KUCUKAL; LITTLE; GURKAN, 2018; KUCUKAL; MAN; QUINN; TEWARI *et al.*, 2020). A figura a seguir (Figura 3) ilustra os principais eventos fisiopatológicos envolvidos na Doença Falciforme.

Figura 3. Principais eventos fisiopatológicos envolvidos na Doença Falciforme Principais eventos fisiopatológicos envolvidos na Doença Falciforme.



O início da cascata fisiopatológica, inicia-se com a polimerização de eritrócitos contendo HbS em condições desoxigenadas, a falcização os torna mais aderentes causando vaso-oclusão mediada via expressão de receptores envolvidos em adesão celular, expressos por células endoteliais. Ciclos de polimerização causam hemólise prematura das células que contribuem para a disfunção endotelial, inflamação e ativação crônica da cascata de coagulação. Figura de autoria própria.

Anormalidades na homeostase de cátions, também desempenham um papel crucial na polimerização de eritrócitos falciformes, estudos *in vitro* e estudos de associação, entre polimorfismos no genoma e manifestações clínicas, demonstraram o papel de disfunções em diversos canais iônicos dispostos dentro da membrana celular, destacando um papel central para cotransportador K-CL eritróide 1 (KCC1;*SLC12A4*), KCC3 (*SLC12A6*) e KCC4 (codificado por *SLC12A7*), o canal Gardos putativo (codificado por *KCNN4*) (BROWN; CONWAY; CERRUTI; COLLINGE *et al.*, 2015). A ativação aberrante de canais transportadores de íons estimula a desidratação celular, aumentando a concentração média de hemoglobina (CHCM), favorecendo a formação de agregados de HbS que tornam os eritrócitos mais propensos a falcização (WANG; HERTZ; RUPPENTHAL; EL NEMER *et al.*, 2021). Além disso, a sobrecarga de Cálcio demonstrou induzir eriptose e externalização de fosfatidilserina em hemácias saudáveis, o que pode ser amplificado em eritrócitos falciformes (FOLLER; LANG, 2020).

Em situações fisiológicas, o nível de Ca²⁺ intracelular varia entre 20~50nM, entretanto, em eritrócitos falciformes desoxigenados a captação de Ca²⁺ pode exceder de três a cinco vezes o limite basal (ETZION; TIFFERT; BOOKCHIN; LEW, 1993). O aumento de Ca²⁺ citoplasmático ativa principalmente o canal de Gardos (*KCNN4*), capaz de mediar o rápido efluxo de K⁺ à medida que a saída de Cl⁻ é liberada, desencadeando a falcização (JOINER, 2008).

Além das complicações hemolíticas e vaso-oclusivas, a DF é caracterizada por uma variedade de complicações trombóticas (NSIRI; GRITLI; BAYOUDH; MESSAOUD *et al.*, 1996). A exposição aos produtos da hemólise, junto aos ciclos repetidos de isquemia, é responsável pela ativação do fator tecidual que estimula a cascata da coagulação extrínseca, resultando em hipercoagulabilidade (SHET; ARAS; GUPTA; HASS *et al.*, 2003). Além disso, o aumento no número de plaquetas, e sua ativação crônica, contribuem para alterações hemostáticas (SHOME; JARADAT; MAHOZI; SINAN *et al.*, 2018).

Estudos de metabolômica evidenciaram que camundongos com DF possuem níveis plasmáticos elevados de adenosina (ZHANG; DAI; WEN; ZHANG *et al.*, 2011). Um outro trabalho, reportado por Sun *et al* demonstrou que a sinalização de adenosina via ADORA2B ativa de maneira dependente de ERK a disponibilização de SphK1 um lipídeo de membrana, promovendo a falcização (SUN; ZHANG; BOGDANOV; WU *et al.*, 2015).

O principal modulador da inibição da polimerização da HbSS é a Hemoglobina fetal, composta pelo tetrâmero $\alpha_2\gamma_2$, que fornece um efeito terapêutico protetivo contra as manifestações decorrentes da vaso-occlusão. O papel protetor da HbF foi descrito por Janet Watson que confirmou que recém-nascidos portadores de doença falciforme não apresentavam sintomas até o quarto mês pós-natal e que eritrócitos com HbF possuíam um tempo de atraso de falcização que justificava um possível efeito protetor. (WATSON, 1948). Posteriormente, estudos de gelificação de hemoglobina e avanços em técnicas eletroforéticas, permitiram a compreensão de que a composição genética de hemoglobina é heterogênea em indivíduos adultos homocigotos portadores de DF, e que a hemoglobina fetal poderia coexistir com a HbS, no entanto, até então, nenhuma correlação clínica havia sido feita (JACOB; RAPER, 1958). Paralelamente, com o desenvolvimento do teste de eluição ácida (teste KB) desenvolvido por Kleihauer e Betke (o qual elui todas as hemoglobinas, exceto HbF, dos eritrócitos), demonstrou-se que células F quando submetidas ao tratamento ácido permaneciam intactas, em relação a células contendo somente HbA. O teste KB, acoplado à quantificação fotométrica da HbF por microscopia, também permitiu a demonstração de que células irreversivelmente falcizadas (ISC, *Irreversibly Sickled Cells*, i.e. células falcizadas mesmo em condições normóxicas) continham significativamente menos HbF do que as não-ISC. Ainda, a avaliação revelou que o conteúdo celular total de Hb foi constante (independentemente do tamanho ou formato), sugerindo que as quantidades absolutas de HbF e HbS variariam reciprocamente em cada célula (i.e. complementarmente). Em suma, estes trabalhos revelaram que a distribuição de HbF nos eritrócitos era heterogênea e particularmente baixa nas ISCs, e que indivíduos com níveis altos de HbF, persistentes mesmo na fase adulta, eram assintomáticos (BERTLES; MILNER, 1968; JACOB; RAPER, 1958).

Eventualmente, o papel da HbF na formação de tetrâmeros híbridos mistos ($\alpha_2\beta^s\gamma$) que impedem a polimerização, mesmo no estado de desoxihemoglobina, foi elucidado. Assim, indivíduos homocigotos para HbS, mas que herdaram mutações associadas à expressão sustentada da γ -globina, desenvolvem uma condição benigna denominada de persistência hereditária da hemoglobina fetal. Estes indivíduos em geral, não costumam apresentar manifestações clínicas da DF e apresentam melhor sobrevida (KHANDROS; BLOBEL, 2021).

Embora seja a doença genética mais frequente, a DF ainda é altamente negligenciada. Dentre os fatores protetores, encontra-se a hemoglobina fetal, cuja afinidade superior pelo oxigênio é capaz de impedir a polimerização e reduzir as características fisiopatológicas

da doença. Tendo em vista o impacto econômico, social e clínico da anemia falciforme, é necessário urgentemente o desenvolvimento de metodologias que possibilitem a implementação de ferramentas funcionais para avaliação de novos marcadores associados a um maior risco de episódios vaso-oclusivos nos pacientes portadores de AF. Este trabalho visa o desenvolvimento de um método capaz de avaliar de maneira unicelular o conteúdo de HbF em eritrócitos falciformes.

3 *Objetivo*

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de um método quantitativo de citometria de fluxo capaz de avaliar de maneira unicelular o conteúdo de HbF em eritrócitos de pacientes portadores de Anemia Falciforme.

3.1 *Objetivos Específicos*

- Desenvolver um ensaio de citometria de fluxo quantitativo para avaliar os níveis de HbF, em eritrócitos totais de pacientes com AF.
- Avaliar como parâmetros hematimétricos, tais como, volume corpuscular e a presença de reticulócitos, e níveis de HbF unicelular são capazes de modular o efeito protetor anti-falcização/hemólise

4 Material e métodos

4.1 Aspectos éticos e aquisição das amostras

O projeto foi submetido ao comitê de ética local da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (EP HC-FMRP-USP) e aprovado (CAE: 52163521.5.0000.5440). Deste modo, 104 pacientes portadores de Anemia Falciforme (HbSS) em seguimento pelo ambulatório de Hemoglobinopatias da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e sem necessidade transfusional foram abordados e aceitaram participar do estudo, mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e quando aplicável Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE), a coleta de amostras foi remanescente a realização dos exames de rotina, portanto os pacientes excluindo a necessidade de realização de uma nova punção. Pacientes que entraram em regime transfusional crônico foram eliminados do estudo. Para a obtenção do sangue de Cordão Umbilical (SCU), 31 parturientes da MATER (HCRP) foram abordadas e forneceram o consentimento para utilização das amostras. As amostras de SCU já haviam sido coletadas para a realização dos testes de tipagem ABO nos recém-nascidos, portanto a utilização também foi remanescente a realização dos exames laboratoriais. Para garantir o sigilo relacionado as informações dos pacientes, um documento foi gerado e cada paciente recebeu um identificador anônimo. Todas as informações clínicas dos pacientes foram coletas por meio de análise de prontuários e exames laboratoriais

4.2 Lavagem e contagem de RBCs

Para garantir que todas as amostras sejam comparáveis, as amostras de sangue foram avaliadas em até 6h após a coleta. 50 ul de sangue foram transferidos para um tubo Falcon de 15mL contendo de 10 mL de PBS 1X, suplementado com 0,1 M de D-glicose (Sigma Aldrich, #C200-0271) estocado em temperatura de 37°C, as amostras foram lavadas duas vezes, utilizando centrifugação de 310xg (equivalente a 1360 RPM em um rotor de caçamba oscilante, considerando um raio de 150mm, medido no centro do tubo) com freios desligados e temperatura a 20°C durante o período de 5 minutos. Após a segunda lavagem, os RBC lavados foram ressuspensos em 3 mL de PBS 1X e uma diluição de 100 a 150 vezes (diluição de 10 para 990) foi realizada para a contagem de células em uma câmara de hemocitômetro Neubauer. 10 ul da diluição de células foi dispensada no hemocitômetro Neubauer sob uma lamínula, as células foram contadas individualmente em quatro quadrantes laterais superiores e inferiores, tendo seu valor de contagem média dividido pelo número de quadrantes contados e multiplicadas pelo volume

da câmara em 1mm^3 (equivalente a 10) e pelo fator dilucional, obtendo assim a quantidade de células estimada por μL .

4.3 Marcação com CFSE e CellTrace Violet

Após a contagem, os RBCs foram marcados com o corante fluorescente reativo com amina intracelular CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster) (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, # C34554, Thermo Fisher Scientific), conforme descrito (Grisendi, Finetti et al. 2015). Resumidamente, uma solução estoque foi preparada pela adição de $36\ \mu\text{L}$ de DMSO a um frasco de corante CellTrace CFSE liofilizado e bem homogeneizado estando disponíveis em alíquotas de $1\ \mu\text{L}$ ($2,5\ \text{Mm}$), armazenadas em -80°C para evitar a degradação. Em seguida, uma solução de coloração de $10\ \mu\text{M}$ foi preparada, imediatamente antes do uso, diluindo $1\ \mu\text{l}$ da solução estoque em $250\ \mu\text{l}$ de PBS. A solução de CFSE com adição das células é mantida em incubação durante 30 minutos em temperatura igual a C. Após a marcação $4\ \text{mL}$ de PBS BSA1% são adicionados, incubando as células durante 5 minutos, em abrigo de luz., em seguida duas lavagens com $5\ \text{mL}$ de PBS 1x foram realizadas.

Para a marcação com CellTrace Violet (CTV #C34557, Thermo Fisher Scientific), uma solução de estoque foi preparada pela adição de $36\ \mu\text{L}$ de DMSO a um frasco de CellTrace Violet liofilizado, após a homogeneização, alíquotas de $1\ \mu\text{L}$ ($2,5\ \text{Mm}$) foram realizadas e mantidas em freezer $-80\ ^\circ\text{C}$, para solução de trabalho, $1\ \mu\text{L}$ da solução de estoque foi diluída em $311\ \mu\text{L}$ de PBS 1x. e adicionada a suspensão de RBCs. A marcação foi realizada em $37\ ^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Após a marcação $2\ \text{mL}$ de PBS BSA 1% foi adicionado e duas lavagens com $5\ \text{mL}$ de PBS 1x foram realizadas.

Para evitar a necessidade de sistemas de controle de gás especializados para atingir e manter a hipóxia dos RBCs falciformes, a indução in vitro da falcização será obtida por desoxigenação química controlada, utilizando metabissulfito de sódio (pirossulfito, $\text{NA}_2\text{S}_2\text{O}_5$), permitindo uma remoção rápida e reprodutível do meio.

4.4 Fixação e Permeabilização para Citometria de Fluxo

Para fixação, $300\ \mu\text{L}$ de sangue total de cada paciente, ou sangue do cordão umbilical foram centrifugados $450\ \text{Xg}$ por 5 minutos para remover o plasma e a camada leucoplaquetária. Desta maneira para remover o restante de plasma e proteínas plasmáticas, $50\ \mu\text{L}$ do concentrado de hemácias foram lavadas duas vezes em $15\ \text{mL}$ de PBS 1x, D-glicose 0,1%, pH 7,4 em temperatura 24°C . Após a remoção do sobrenadante, $10\ \mu\text{L}$ do pellet de hemácias foram adicionadas em $1\ \text{mL}$ de solução de fixação contendo

glutaraldeído 0,05% em PBS1x gelado, e incubadas durante 10 minutos em T.A sobre constante homogeneização para evitar formação de agregados celulares. Em seguida, para lavagem, é adicionado 5 mL de PBS 1x e o procedimento foi realizado por 3 vezes para remover a autofluorescência ocasionada pelo glutaraldeído. Com as células então já fixadas, é realizado uma contagem de câmera de Neubauer, para transferência exata de (9×10^5) células do paciente e (1×10^5) célula do spike in. Em seguida é realizado o processo de permeabilização. Para isso 1 mL de solução de permeabilização contendo Triton X 100 0,1% em PBS BSA 0,1% foi adicionada as células com incubação durante 25 minutos em T.A. Após a permeabilização duas lavagens com 5 mL de PBS 1x foram realizadas e 1 mL de solução de saturação (PBS1x, BSA 1%, 2% de soro equino) foi adicionada seguida de incubação durante 20 minutos.

As células foram centrifugadas em 500 xg por 5 minutos, e ressuspensas em 200 μ L de solução de saturação. Em tubos de citometria destinados a marcação com anti-HbG 60 μ L de solução de saturação foi adicionada. Para a realização da marcação com anti-HbF 2 μ L de anticorpo anti-HbF PE (*Fetal Hemoglobin Mouse Anti-Human, PE, Clone 2D12, # 560041, BD Biosciences*) foi adicionado. Para os tubos de controle negativo, apenas 10 μ L das células de todos os pacientes foram utilizadas e não foram submetidas a marcação com anti-HbF. Após a marcação as células foram lavadas em solução de saturação e ressuspensas em 300 μ L de PBS 1 x para aquisição dos dados.

4.5 Glicerolização

Para minimizar a variação experimental entre amostras coletadas em dias distintos, as hemácias são criopreservadas a -80°C usando um protocolo baseado em glicerol descrito previamente por (Hebert, Rakotoson et al. 2020) (HEBERT; RAKOTOSON; BODIVIT; AUDUREAU *et al.*, 2020). Resumidamente o glicerol é diluído em uma solução de PBS 0,1% de D-glicose, pH 7,4, de modo que sua concentração final é estimada em 60%. Em um criotubo, 300 μ L de PBS glicose 0,1% foram adicionados seguidos de 300 μ L de PBS glicerol 60%, 300 μ L de concentrado de hemácias, 900 μ L de PBS glicerol 60% respectivamente. As amostras são homogeneizadas delicadamente e colocadas no recipiente de congelamento Coolcell (Biocision, Larkspur, CA), garantindo congelamento com taxa controlada ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ quando colocado em um freezer -80°C).

4.6 Desglicerolização

Para desglicerolização/descongelamento de amostras de sangue de cordão umbilical glicerolizadas, os tubos são incubados a 37°C em banho-maria, as hemácias são então lavadas para remover o glicerol utilizando duas soluções com concentrações decrescentes de NaCl, para reter a isotonicidade. Inicialmente, 75µl de solução de desglicerolização (NaCl 12%) são adicionados por gotejamento às suspensões globulares, homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, 125µl de glicose NaCl 0,9% são adicionados às suspensões e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Quatro volumes de ~125µl de 0,9% de glicose NaCl são então adicionados, com uma incubação de 5 minutos entre cada nova adição. As suspensões são então transferidas para tubos de centrífuga de 2mL e centrifugadas a 300G por 10 minutos em temperatura ambiente (com uma leve desaceleração de 5). O sobrenadante é finalmente removido e quatro volumes de ~125µl de 0,9% de glicose NaCl são adicionados novamente (com intervalos de incubação de 5 minutos) e a suspensão é centrifugada novamente (a 300G por 10 minutos à temperatura ambiente). Para remover completamente a solução, 500µl de NaCl 0,9% de glicose é adicionada de uma só vez e as hemácias são centrifugadas a 800g por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de remover a solução sobrenadante, os RBCs são diluídos até a concentração desejada adicionando uma solução tampão apropriada.

4.7 Citometria de Fluxo

Em geral, um total de 1×10^6 RBCs foram permeabilizados e marcados com 2µl (0,4µg) do anticorpo anti-HbF (Mouse IgG1κ, Clone 2D12, BD Pharmingen Cat. 560041, 0.2mg/ml). Variações destas condições são explicitadas no texto.

Um total de 200 mil eventos foram adquiridos, utilizando um equipamento BD FACSymphony A1 Cell Analyzer, utilizando o Software FACSDiva Versão 9.0.2 (Becton, Dickinson). A aquisição da fluorescência derivada do anticorpo anti-HbF-PE (Max Ex/Em: 565/578nm) se deu com a excitação mediada pelo laser Yellow-Green (561nm), utilizando o detector E (LongPass filter: 580nm e BandPass filter: 586/15nm). A aquisição da fluorescência derivada do CFSE (Max Ex/Em: 492/517nm) se deu com o laser Blue (488nm) e o detector C (LP:505 e BP:530/30nm). Os dados adquiridos das quatro Amostras Teste contendo o Spike-In foram analisados usando o software FlowJo (versão 10.8.1). Os dados brutos foram aparados para excluir artefatos, como dupletos (ou aglomerados) ou precipitados fluorescentes.

Com o objetivo de facilitar a compreensão dos dados, as estratégias de gates e das análises são apresentadas de forma detalhada juntamente com os resultados.

5 Resultados

5.1 *Quantificação de HbF ao Nível Unicelular por Citometria de Fluxo*

A fim de desenvolver nosso teste quantitativo, nos baseamos em métodos gerais de citometria de fluxo bem estabelecidos e descritos na literatura previa (COSSARIZZA; CHANG; RADBRUCH; ACS *et al.*, 2019) (MITTAG; TARNOK, 2009; MIZRAHI; ISH SHALOM; BANİYASH; KLIEGER, 2018; WANG; HOFFMAN, 2017), os quais que foram adaptados para o desenvolvimento de um procedimento prático, de modo a minimizar a utilização de insumos laboratoriais e permitir uma fácil análise.

Especificadamente comparamos o método de quantificação tradicional com o método de citometria de fluxo publicado recentemente para quantificação de HbF no nível de célula única, usando a patente detalhada (WO2018083426A1) como referência, conforme descrito abaixo (HEBERT; RAKOTOSON; BODIVIT; AUDUREAU *et al.*, 2020). método de citometria de fluxo desenvolvido recentemente por Hebert et al. permitiu a quantificação de HbF ao nível unicelular, demonstrando que um limiar de HbF/RBC de 4pg estava associado a uma diminuição na incidência de crises vaso-occlusivas. Além disso, este método permitiu o acompanhamento longitudinal de pacientes, durante o tratamento com hidroxiuréia (HEBERT; RAKOTOSON; BODIVIT; AUDUREAU *et al.*, 2020). Apesar da quantificação da HbF ao nível unicelular refinar o poder preditivo, em relação à simples avaliação da porcentagem de células F (HbF+), este método é extremamente laborioso, e sua aplicação rotineira na clínica é inviabilizada. Basicamente, este método se baseia numa abordagem de normalização proposta originalmente por Horiuchi, a qual permite a estimativa do conteúdo de %HbF ao nível de uma única célula (HORIUCHI; OSTERHOUT; KAMMA; BEKOE *et al.*, 1995; STEINBERG; CHUI; DOVER; SEBASTIANI *et al.*, 2014), mas a expande, para derivar uma medida de HbF/RBC, por meio da determinação da quantidade HbF Corpuscular Média (MCHbF) de amostras controle de referência. Estas amostras são derivadas de vários indivíduos portadores de persistência hereditária de hemoglobina fetal quais são utilizadas em uma curva padrão para a quantificação das amostras dos pacientes com AF (HEBERT; RAKOTOSON; BODIVIT; AUDUREAU *et al.*, 2020).

O método de nosso projeto propõe eliminar a necessidade de realizar uma curva padrão com várias amostras. Para isso, propomos o uso de um controle celular interno

especialmente desenvolvido, a ser introduzido na amostra do paciente com AF. Este controle “*Spike-In*” é composto por eritrócitos HbF^{Pos}, derivados de sangue de cordão umbilical (SCU, ou UCB RBCs), e eritrócitos HbF^{Neg} de sangue de um adulto saudável normal (Adult RBCs), marcados com um corante fluorescente (CFSE ou CellTrace Violet) e fixados. Sob condições experimentais controladas, a intensidade de fluorescência do anticorpo anti-HbF em um eritrócito está linearmente relacionada ao conteúdo de HbF (HEBERT; RAKOTOSON; BODIVIT; AUDUREAU *et al.*, 2020). Assim, o uso do controle *Spike-in* permitirá a correção das variações experimentais advindas do manuseio da amostra durante a marcação (por exemplo, pipetagem, incubação, temperatura, diferenças de afinidade/fluorescência entre lotes do anticorpo, etc.) ou da aquisição pelo citômetro de fluxo, permitindo uma quantificação de HbF/RBC mais robusta e direta, utilizando um único tubo, ao invés de uma curva padrão com várias amostras (MITTAG; TARNOK, 2009; MIZRAHI; ISH SHALOM; BANİYASH; KLIEGER, 2018). Especificamente, a estreita distribuição de HbF nas hemácias fetais do SCU permite que o conteúdo médio de hemoglobina fetal corpuscular (MCHbF) seja estimado (em pg/RBC), usando a fórmula $MCHbF = (\%HbF \times MCH) / 100$. A hemoglobina corpuscular média (MCH) das hemácias de SCU é obtida usando um equipamento automatizado de hemograma; por sua vez, a %HbF é obtida com um equipamento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), conforme descrito por Hebert et al. (HEBERT; RAKOTOSON; BODIVIT; AUDUREAU *et al.*, 2020).

Para a quantificação, o controle interno *Spike-In* é adicionado ao tubo contendo a amostra de um paciente e, após permeabilização e marcação com um anticorpo anti-HbF-PE, os valores de MIF (Intensidade Mediana de Fluorescência) são obtidos para as populações HbF^{Pos} (UCB RBCs) e HbF^{Neg} (Adult RBCs) CFSE/CTV-positivas do controle *Spike-In*. Estes valores de MIF são usados, juntamente com os valores pré-calculados de MCHbF correspondentes, para derivar uma equação de regressão linear específica, a qual é então utilizada para converter os valores de intensidade de fluorescência (derivados do anti-HbF-PE) de cada RBC da amostra teste do paciente, em seu conteúdo corpuscular de HbF (cHbF,) em pg/RBC. Os valores de cHbF (HbF/RBC) obtidos para cada célula do paciente são então usados para gerar histogramas de distribuição, que podem ser usados para calcular a porcentagem de RBCs com conteúdos de HbF acima de determinados valores (*cutoffs*) que correspondam, por exemplo, a um limite mínimo (efetivamente protetivo) de HbF/RBC.

5.2 Avaliação do Método de Quantificação de HbF em Amostras Teste

Intensas caracterizações foram realizadas até instituir as condições ideais para estabelecer nosso controle celular interno (Spike-In). Depois de gerado, utilizando primeiramente CFSE como corante fluorescênte, planejamos um experimento para validar o método em diversas condições, simulando amostras com porcentagens variadas de hemácias (RBCs) HbF-positivas. Assim, montamos um experimento baseado em um conjunto de Amostras Teste artificiais, compostas por porcentagens distintas de RBCs HbF^{Pos} de UCB (sendo esta, a mesma célula utilizada para preparo do controle Spike-In) e RBCs HbF^{Neg} de um Adulto (o mesmo usado no Spike-In). Foram geradas quatro condições amostrais: 100%UCB-0%Adulto, 80%UCB-20%Adulto, 50%UCB-50%Adulto e 20%UCB-80%Adulto.

Depois de fixar as quatro amostras de teste distintas, $0,9 \times 10^6$ RBCs de cada amostra foram misturados com $0,1 \times 10^6$ RBCs do controle Spike-In (10% do total), totalizando 1×10^6 RBCs por tubo. Esses tubos foram então permeabilizados e marcados com o anticorpo anti-HbF e adquiridos pelo citômetro FACS Symphony A1 (BD).

5.2.1 Condição Experimental 1: 1×10^6 RBCs por tubo ($2 \mu\text{l}$ de anti-HbF)

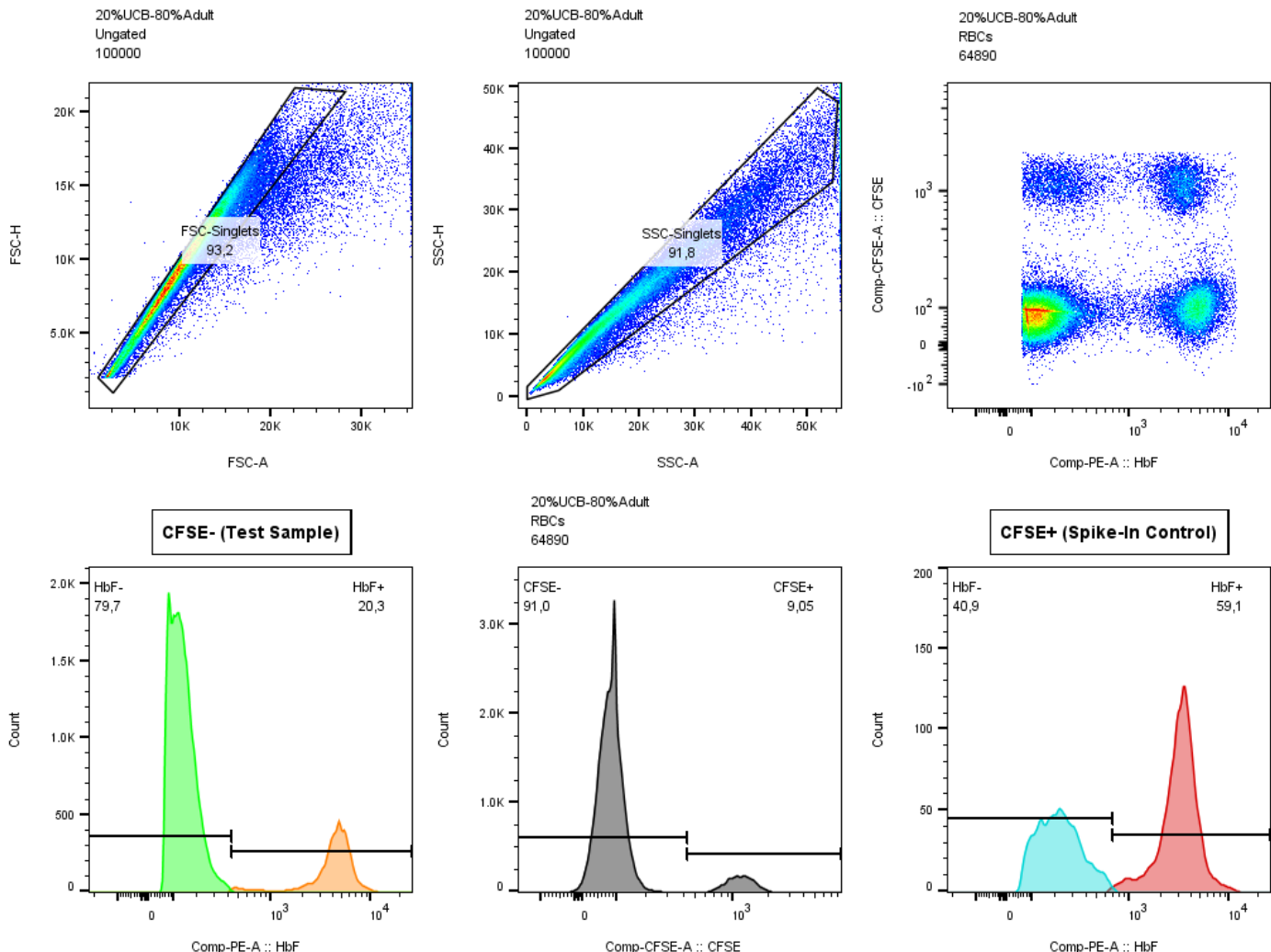
Nesta condição, um total de 1×10^6 RBCs foram permeabilizados e marcados com $2 \mu\text{l}$ ($0,4 \mu\text{g}$) do anticorpo anti-HbF, condição similar à utilizada durante as padronizações. Um total de 100 mil eventos foram adquiridos. *xcx*

Os dados adquiridos das quatro Amostras Teste contendo o Spike-In foram analisados usando o software FlowJo (versão 10.8.1). Os dados brutos foram aparados para excluir artefatos, como aglomerados celulares ou precipitados fluorescentes. Os “Singlets” foram selecionados removendo os eventos cujos valores para os parâmetros FSC-A (*Forward Scatter peak Area*) e SSC-A (*Side Scatter peak Area*) foram maiores do que o esperado, conforme indicado por um deslocamento do eixo de correlação obtido ao plotá-los contra os valores correspondentes de FSC-H e SSC-H (*Height*, altura do pico). Além disso, os eventos foram plotados com os parâmetros de intensidade de fluorescência compensada PE-A e CFSE-A, a fim de delinear um Gate retangular central compreendendo as populações CFSE+ (controle Spike-In) e CFSE- (amostra de teste), bem como as populações HbF+ e HbF- (também definidas pelos controles presentes no Spike-in). Finalmente, um Gate booleano “AND”, derivado pela interseção de todas as três Gates descritos acima, foi obtido e denominado “RBCs”. A estratégia de gates é mostrada na figura 4 mais a frente.

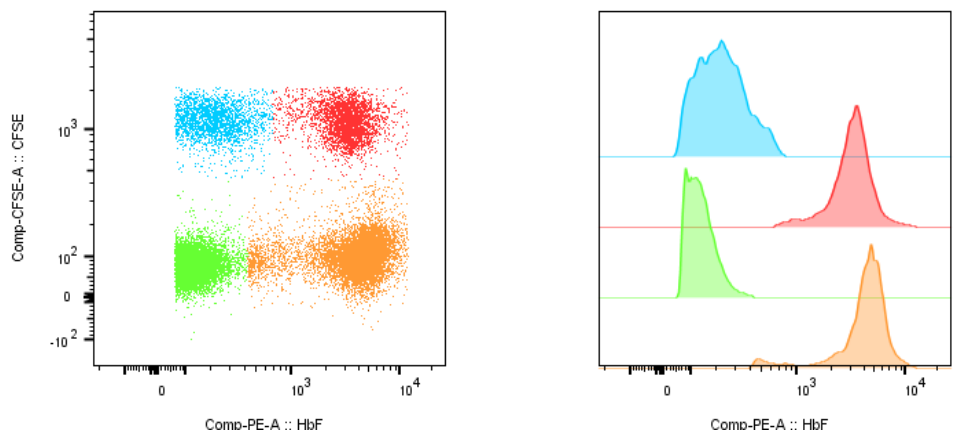
Para cada tubo contendo uma amostra de teste (e o controle interno Spike-In), os valores de MIF (Intensidade Mediana de Fluorescência) obtidos para as populações de controle HbF^{Pos} (UCB RBCs) e HbF^{Neg} (Adult RBCs) das RBCs CFSE+ do controle Spike-In foram usados para derivar uma equação de regressão linear específica, que foi então utilizada para converter os valores de intensidade de fluorescência (PE-A) de cada RBC (da Amostra Teste, bem como do próprio Spike-In) em seu conteúdo corpuscular absoluto estimado de HbF (cHbF, em pg/RBC).

Para este fim, após delimitar os eritrócitos CFSE-positivos do controle Spike-In, o MIF foi obtido para a população controle HbF-PE positiva (HbF^{Pos} UCB RBCs) e para a população de controle HbF-PE negativa (HbF^{Neg} Adult RBCs). A estratégia de gates é mostrada na figura 4 a seguir. A Figura 5 apresenta, de forma resumida, as análises das demais Amostras Teste e seus respectivos controles Spike-In internos.

Figura 4. Estratégia de gates para a definição das populações e para obtenção da estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações da Amostra Teste.

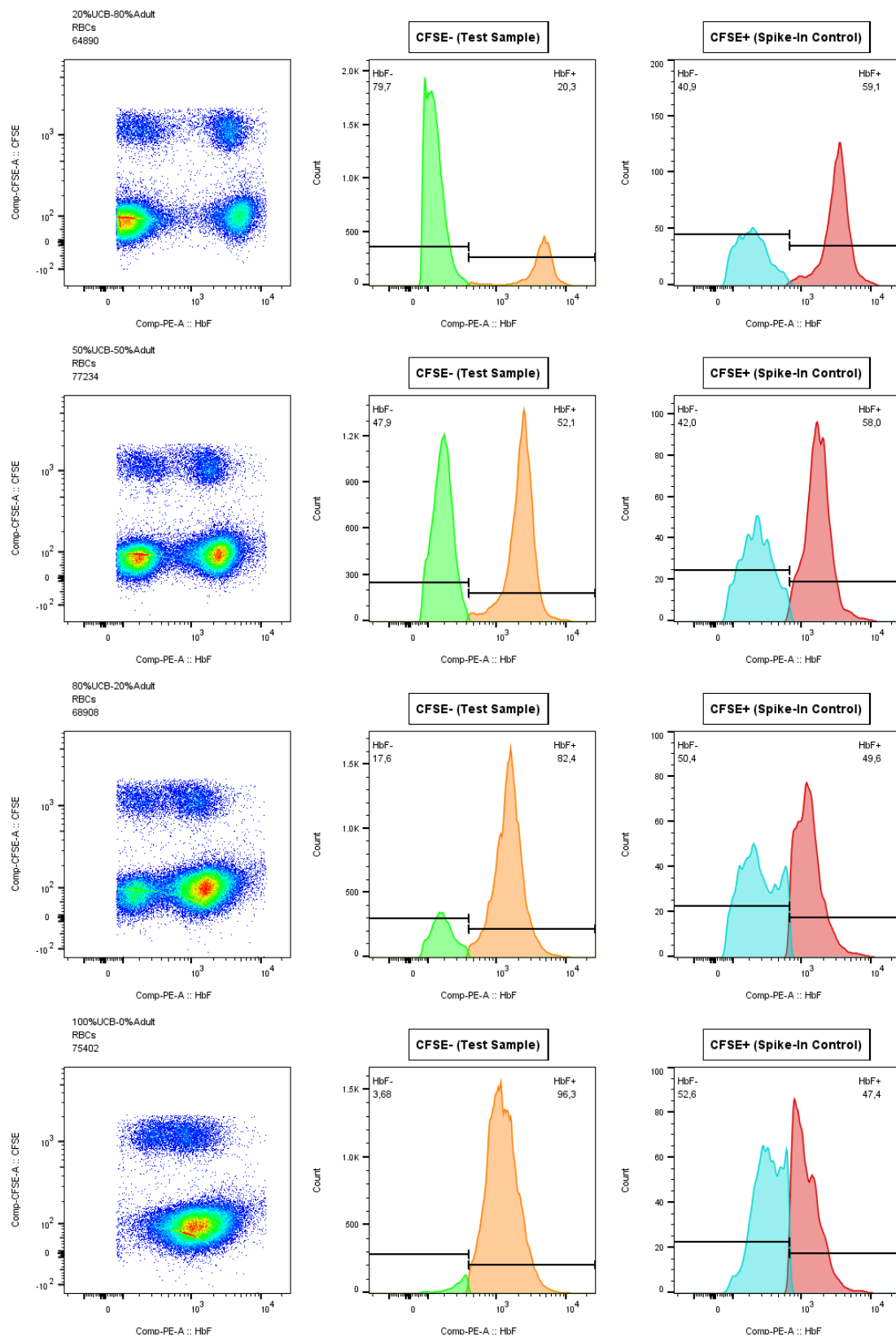


Sample Name	Full Gating Path	Count	Freq. of Parent	Freq. of Total	Median : Comp-PE-A	Mean : Comp-PE-A	Mode : Comp-PE-A	SD : Comp-PE-A	Robust SD : Comp-PE-A	CV : Comp-PE-A	Robust CV : Comp-PE-A
20 % UCB-80 % Adult	Singlets/RBCs/CFSE+/HbF-	2399	40,9	2,40	219	244	222	130	122	53,5	55,9
20 % UCB-80 % Adult	Singlets/RBCs/CFSE+/HbF+	3472	59,1	3,47	3188	3316	3405	1430	1116	43,1	35,0
20 % UCB-80 % Adult	Singlets/RBCs/CFSE-/HbF-	47051	79,7	47,1	129	142	80,9	58,1	52,8	41,0	40,8
20 % UCB-80 % Adult	Singlets/RBCs/CFSE-/HbF+	11988	20,3	12,0	4366	4308	4573	1818	1609	42,2	36,8



O gráfico representa a análise da amostra teste composta por 20% de hemácias UCB e 80% de hemácias adultas. Descrição no texto.

Figura 5. Dot Plots e histogramas das diferentes Amostras Teste e respectivos Controles Spike-In.

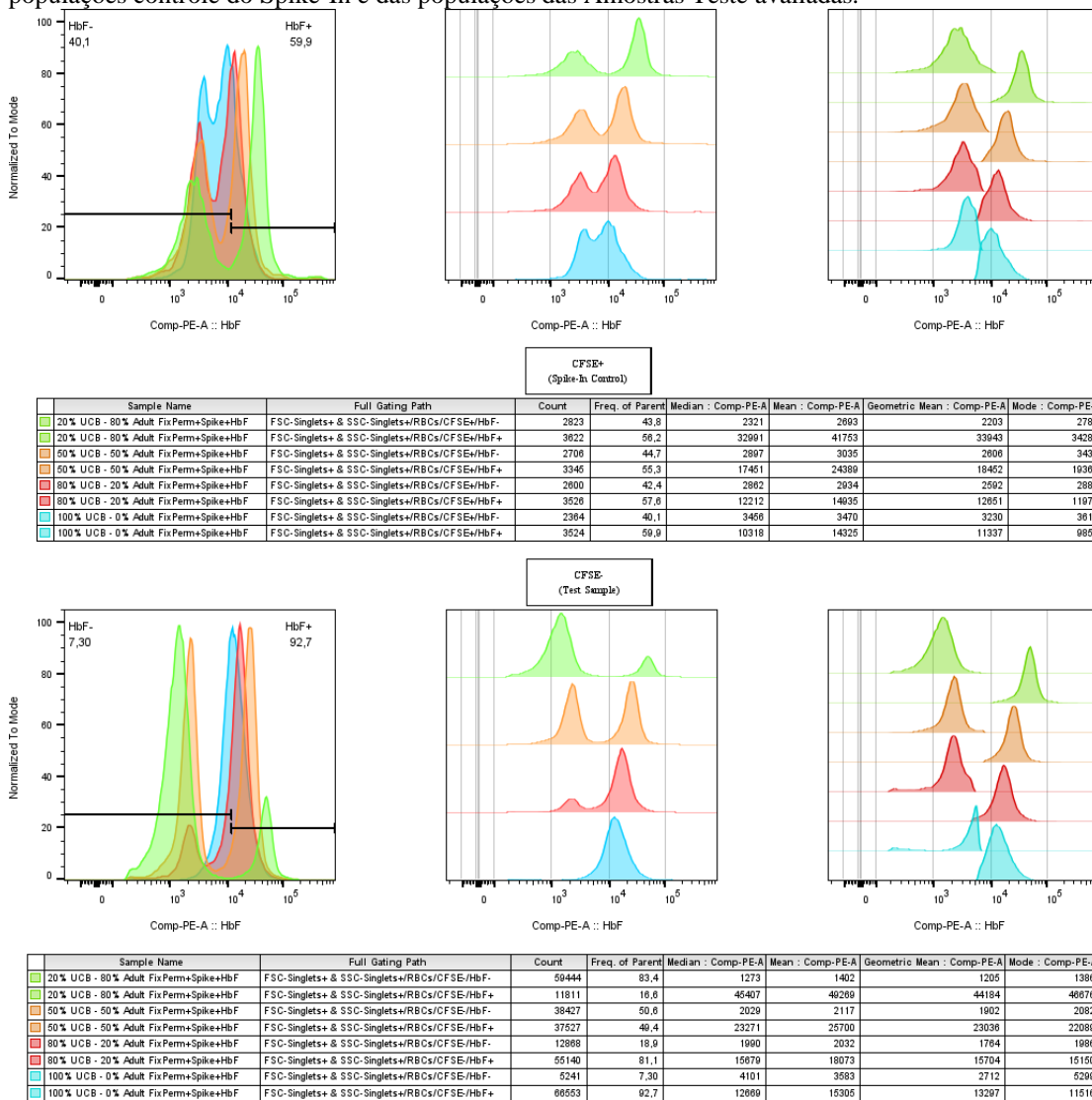


Utilizando a mesma estratégia de gates ilustrada na figura 4, estão apresentadas, de cima para baixo, as Amostras Teste com 20%, 50%, 80% e 20% de hemácias HbF+ de UCB (preparadas em hemácias de um indivíduo adulto), assim como os respectivos controles Spike-In, contendo hemácia de UCB e de um adulto (50% de cada) marcadas com CFSE. Descrição detalhada no texto.

Como pode ser observado na Figura 5, contendo as análises das demais Amostras Teste e seus respectivos controles Spike-In internos, fica evidente que, para esta condição experimental (total de 1 milhão de células, marcadas com 2 μ L de anti-HbF), o aumento na proporção de hemácias HbF+ de UCB resultou numa redução progressiva na separação entre as populações HbF+ (UCB) e HbF- (sangue adulto), tanto na população de células da amostras teste (CFSE-), quanto do Spike-In (CFSE+). A diminuição na capacidade de separação entre as populações HbF-positivas e negativas se deve à menor disponibilidade de anticorpos anti-HbF para marcar as células HbF+, em função do aumento no número total de hemácias HbF+, o qual varia de cerca de 200 mil na amostra com 20% de hemácias de UCB, para cerca de 1 milhão na Amostra Teste com 100% de RBCs de UCB. Este aumento de 5 vezes no número de hemácias HbF+ entre estas duas Amostras Teste, o qual corresponde a uma redução de 5 vezes na disponibilidade do anti-HbF, acabou limitando a capacidade de definirmos (de forma precisa) os gates para as populações controle HbF+ e HbF- do Spike-In, na Amostra Teste com 100% de hemácias HbF+. Similarmente, a separação entre as populações controle foi prejudicada na Amostra Teste com 80% de UCB RBCs.

Digno de nota, como pode ser visto na figura 5, a redução na disponibilidade de anti-HbF nas amostras com maiores quantidades conhecidas de UCB RBCs impacta a marcação tanto das células controle HbF+ do Spike-In (CFSE+), como as da amostra Teste (CFSE-). De fato, o método desenvolvido por nós parte do princípio de que as variações experimentais que impactam as células de uma amostra de interesse poderiam ser corrigidas por um controle interno, com células submetidas às mesmas condições experimentais. Assim, com o objetivo de avaliar a capacidade de nosso método quantitativo corrigir estas variações, procedemos com a obtenção das estatísticas descritivas para todas as populações HbF+ e HbF-, tanto das Amostras Teste como dos respectivos controles internos Spike-In (Figura 6).

Figura 6. Padrão de distribuição da intensidade de fluorescência de HbF-PE-A e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.



As tabelas mostram as diferentes estatísticas (mediana, média e moda) derivadas das populações HbF+ e HbF- das populações CFSE+ do controle Spike-In e, também, das populações CFSE- das Amostras Teste.

Como pode ser visto na figura 6, a superposição dos histogramas, assim como as quantificações apresentadas nas tabelas, evidenciam de forma clara a redução na intensidade de fluorescência nas populações HbF positivas. Ainda, essa redução se dá de forma proporcional, tanto nas células do Spike-In como na Amostra Teste. Por exemplo, nas UCB RBCs do Spike-In a mediana da intensidade de fluorescência (MIF) cai sucessivamente de 3299 (unidades arbitrárias) para 1745, 1221, e 1031, enquanto que nas Amostras Teste, a MIF caiu de 4366, para 2254, 1477, e 1164 (quedas de ~48%, 34%, e 21%). Para avaliar se o método proposto, utilizando o controle endógeno Spike-In poderia corrigir as condições com as quantidades de UCB supracitadas acima, derivamos uma regressão linear, com base nos valores de MIF das populações controle HbF^{Pos} e HbF^{Neg} CFSE+ do Spike-In foram usados juntamente com os valores de MCHbF correspondentes derivados das populações controle HbF^{Pos} e HbF^{Neg} CFSE+ do Spike-In foram usados juntamente com os valores de MCHbF correspondentes (23,40 pg/RBC e 0 pg/RBC). Esses valores de MCHbF foram calculados com base na porcentagem de HbF (quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência-HPLC) e no valor da hemoglobina corpuscular média (MCH), derivado de um analisador hematológico. As equações de regressão linear para cada Amostra Teste avaliada foram obtidas usando o software GraphPad Prism, e estão apresentadas na tabela 1 abaixo. A tabela exibe os valores de MIF e MCHbF correspondentes usados para derivar os parâmetros da equação (também exibidos na tabela), incluindo a inclinação (Slope) e a interseção com o eixo Y (Y-intercept), bem como a própria equação.

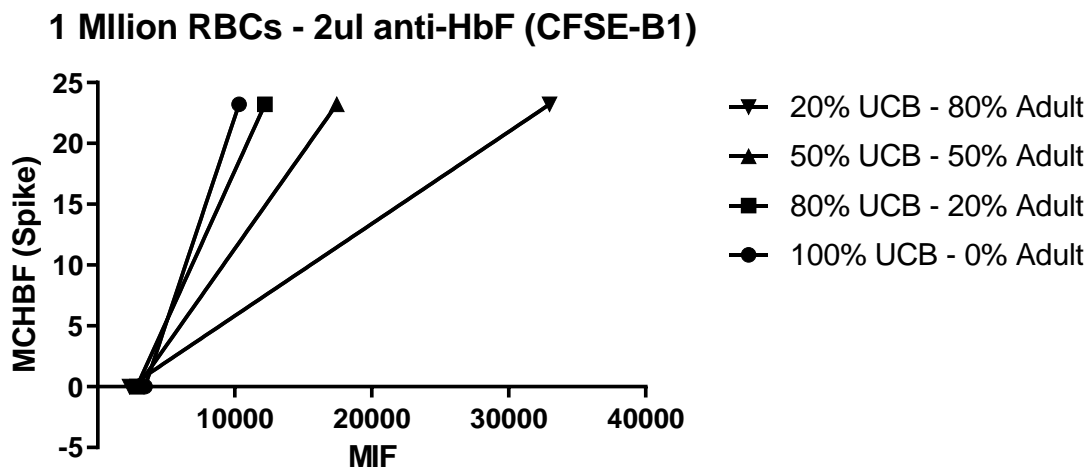
Tabela 1. Equações de regressão linear derivadas dos controles Spike-In.

Test Sample	MIF HbF-X- Intercept)	MIF HbF+	Slope	Y-intercept	Equation
100% UCB - 0% Adult	3456	10318	0,003382	-11,69	$Y = 0,003382 * X - 11,69$
80% UCB - 20% Adult	2862	12212	0,002482	-7,104	$Y = 0,002482 * X - 7,104$
50% UCB - 50% Adult	2897	17451	0,001595	-4,62	$Y = 0,001595 * X - 4,620$
20% UCB - 80% Adult	2321	32991	0,0007568	-1,756	$Y = 0,0007568 * X - 1,756$

Para cada tubo contendo a Amostra Teste e o controle Spike-In, os valores MIF obtidos para as populações controle HbF^{Pos} e HbF^{Neg} foram usados, juntamente com seus valores MCHbF correspondentes (23,40pg/RBC e 0pg/RBC, respectivamente), para derivar uma Equação de Regressão Linear específica (utilizando o software GraphPad Prism). Estas equações foram então usadas para converter os valores de Intensidade de Fluorescência do anti-HbF-PE (PE-A) de cada célula em um conteúdo absoluto de HbF estimado (cHbF), em pg/RBC. Nas equações, Y corresponde ao cHbF e X corresponde à intensidade de fluorescência do anti-HbF (comp-PE-A).

A figura 7 logo em seguida mostra um gráfico representativo das equações de regressão linear obtidas para todas as Amostras Teste na condição de 1 milhão de RBCs utilizando-se 2 uL.

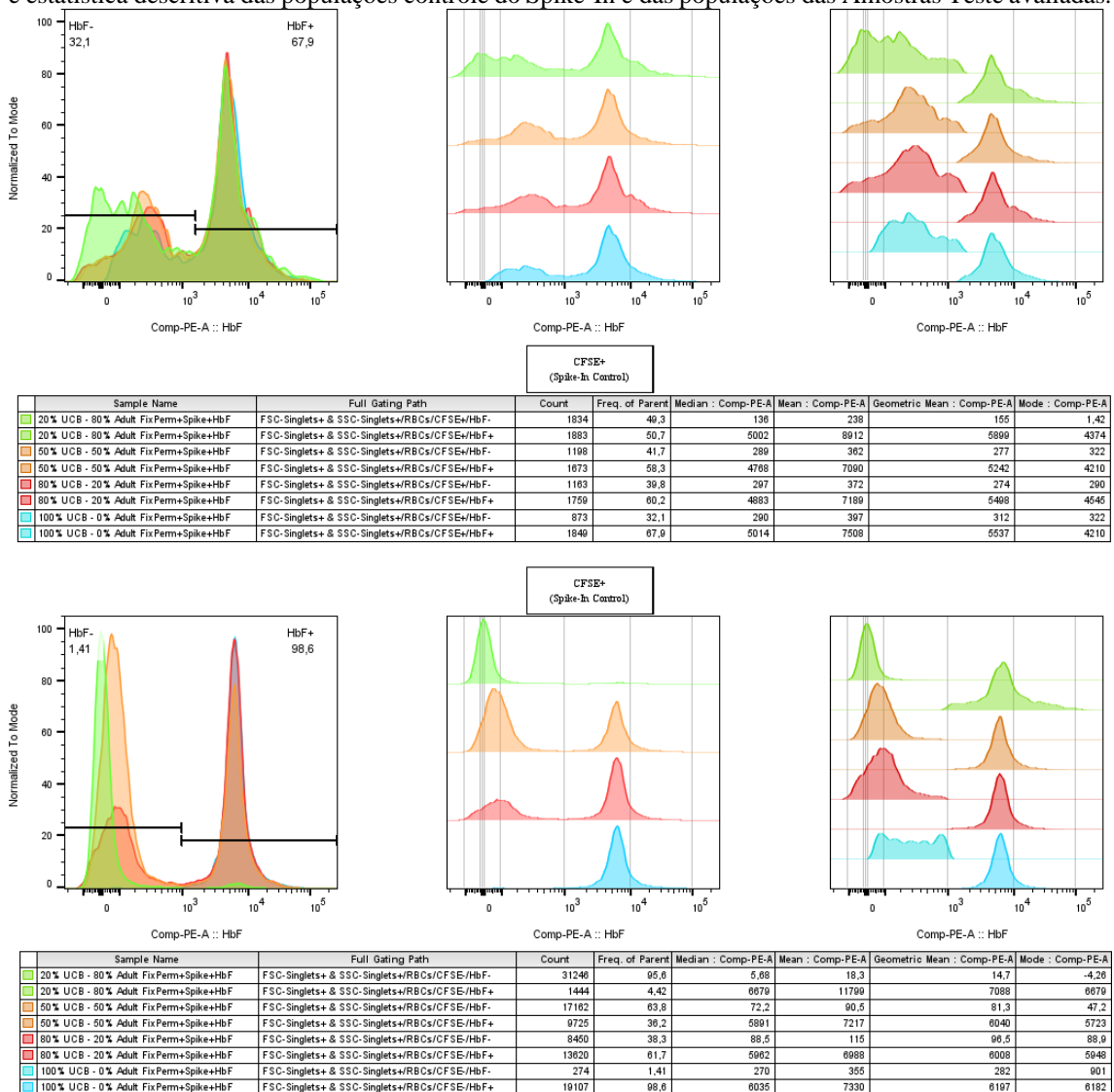
Figura 7. Gráfico representativo da equação de regressão linear derivada das duas populações de RBCs controle contidas no controle interno Spike-In marcado com CFSE.



Finalmente, os valores de intensidade de fluorescência (PE-A) de cada célula foram convertidos em seu conteúdo de HbF corpuscular absoluto estimado (cHbF, em pg/RBC) aplicando as equações aos dados de fluorescência do anti-HbF-PE compensados (comp-PE-A), usando a ferramenta “Derive Parameters” do próprio software FlowJo. Esta ferramenta permite adicionar um novo parâmetro aos dados realizando operações em um parâmetro existente, como no caso as equações de regressão linear, obtidas das amostras testes. Uma vez criado, o parâmetro derivado se comporta como parâmetros que foram coletados durante a aquisição. Isso permitiu que cada RBC da amostra fosse exibido em gráficos dentro do editor de layout do software, de acordo com seu conteúdo absoluto de cHbF correspondente (em pg/RBC), ao invés de intensidade de fluorescência PE. Por sua vez, isso permitiu que as populações de RBC fossem avaliadas quanto à distribuição dos conteúdos absolutos de HbF (em pg/RBC).

A figura 8 a seguir, mostra a comparação de todas as Amostras Teste após a conversão da intensidade de fluorescência (PE-A) de cada célula em seu conteúdo de HbF corpuscular absoluto estimado (cHbF, em pg/RBC).

Figura 8. Padrão de distribuição do conteúdo de HbF corpuscular absoluto estimado (cHbF, em pg/RBC) e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.

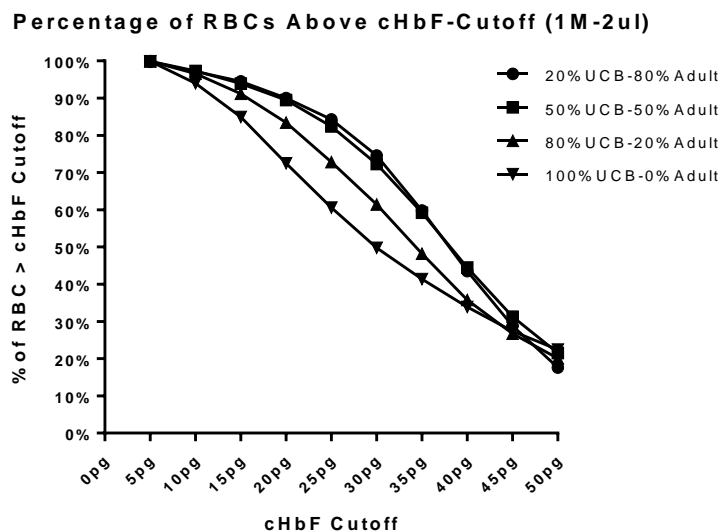


As tabelas mostram as estatísticas (mediana, média e moda) derivadas das populações HbF+ e HbF- das populações CFSE+ do controle Spike-In e, também, das populações CFSE- das Amostras Teste.

Pode-se notar que a conversão resulta em populações com padrões de distribuição mais similares entre as diferentes condições expressas nas Amostras Testes, como esperado para populações de células iguais, evidenciando que o método de fato corrige (ao menos em parte) as variações experimentais.

Para melhor caracterizar a capacidade de correção de nosso método quantitativo, nós calculamos, dentre as células HbF+ das Amostras Teste, as porcentagens de células contendo quantidades de HbF acima de diferentes valores de referência (cHbF Cutoff). Como fica evidenciado pela figura 9, o método permitiu a obtenção de distribuições praticamente iguais para as duas Amostras Teste em que a quantidade de anticorpo não foi limitante (20% e 50% UCB), conseguindo uma correção aproximada para a amostra com 80% de UCB. No entanto, fica evidente que o método falhou para a condição contendo 100% de UCB, em função da impossibilidade de definir adequadamente as populações HbF+ e HbF- do Spike-In.

Figura 9. Comparação do padrão de distribuição do conteúdo de HbF (cHbF) entre as diferentes amostras teste.

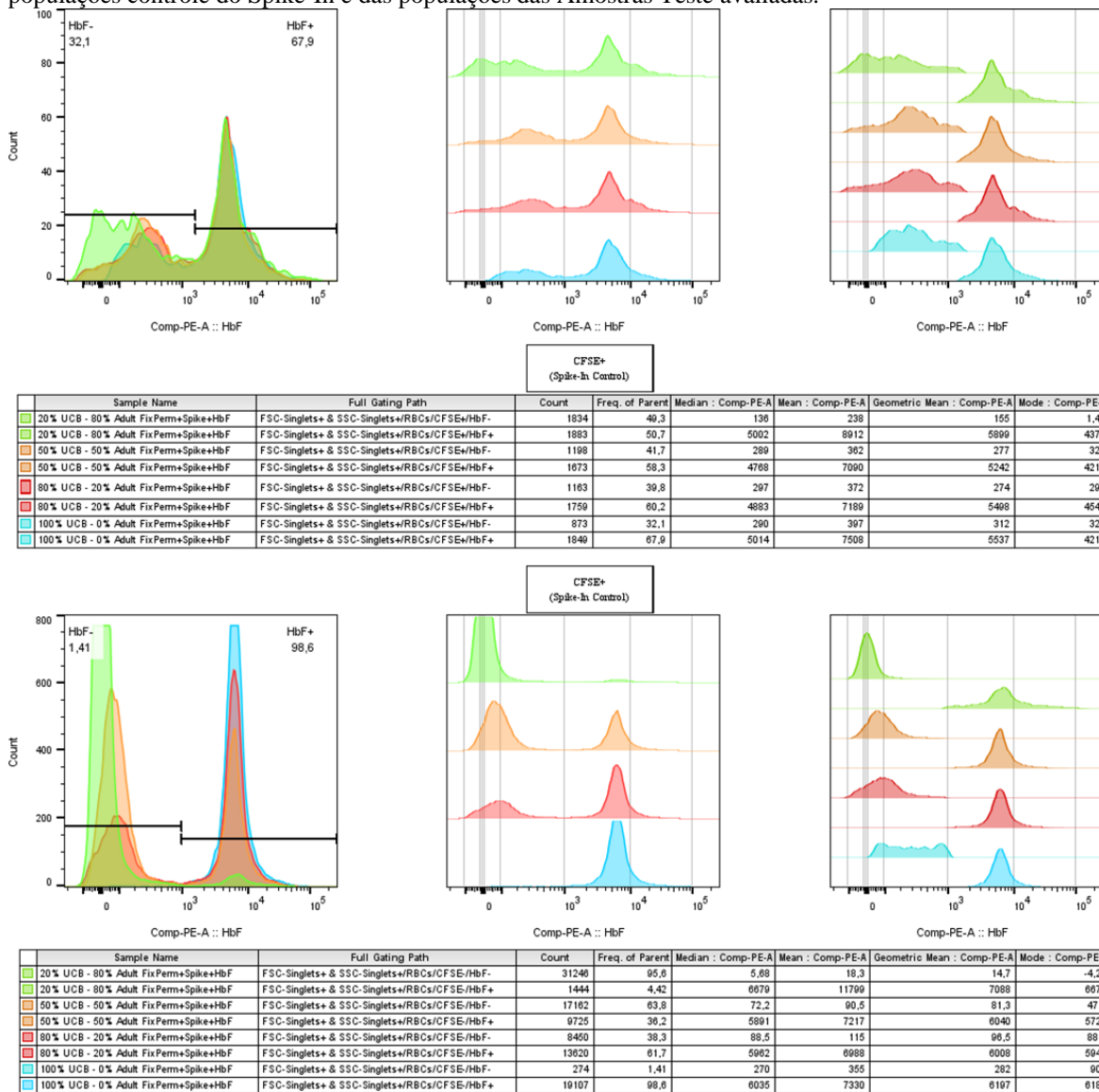


As porcentagens de células contendo quantidades de HbF acima de diferentes Cutoffs de cHbF foram calculadas dentre as células HbF+ das diferentes Amostras Teste.

Frente a estes resultados, realizamos um novo experimento utilizando condições experimentais onde a quantidade de anticorpo disponível fosse suficiente para garantir a marcação adequada do total de células utilizadas, independente da porcentagem de células HbF+ de UCB. Neste experimento, utilizamos as mesmas proporções de células Adultas (HbF neg) e UCB (HbF Pos), realizadas com marcação final de total de 1×10^5 RBCs por tubo e $5 \mu\text{l}$ do anticorpo anti-HbF. Utilizando a mesma estratégia de gates e de análises

descrita anteriormente, as figuras e as estatísticas descritivas foram obtidas para as populações HbF+ e HbF- das Amostras Teste e dos controles internos Spike-In, podendo ser visualizadas a seguir (Figura 10).

Figura 10. Padrão de distribuição da intensidade de fluorescência de HbF-PE-A e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.



Condição Experimental 2: 1×10^5 RBCs por tubo, marcadas com $5 \mu\text{l}$ de anti-HbF.

Fica evidente a partir da análise das figuras e dos dados nas tabelas apresentadas na figura 10, que com esta condição experimental reduziu drasticamente a variação da intensidade de fluorescência em função da porcentagem de RBCs HbF positivas, uma vez que a distribuição das intensidades foi similar em todas as condições, resultando em estatísticas muito parecidas.

As equações de regressão linear para cada uma das Amostras Teste, avaliadas utilizando a condição experimental com 1×10^5 RBCs e $5 \mu\text{l}$ de anti-HbF, foram obtidas conforme descrito anteriormente e estão apresentadas na tabela 2 a seguir.

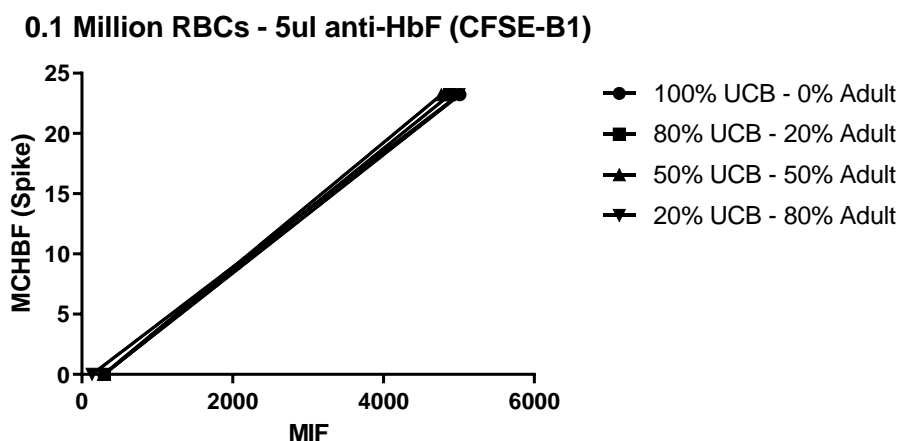
Tabela 2. Equações de regressão linear derivadas dos controles Spike.

Test Sample	MIF HbF-X- Intercept)	MIF HbF+	Slope	Y- intercept	Equation
100% UCB - 0% Adult	290	5014	0,004913	-1,425	$Y = 0,004913 * X - 1,425$
80% UCB - 20% Adult	297	4883	0,005061	-1,503	$Y = 0,005061 * X - 1,503$
50% UCB - 50% Adult	289	4768	0,005182	-1,498	$Y = 0,005182 * X - 1,498$
20% UCB - 80% Adult	136	5002	0,00477	-0,6487	$Y = 0,004770 * X - 0,6487$

Para cada tubo contendo a Amostra Teste e o controle Spike-In, os valores MIF obtidos para as populações controle HbFPos e HbFNeg foram usados, juntamente com seus valores MCHbF correspondentes (23,40pg/RBC e 0pg/RBC, respectivamente), para derivar uma Equação de Regressão Linear específica (utilizando o software GraphPad Prism). Estas equações foram então usada para converter os valores de Intensidade de Fluorescência do anti-HbF-PE (PE-A) de cada célula em um conteúdo absoluto de HbF estimado (cHbF), em pg/RBC. Nas equações, Y corresponde ao cHbF e X corresponde à intensidade de fluorescência do anti-HbF (comp-PE-A).

A figura 11 abaixo ilustra os gráficos das equações de regressão linear derivadas das duas populações de RBCs CFSE+ contidas no controle interno Spike-In. As equações de regressão linear obtidas para ambas as condições experimentais são exibidas conjuntamente, para permitir a comparação direta. Claramente, nesta condição experimental, a distribuição dos dados de amostras com diferentes quantidades de UCB(HbF Pos) se tornou muito mais homogêneo quando comparados com a condição anteriormente descrita.

Figura 11. Gráfico representativo da equação de regressão linear derivada das duas populações de RBCs controle contidas no controle interno Spike-In marcado com CFSE.

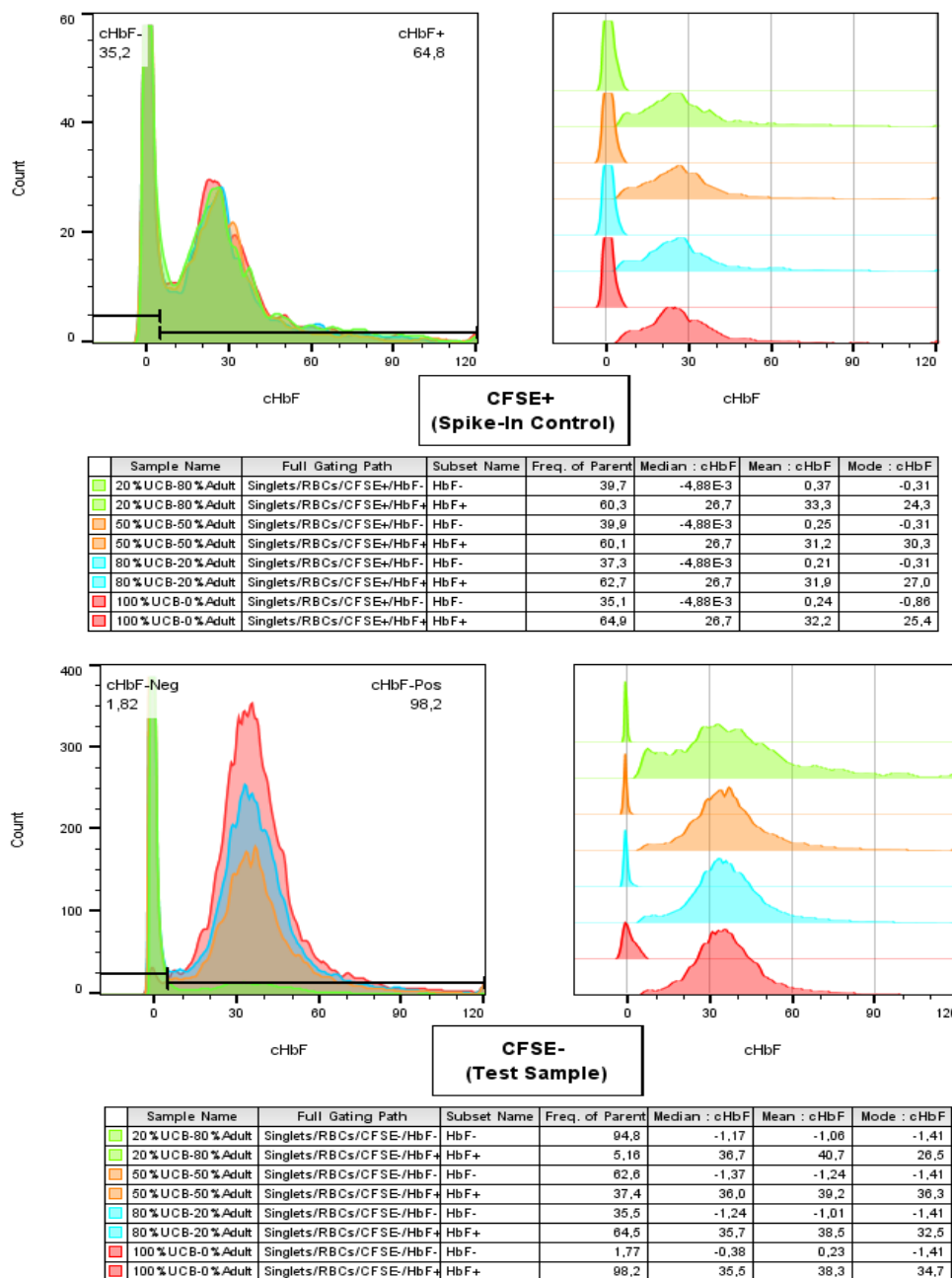


Para permitir a comparação direta, estão representadas as equações de regressão linear obtidas para ambas as condições experimentais.

A figura 12 a seguir, mostra a comparação de todas as Amostras Teste após a conversão da intensidade de fluorescência (PE-A) de cada célula em seu conteúdo de HbF

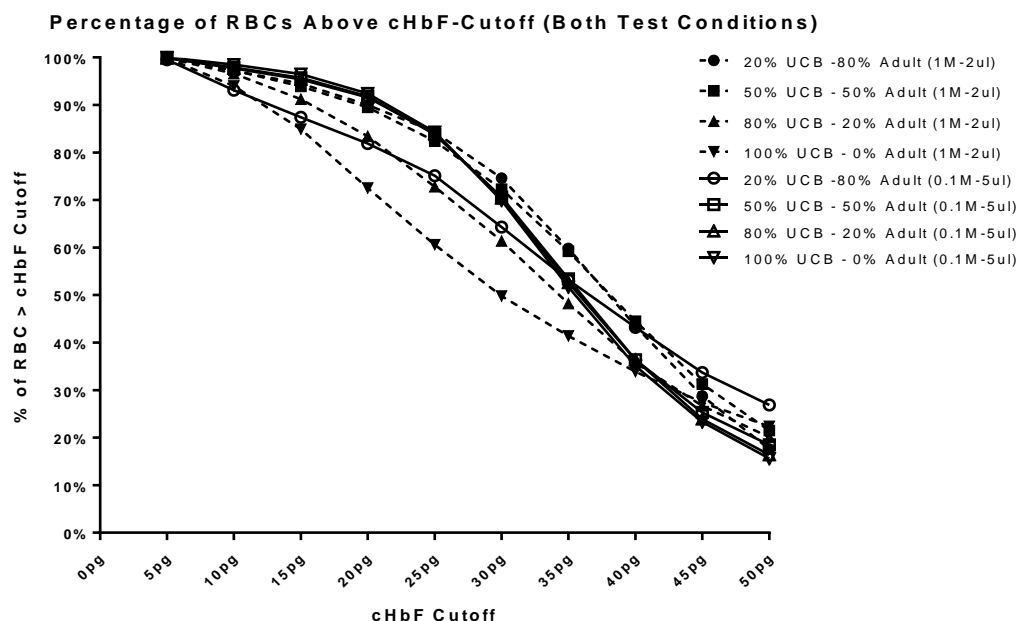
corpúsculo absoluto estimado (cHbF). Pode-se notar que a conversão resulta em populações com padrões de distribuição praticamente idênticos entre as diferentes Amostras Teste.

Figura 12. Padrão de distribuição do conteúdo de HbF corpúsculo absoluto estimado (cHbF), em pg/RBC, e estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Teste avaliadas.



Condição Experimental 2: 1×10^5 RBCs por tubo, marcadas com $5 \mu\text{l}$ de anti-HbF. Novamente, para melhor caracterizar nosso método quantitativo, nós calculamos, dentre as células HbF+ das Amostras Teste, as porcentagens de células contendo quantidades de HbF acima de diferentes valores de referência (cHbF Cutoff). Como fica evidenciado pela figura 13 (linhas sólidas com símbolos vazios), nesta nova condição experimental, o método permitiu a obtenção de distribuições praticamente iguais para todas as Amostras Teste. Apenas a condição com 20% de UCB apresentou uma variação (provavelmente devido ao número reduzido de eventos adquirido).

Figura 13. Comparação do padrão de distribuição do conteúdo de HbF (cHbF) entre as diferentes amostras teste. As porcentagens de células contendo quantidades de HbF acima de diferentes Cutoffs de cHbF foram calculadas dentre as células HbF+ das diferentes amostras.



Os resultados obtidos com a nova condição experimental (linhas contínuas) são comparados com os obtidos com a condição experimental anterior (linhas pontilhadas), os mesmos já apresentados na figura 8.

De maneira geral, como evidenciado pela similaridade dos padrões de distribuição dos valores de cHbF obtidos, a nova condição resultou em uma maior reprodutibilidade da quantificação, independente de variações nas porcentagens de células HbF positivas.

Como referência, a figura 13 também apresenta os resultados derivados da condição anterior. Como pode ser visto, houve uma grande similaridade entre o padrão de distribuição obtido com a nova condição e o obtido com a condição anterior, especificamente para as duas Amostras Teste com 20% e 50% UCB, nas quais a quantidade de anticorpo foi suficiente para garantir a separação entre as populações HbF+ e HbF- do controle Spike-In CFSE+.

5.2.2 Caracterização em amostras com HbF conhecida

Para validar se o nosso método desenvolvido era capaz de fornecer uma estimativa de quantificação de HbF próxima/exata a quantificação de HbF estimada por HPLC (padrão ouro) realizamos um experimento utilizando células de cordão umbilical glicerolizadas que haviam previamente sido caracterizadas por HPLC e por um contador automatizado, portanto seu MCHbF já estava estimado respectivamente (Tabela 3) Para realização, utilizamos a condição experimental de 20%UCB-80%Adulto, acrescido de

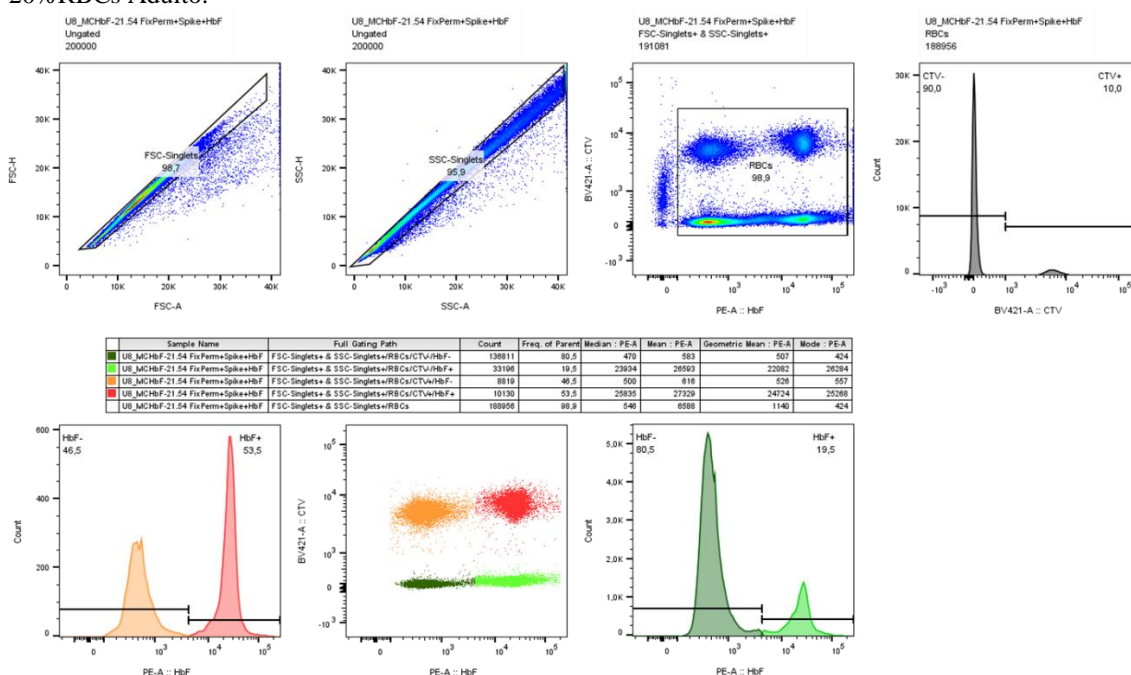
10% de Spike-in com um total de 1×10^6 eritrócitos marcados com $2 \mu\text{L}$ de Anti-HbF. A estratégia de gate representada na figura (4) foi aplicada para todas as amostras teste avaliadas.

Tabela 3. Quantificação de Hemoglobina Fetal por HPLC e dados hematimétricos obtidos das amostras de sangue de cordão umbilical utilizadas para validação.

ID	HPLC-HbF%	MCHbF-Pre-calc	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	Hemogloblin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg/RBC)	MCHC (g/dl)	RDW
U4	92,3	32,58	3,85	13,6	42,6	110,6	35,3	31,9	18,1
U5	75,2	27,07	4,3	15,5	48,7	113,3	36	31,8	18,6
U6	88,6	30,92	4,61	16,1	52,6	114,1	34,9	30,6	17
U7	84,0	30,41	2,93	10,6	34,7	118,4	36,2	30,5	15,7
U8	76,7	27,23	5,15	18,3	57,3	111,3	35,5	31,9	17
U9	72,1	23,87	4,53	15	49,3	108,8	33,1	30,4	16,8
U10	64,1	24,68	3,82	14,7	45	117,8	38,5	32,7	16,3
U12	76,6	27,58	5,41	19,5	58,8	108,5	36	33,2	17,1

Todos os dados clínicos foram substituídos por um denominador anônimo (ID U). As amostras foram avaliadas antes ou após o procedimento de glicerolização. A estimativa de %HbF foi obtida pelo equipamento Trinity Biotech Premier Resolution 2.0.45, e os dados hematimétricos obtidos pelo analisador Sysmex KX21N. Para obtenção dos valores de MCHbF pré calculados, a % de HbF obtida por HPLC foi multiplicada pelo MCH derivado do contador automatizado para cada amostra/ 100.

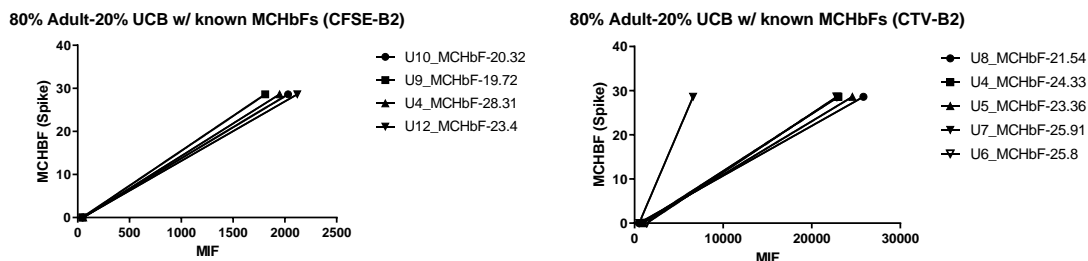
Figura 14. Estratégia de gates para a definição das populações e para obtenção da estatística descritiva das populações controle do Spike-In e das populações das Amostras Testes compostas por 80%RBCs UCB-20%RBCs Adulto.



Dito, obtivemos as MIFs para obtenção das equações de regressão linear para cada amostra teste avaliada (Figura 15). Mais especificadamente devido as circunstâncias associadas a baixa intensidade de marcação do Spike-in (CFSE+), o que muitas das vezes impossibilitava a distinção

entre populações (CFSE+) de populações (CFSE-) criamos outros lotes utilizando as mesmas células, entretanto, passamos a realizar a marcação do Spike-In com o corante similar CellTrace Violet. (Padronização, descrita nos dados suplementares).

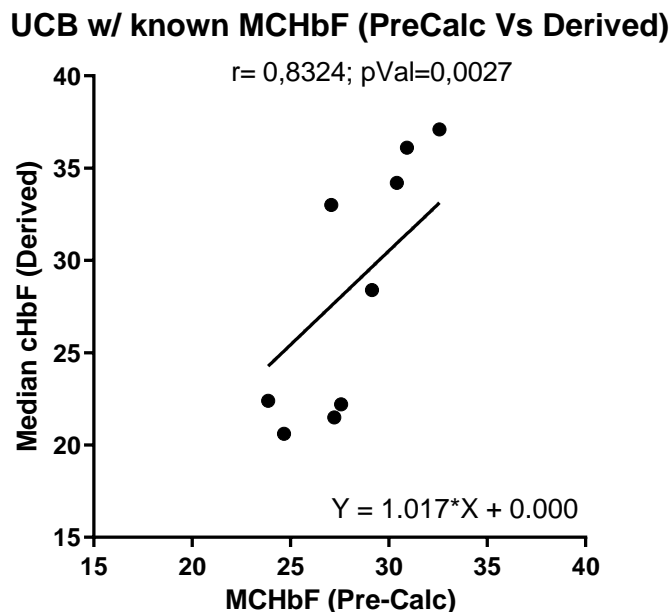
Figura 15. Gráfico representativo da equação de regressão linear derivada das duas populações de RBCs controle contidas no controle interno Spike-In marcado com CFSE ou CTV em diferentes amostras de SCU com MCHbF conhecido.



Para permitir a comparação direta, estão representadas as equações de regressão linear obtidas para ambas as amostras e seus respectivos lotes

Após a obtenção das equações respectivas de regressão linear derivadas para cada amostra testes, aplicamos o nosso método de conversão desenvolvido para obtermos a conversão da intensidade de fluorescência derivada do PE-HbF em conteúdo de HbF (cHbF). A mediana dos valores de cHbF da população de células de cada amostra (obtidos por citometria) foram plotados contra os valores pré-calculados de MCHbF (obtidos das amostras pelo produto entre a % de HbF, obtida por HPLC, e do HCM, obtido pelo analisador hematológico. Como pode ser visualizado na figura 16, obtivemos uma alta linearidade entre nossa quantificação obtida por HPLC e derivada de nosso método ($r=0,8324$; $pVal=0,0027$).

Figura 16. Validação quantitativa do método de citometria, considerando todas as amostras de cordão umbilical.



Os gráficos representam a correlação obtida entre os valores pré-calculados de MCHbF (i.e. produto entre a % de HbF, obtido por HPLC, e o valor de Hemoglobina Corpuscular Média-HCM, obtido pelo analisador hematológico) e os valores de MCHbF derivados pelo método quantitativo de citometria de fluxo com o controle Spike-In (i.e. mediana dos valores de cHbF da população de eritrócitos), considerando todas as amostras (All Samples). Estão indicados os valores de correlação de Pearson (r) e a significância estatística (pVal) correspondente, além da equação de regressão linear (origem em 0 forçada).

Avaliamos ainda, a diferença entre os MCHbF obtidos por ambas as abordagens, pré-calculados com base nos dados de HPLC (%HbF) e do analisador hematológico (MCH) ou derivados pelo método de citometria de fluxo quantitativo utilizando o controle Spike-In, por intermédio do gráfico de Bland-Altman (Figura 17). A diferença média (Viés “Bias”) entre os métodos foi de apenas 0,2233, e o desvio padrão de 4,71.

Figura 17. Gráfico comparativo entre os valores estimados por HPLC e os valores derivados por Spike-In em amostras de cordão umbilical.

Difference vs. average: Bland-Altman of UCB_MCHbF- Recalc
Bias=0,2233; SD=4,71

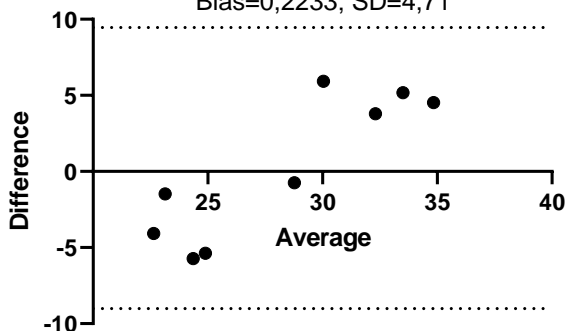


Gráfico gerado pelo software GraphPad Prism, as linhas tracejadas representam o limite de concordância equivalentes a 95%.

Como as amostras de cordão umbilical possuem altos níveis de HbF, portanto um alto MCHbF estimado, questionamos se em amostras de pacientes com níveis variados de HbF, obteríamos a mesma linearidade observada nas amostras de UCB frescas. Para tanto, selecionamos um grupo de 17 pacientes (HbSS) que tiveram o HPLC realizado no mesmo dia da coleta da amostra avaliada, exceto por um paciente (P84) que o dado de HPLC era decorrente de 4 semanas da última visita. Para análise, as mesmas condições de aquisição e gate foram aplicadas (Tabela 4)

As amostras avaliadas com MCHbF estimado por HPLC tiveram alta correlação ($r=0,825$; $pVal<0,0001$) com o MCHbF estimado pelo método de Spike-In (Figura 18). Especialmente, como os pacientes P84 cujo o HPLC havia sido realizada em outra visita; P106 com transfusão recente, e o P104 cujo o diagnóstico eram (*S- β talassemia*) poderiam ser fontes de variáveis, realizamos outra análise de correlação, excluindo estas amostras (Figura 18).

Tabela 4. Dados hematimétricos e de HPLC derivados de diferentes pacientes. A estimativa de %Hemoglobinas foram obtidas pelo equipamento Biorad Variant II e os dados hematimétricos obtidos pelo analisador Sysmex XE-2100.

ID	HPLC (%A2)	HPLC (%A)	HPLC (%S)	HPLC (%F)	MCHbF- PreCalc	RBC ($10^6/ul$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg/RBC)	MCHC (g/dl)
P2	2,7	3,6	70,6	21,4	6,27	3,38	9,9	30	88	29,3	34,2
P7	3,6	0	81,4	15,1	5,39	2,12	7,6	22	106	35,7	34,3
P15	2,9	0	74,5	20,5	6,79	2,92	9,6	29	98	33,1	34,9
P17	3,5	0	82,8	13,9	4,68	2,38	8	26	110	33,7	32,6
P31	1,8	0	82,4	14,1	3,89	2,72	7,5	25	93	27,6	30,5
P54	2,8	0	88,2	9,0	2,81	2,22	6,9	21	95	31,2	32,5
P62	2,1	0	82,5	13,4	5,47	1,93	7,9	25	130	40,8	40,8
P73	2,3	0	77,6	17,8	6,55	2,15	7,9	24	113	36,8	34,3
P75	3,7	0	83,8	10,9	3,90	3,13	11,2	34	109	35,8	34,6
P82	3,2	0	73,9	19	6,88	2,58	9,3	28	109	36,2	34,5
P84	1,5	2	67,7	28	7,95	3,61	10,3	31	86	28,4	35,6
P90	3,7	0	73,9	20,5	8,34	2,06	8,4	25	122	40,7	34,9
P91	2,8	0	73,7	21,6	8,40	2,53	9,8	30	120	38,9	34,3
P95	1,9	2,3	69,1	26,7	9,29	2,93	10,2	31	107	34,8	32,1
P103	4,5	8	77,7	9,9	2,36	4,56	10,8	35	77	23,8	33,6
P104	2,54	8,6	84,1	4,2	1,38	2,13	7	21	98	32,8	34,4
P105	2,8	1,9	71,6	23,8	8,59	3,37	12,2	38	111	36,1	35,1
P106	2,9	19,2	67,7	8,8	2,38	3,23	8,7	28	86	27,1	33,2

Os dados foram coletados por meio de análise de prontuários. MCHbF Pre Calc foi derivado da %HbF estimada por $HPLC * MCH$ derivado do contador hematológico/ 100. RBC= *Red Blood Cells*, Hb=Hemoglobina; Ht= Hematócrito.

Figura 18. Gráfico representativo de correlação obtida em decorrência da quantificação de Hemoglobina Fetal obtida pelo método de Spike em comparação com a quantificação estimada por HPLC em amostras de diferentes pacientes.

MCHbF Patients(Pre-calc Vs Derived) HPLC Recalc

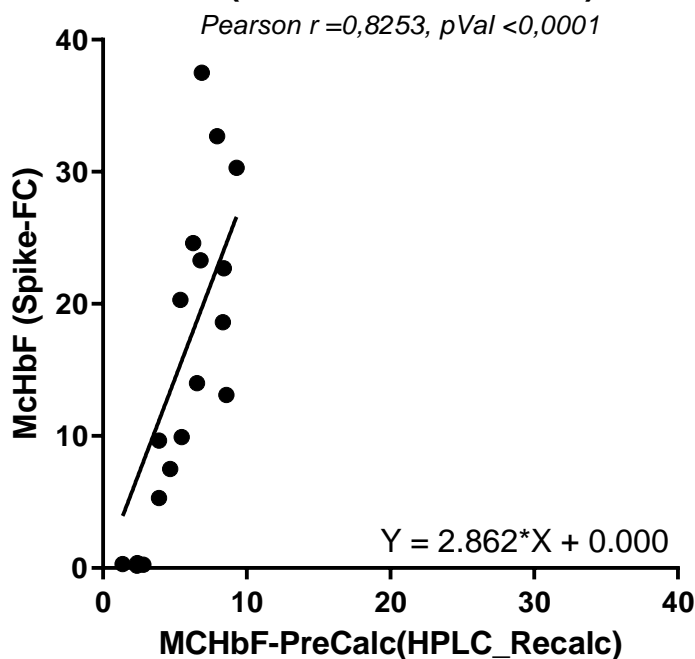
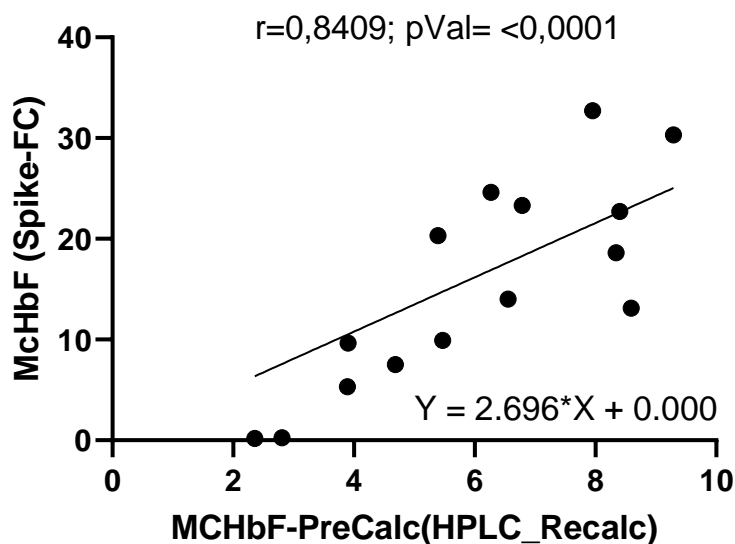


Figura 19. Gráfico representativo de correlação obtida em decorrência da quantificação de Hemoglobina Fetal obtida pelo método de Spike em comparação com exclusão dos pacientes P82, P104, P106.

MCHbF Patients_HPLC Recalc_Excluded patients



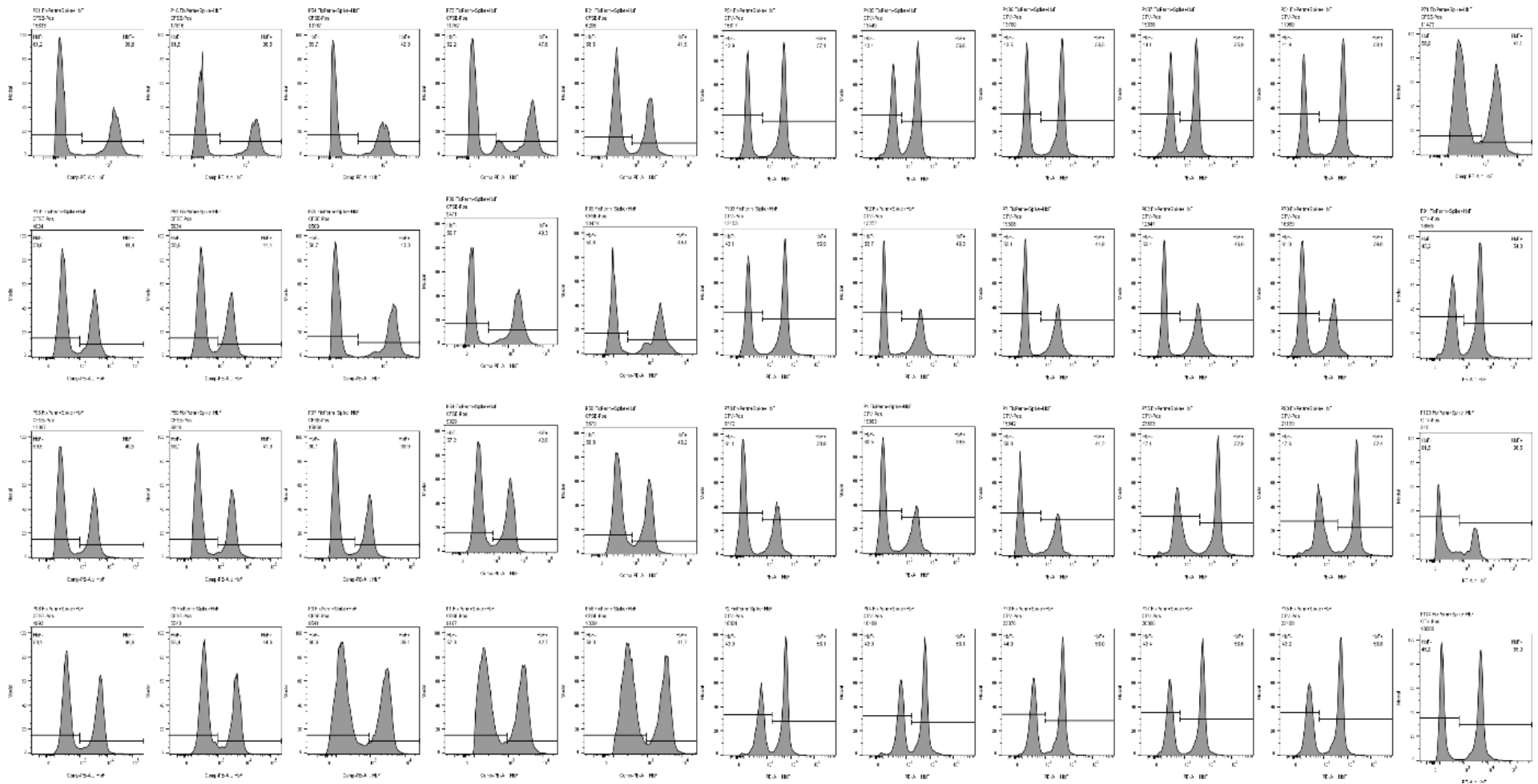
A correlação de ($r=0,825$; $pVal < 0,0001$) para a análise com todos os pacientes incluídos, passou para ($r=0,8409$; $pVal < 0,0001$) com os três pacientes excluídos, respectivamente. Embora a correlação tenha diferido, esta diferença não foi considerável

tendo em vista a baixa porcentagem de hemoglobina normal identificada nestes pacientes (entre 8-19% de HbA).

5.3 Avaliação em Pacientes

Tendo em vista o sucesso na produção e aplicação do controle Spike-In, selecionamos um conjunto de 43 amostras de 32 pacientes com diagnóstico de Anemia Falciforme, em uso corrente ou não de Hidroxiuréia, sem transfusões recentes, para aplicarmos o método desenvolvido (Tabela 5). Tendo em vista que a limitação da disponibilidade de anticorpo da 1ª condição experimental só ocorre em amostras com mais de 50% de RBCs de UCB contendo quase que exclusivamente HbF (i.e. equivalendo a mais de 50% de HbF total), decidimos avaliar as amostras utilizando as condições da 1ª condição experimental, uma vez que os pacientes dificilmente teriam uma quantidade de HbF total superior a 50%. Isto permitiu uma economia de anticorpos (uso de apenas 2µL ao invés de 5µL), sem prejudicar a separação entre as populações HbF+ e HbF- do controle Spike-In CFSE+, como pode ser verificado na figura 20 a seguir.

Figura 20. Padrão de marcação do anti-HbF-PE mostrando a separação entre as populações HbF+ e HbF- do controle Spike-In CFSE+ ou CTV+ contido nas amostras analisadas dos pacientes.



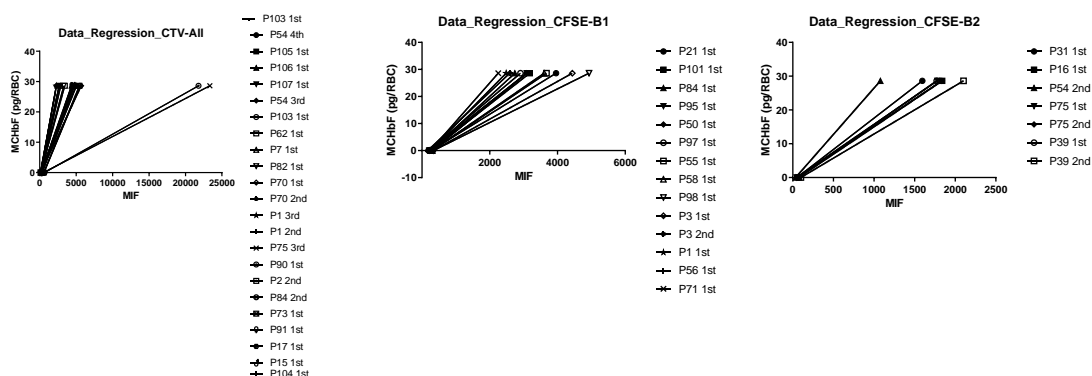
ID	Collection Order	RBC (10 ⁶ /ul)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg/RB)	MCHC (g/dl)	RDW	Eryt (10 ³ /ul)	WB (10 ³ /ul)	Ret %	Ret Abs (10 ³ /ul)	CHr (pg/Ret)	IRF (%)	(%A2)	(%A)	(%S)	(%F)
P1	1st	2,74	8,3	25	93	30,5	31,9	22,6	3,9	11,3	24,02	657,6	30,5	43,5	N.D	N.D	N.D	N.D
P1	2nd	2,54	7,2	23	90	28,3	33,4	23,9	1,5	13,4	20,2	515,4	31,9	47,8	N.D	N.D	N.D	N.D
P1	3rd	2,45	6,4	22	89	26,3	31,7	23,4	1,6	18,1	28,33	694,7	28,1	68,5	N.D	N.D	N.D	N.D
P2	1st	3,38	9,9	30	88	29,3	34,2	19,8	2,8	5,5	5,99	202,6	33,9	31,2	2,7	3,6	70,6	21,4
P3	1st	2,4	6,7	23	96	28	30,3	25,5	3	18,4	46,17	1108	30,7	56,8	N.D	N.D	N.D	N.D
P3	2nd	2,3	6,4	23	99	27,7	29,1	28,7	6,7	10,7	23	528,7	31,6	79,3	N.D	N.D	N.D	N.D
P7	1st	2,12	7,6	22	106	35,7	34,3	19,1	2,6	8,7	19,14	405,1	37,8	46,4	3,6	0	81,4	15,1
P15	1st	2,92	9,6	29	98	33,1	34,9	16,5	1,6	13,3	14,85	433,1	33,7	37,2	2,9	0	74,5	20,5
P16	1st	3,04	8,7	28	93	28,6	32,5	18,7	0	12,3	12	364,9	31,7	64,8	N.D	N.D	N.D	N.D
P17	1st	2,38	8	26	110	33,7	32,6	20,7	8,2	10,2	13,34	317,4	37,7	53,2	3,5	0	82,8	13,9
P21	1st	3,24	10,9	33	102	33,8	32,8	16,9	4,5	5	3,45	111,8	35,6	36,8	N.D	N.D	N.D	N.D
P31	1st	2,72	7,5	25	93	27,6	30,5	28,4	20,3	15,5	24,79	674,4	31,1	75,5	1,8	0	82,4	14,1
P39	1st	2,01	8,1	26	129	40,2	31,9	22,7	76,6	3,7	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
P39	2nd	1,84	7,4	24	130	40,5	30,6	23	147,6	4,2	9,6	176,4	39,9	69,4	N.D	N.D	N.D	N.D
P50	1st	2,16	8,4	26	118	39,1	31,6	20	0	12,2	38,45	830,8	36,3	69,9	N.D	N.D	N.D	N.D
P54	1st	2,21	6,2	21	96	28,1	29	26,9	2,4	7,4	20,84	461,2	30,8	68,2	N.D	N.D	N.D	N.D
P54	2nd	2,46	7,3	24	96	29,5	31,5	25,2	3	9	25,04	617,3	32,2	47,3	N.D	N.D	N.D	N.D
P54	3rd	2,5	7,6	24	96	30,6	32,1	23,4	2,1	11,7	23,21	579,4	35,5	51,5	N.D	N.D	N.D	N.D
P54	4th	2,22	6,9	21	95	31,2	32,5	23,5	7,4	12,3	26,98	600,1	33,4	47	2,8	0	88,2	9
P56	1st	2,64	8,2	28	104	31,2	31,9	17,5	1,9	13,3	15,55	410,2	33	48,7	N.D	N.D	N.D	N.D
P58	1st	1,9	7,2	22	118	37,9	32,3	22	9,6	7,8	4,58	86,9	40,3	43,6	N.D	N.D	N.D	N.D
P62	1st	1,93	7,9	25	130	40,8	40,8	33,5	16,9	4,9	19,37	374,1	41,6	56	2,1	0	82,5	13,4
P70	1st	1,81	7,7	24	133	42,6	32,4	17,4	17	3,7	5,66	102,3	41,7	27,4	N.D	N.D	N.D	N.D
P70	2nd	1,41	6,3	19	131	44,6	32,7	17,2	19,1	3,7	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
P71	1st	2,74	7,6	26	96	27,7	31,2	17,7	2,3	6,6	8,87	243	28,2	50	N.D	N.D	N.D	N.D
P73	1st	2,15	7,9	24	113	36,8	34,3	16,3	2,5	8,2	25,22	541,9	38,1	51,3	2,3	0	77,6	17,8
P75	1st	3,16	10,1	33	105	31,9	31,6	22,8	204,9	14,9	10,3	325,7	34,4	76,5	N.D	N.D	N.D	N.D
P75	2nd	3,01	10,9	33	110	36,3	32,1	20,9	6,9	11,3	20,79	625,4	34,9	44,4	N.D	N.D	N.D	N.D
P75	3rd	3,13	11,2	34	109	35,8	34,6	20,2	6,6	11,3	23,35	730,3	37,2	49,5	3,7	0	83,8	10,9
P82	1st	2,58	9,3	28	109	36,2	34,5	19,4	2,5	9,9	19,45	502	36,1	38	3,2	0	73,9	19
P84	1st	3,82	10,6	31	82	27,9	34,6	15,4	0	13	9,2	4,57	174,6	30,3	N.D	N.D	N.D	N.D
P84	2nd	3,61	10,3	31	86	28,4	35,6	15,5	0	5,7	7,92	286,1	31,9	27,2	1,5	2	67,7	28
P90	1st	2,06	8,4	25	122	40,7	34,9	19	7,4	5,1	10,21	210,3	43	33,2	3,7	0	73,9	20,5
P91	1st	2,53	9,8	30	120	38,9	34,3	16,5	16,2	5,2	16,56	418,4	40,1	50,2	2,8	0	73,7	21,6

P95	1st	2,93	10,2	31	107	34,8	32,1	15,2	2	8,4	7,91	231,9	32,7	54	19	2,3	69,1	26,7
P97	1st	2,39	8,6	27	112	35,9	31,7	18,1	14,7	4,9	10,54	251,9	36,3	42,3	N.D	N.D	N.D	N.D
P98	1st	1,85	7,9	25	135	42,9	32,1	18,7	15,4	4,7	5,11	94,3	41,3	35,1	N.D	N.D	N.D	N.D
P101	1st	2,85	9	28	100	31,5	32,6	17,2	3,5	10,2	28,58	814,2	32,1	45,3	N.D	N.D	N.D	N.D
P103	1st	4,56	10,8	35	77	23,8	33,6	20,7	9,7	16,4	13,28	605,2	27	36,1	4,5	8	77,7	9,9
P104	1st	2,13	7	21	98	32,8	34,4	24,9	8,8	9,6	N.D	N.D	N.D	N.D	2,54	8,6	84,1	4,2
P105	1st	3,37	12,2	38	111	36,1	35,1	16,8	4,8	7,7	19,07	642,2	37,8	34,7	2,8	1,9	71,6	23,8
P106	1st	3,23	8,7	28	86	27,1	33,2	18,6	1,5	18,3	22,82	737,5	30	52,8	2,9	19,2	67,7	8,8
P107	1st	1,63	6,1	21	128	37,7	31,8	19,7	13,2	5,6	3,9	63,4	41,9	46,1	N.D	N.D	N.D	N.D

Tabela 5. Dados hematimétricos obtidos dos respectivos pacientes. Contagens e parâmetros obtidos pelo equipamento Sysmex XE-5000.RBC, Contagem de Eritrócitos; Hb, Hemoglobina; Ht, Hematócrito, MCV, Mean Corpuscular Volume; MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; RDW-CV, Red cell Distribution Width expressa como coeficiente de variação; Eryt., Eritroblastos; Leu., Leucócitos; Ret.(%), Porcentagem de Reticulócitos; Ret.(Abs), Contagem de Reticulócitos; RHC, Reticulocyte Hemoglobin Content; IRF, Immature Reticulocyte Fraction. Collection Order: Ordem de coleta em diferentes visitas sucessivas.; N. Não disponível. A fração de hemoglobinas (%A2); (%A); (%S); (%F) foram estimadas por HPLC.

Em seguida, aplicamos o nosso método quantitativo, de forma a permitir uma análise mais aprofundada do padrão de distribuição do conteúdo de HbF corpuscular por RBC. Utilizando a mesma estratégia de gates e de análises descrita anteriormente, obtivemos (para cada tubo contendo a amostra do paciente e o controle interno Spike-In) os valores de MIF para as populações controle HbF^{Pos} (UCB RBCs) e HbF^{Neg} (Adult RBCs) das RBCs CFSE+ ou CTV+do controle Spike-In. Este valores foram usados para derivar as equações de regressão linear, específicas para cada amostra analisada (Figura 21). Devido ao grande número de testes realizados, novos lotes de Spike-In foram testados, especialmente estes lotes foram caracterizados por citometria, antes do uso, uma análise sequencial de uma paciente, utilizando diferentes lotes de Spike-In, pode ser observado na figura suplementar 16.

Figura 21. Gráfico das equações de regressão linear derivadas do controle interno de diferentes lotes de Spike-In (CTV ou CFSE) presentes em cada uma das amostras dos pacientes



Para cada amostra, os valores de MIF (comp-HbF-PE) obtidos para as populações HbF+ e HbF-, contidas nos controles internos Spike-In marcados com CFSE/CTV, foram utilizados juntamente com os respectivos valores conhecidos de MCHbF (23,4pg/RBC e 0pg/RBC, respectivamente), para obtenção das equações de regressão linear.

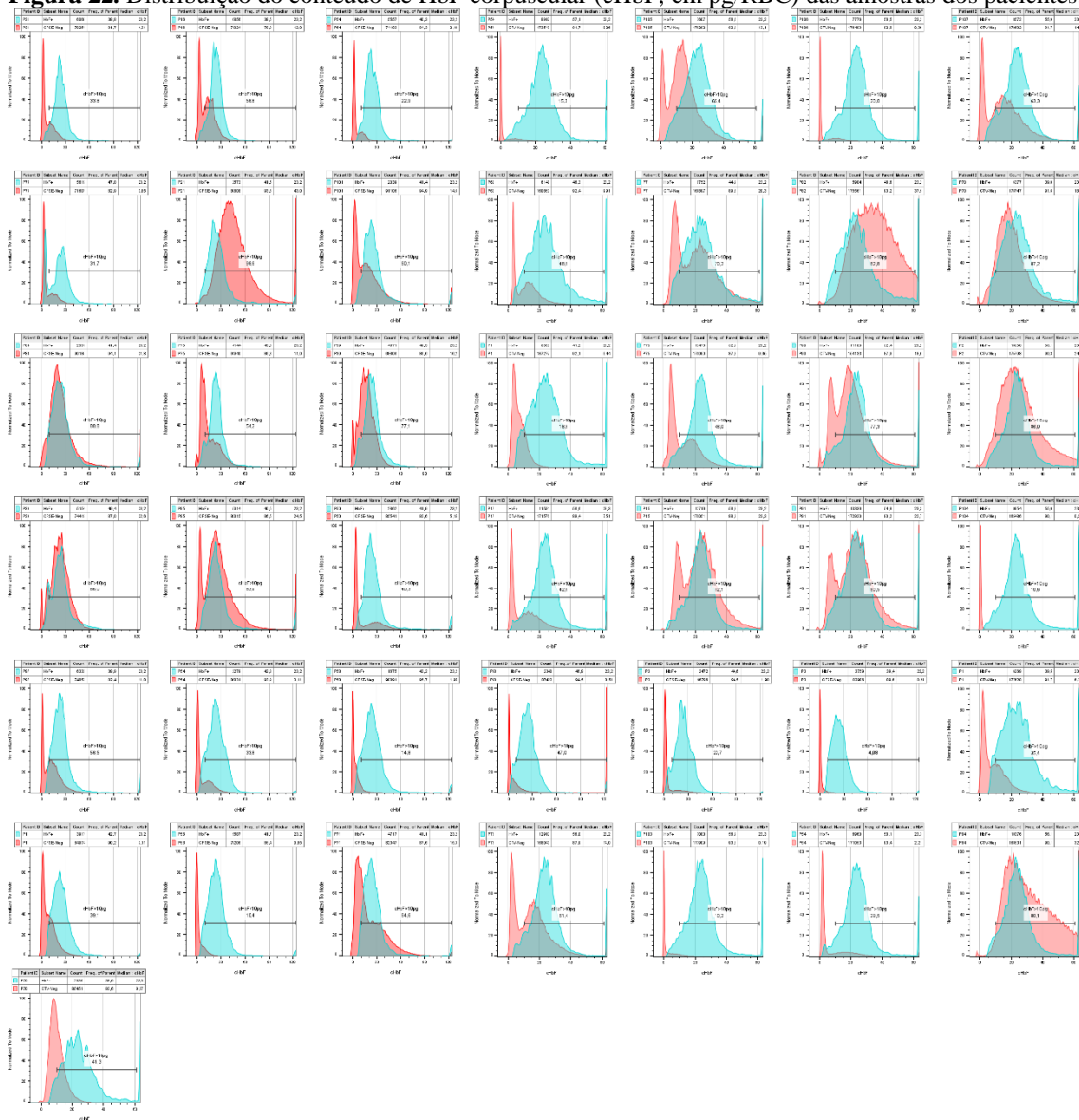
Tabela 6. Equações de regressão linear derivadas dos controles Spike-In em amostras de diferentes.

Test Sample	MIF HbF- (X-Intercept)	MIF HbF+	Equation Y=Slope*X-(Y-intercept) Y = cHbF X=RBC (anti-HbF-PE Fluor Int.)	Spike Batch
P54 4th	167	4493	Y = 0,005365*X - 0,8960	CTV
P105 1st	306	2630	Y = 0,009987*X - 3,056	CTV
P106 1st	182	4363	Y = 0,005551*X - 1,010	CTV
P107 1st	281	2721	Y = 0,009512*X - 2,673	CTV
P54 3rd	158	5701	Y = 0,004187*X - 0,6616	CTV
P103 1st	178	4986	Y = 0,004827*X - 0,8593	CTV
P62 1st	120	3446	Y = 0,006978*X - 0,8374	CTV
P7 1st	153	2897	Y = 0,008458*X - 1,294	CTV
P82 1st	151	3304	Y = 0,007361*X - 1,112	CTV
P70 1st	129	2291	Y = 0,01074*X - 1,385	CTV
P70 2nd	97,2	2321	Y = 0,01044*X - 1,014	CTV
P1 3rd	107	2285	Y = 0,01066*X - 1,140	CTV
P1 2nd	77,4	2771	Y = 0,008617*X - 0,6669	CTV
P75 3rd	536	23335	Y = 0,001018*X - 0,5457	CTV
P90 1st	657	21788	Y = 0,001098*X - 0,7216	CTV
P2 2nd	549	5447	Y = 0,004739*X - 2,602	CTV
P84 2nd	592	5535	Y = 0,004696*X - 2,780	CTV
P73 1st	336	4702	Y = 0,005316*X - 1,786	CTV
P17 1st	265	5054	Y = 0,004847*X - 1,284	CTV
P15 1st	272	4590	Y = 0,005375*X - 1,462	CTV
P91 1st	359	4398	Y = 0,005746*X - 2,063	CTV
P103 1st	102	2692	Y = 0,008961*X - 0,9141	CTV
P104 1st	134	4778	Y = 0,004998*X - 0,6697	CTV
P21 1st	268	3957	Y = 0,006292*X - 1,686	CFSE-B1
P101 1st	253	3182	Y = 0,007924*X - 2,005	CFSE-B1
P84 1st	263	2743	Y = 0,009359*X - 2,461	CFSE-B1
P95 1st	214	3093	Y = 0,008062*X - 1,725	CFSE-B1
P50 1st	204	3086	Y = 0,008053*X - 1,643	CFSE-B1
P97 1st	197	2909	Y = 0,008558*X - 1,686	CFSE-B1
P55 1st	299	3676	Y = 0,006873*X - 2,055	CFSE-B1
P58 1st	298	3607	Y = 0,007014*X - 2,090	CFSE-B1
P98 1st	337	4930	Y = 0,005053*X - 1,703	CFSE-B1
P3 1st	334	4437	Y = 0,005657*X - 1,889	CFSE-B1
P3 2nd	170	2590	Y = 0,009591*X - 1,630	CFSE-B1
P1 1st	238	2485	Y = 0,01033*X - 2,458	CFSE-B1
P56 1st	310	3090	Y = 0,008349*X - 2,588	CFSE-B1
P71 1st	248	2250	Y = 0,01159*X - 2,875	CFSE-B1
P31 1st	52,9	1595	Y = 0,01505*X - 0,7962	CFSE-B2
P16 1st	74,7	1840	Y = 0,01315*X - 0,9821	CFSE-B2
P54 2nd	36,1	1079	Y = 0,02226*X - 0,8034	CFSE-B2
P75 1st	47,1	1780	Y = 0,01339*X - 0,6308	CFSE-B2
P75 2nd	52,7	1835	Y = 0,01302*X - 0,6863	CFSE-B2
P39 1st	70	1771	Y = 0,01364*X - 0,9551	CFSE-B2
P39 2nd	98,7	2102	Y = 0,01159*X - 1,144	CFSE-B2

Para cada tubo contendo a amostra do paciente e o controle Spike-In, os valores de MIF obtidos para as populações controle HbFPos e HbFNeg foram usados, juntamente com os valores MCHbF correspondentes (23,40 pg/RBC e 0pg/RBC, respectivamente), para derivar equações de regressão linear específicas (utilizando o software GraphPad Prism). Estas equações foram usadas para converter os valores de intensidade de fluorescência do anti-HbF-PE (comp-PE-A) de cada célula em um conteúdo absoluto de HbF estimado (cHbF), em pg/RBC. Nas equações, Y corresponde ao cHbF a ser calculado e X corresponde à intensidade de fluorescência do anti-HbF (comp-PE-A).

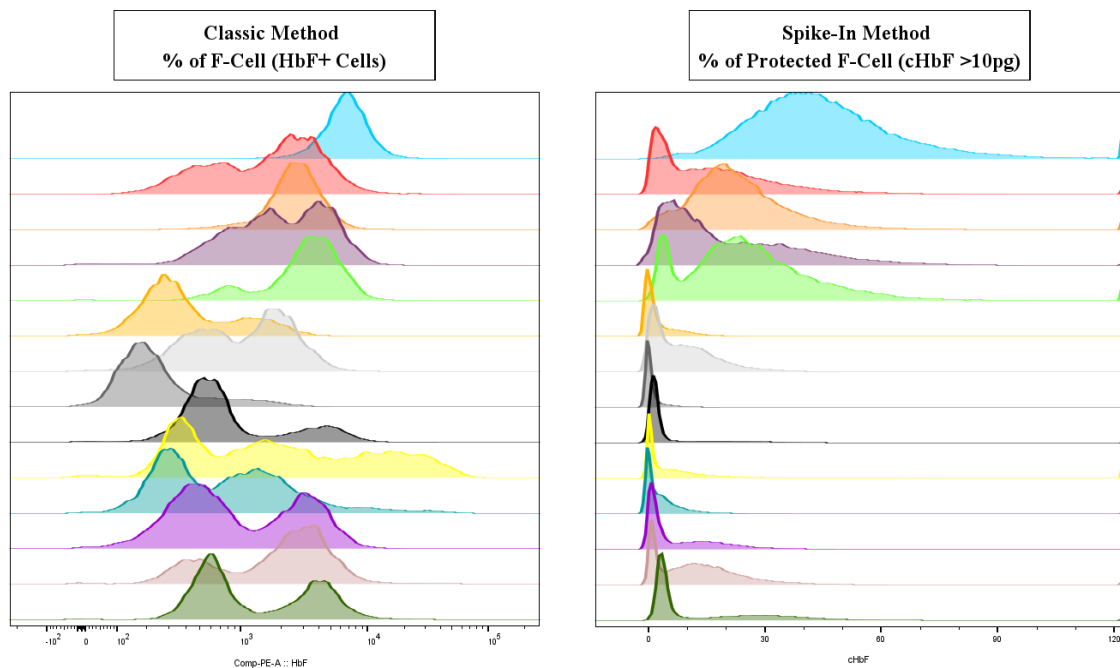
Utilizando as equações obtidas especificamente para cada paciente, os valores de intensidade de fluorescência (PE-A) de cada RBC do paciente (bem como do próprio Spike-In) foram convertidos em um valor correspondente ao conteúdo corpuscular absoluto estimado de HbF (cHbF, em pg/RBC), usando a ferramenta “Derive Parameters” do próprio software FlowJo. Isso permitiu que as populações de RBC fossem avaliadas quanto à distribuição dos conteúdos absolutos de HbF (em pg) por RBC. (Figura 22). Claramente, o método desenvolvido por Spike-In permite uma estratificação do conteúdo de HbF muito mais robusta entre os pacientes avaliados, como pode ser visualizado na figura 23.

Figura 22. Distribuição do conteúdo de HbF corpuscular (cHbF, em pg/RBC) das amostras dos pacientes.



As tabelas mostram as estatísticas (mediana) derivada das populações HbF+ das populações CFSE/CTV-Pos dos controles internos Spike-In (histogramas em azul), bem como das populações CFSE/CTV-Neg das amostras dos pacientes (histogramas em vermelho). Os gates sobre os histogramas mostram as porcentagens de RBCs com conteúdo de cHbF acima de >10pg.

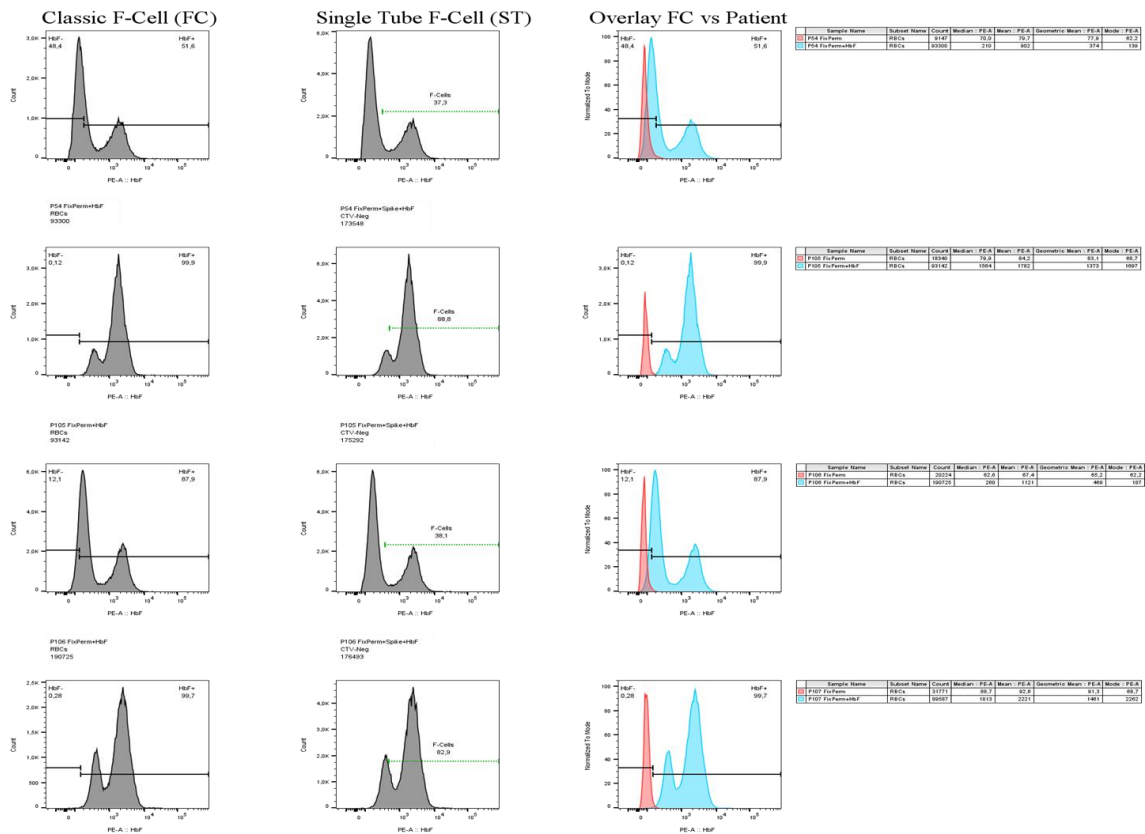
Figura 23. Comparação da distribuição da fluorescência e dos valores de cHbF derivados nas amostras dos pacientes.



Foram comparadas as distribuições originais da intensidade de fluorescência (à esquerda), e as distribuições obtidas após a conversão em cHbF pelo método de Spike-In.

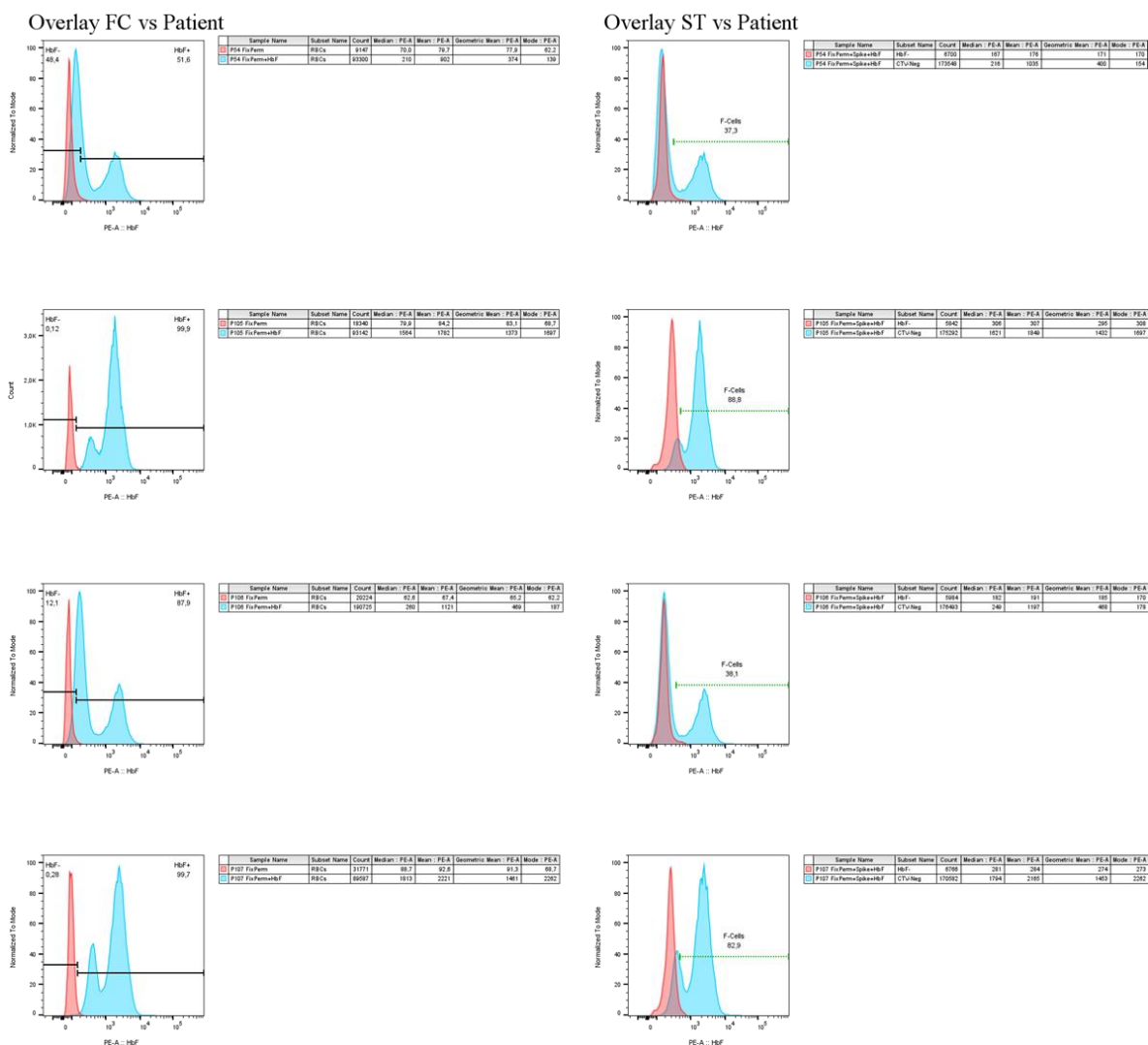
Com o objetivo de compararmos o nosso novo método quantitativo com o método clássico de determinação da porcentagem de F-cells, 30 das 43 amostras avaliadas, foram avaliadas pelo método clássico. Tradicionalmente, para estimativa de F-Cells normalmente, um controle de células negativas (i.e células do paciente, submetidas aos mesmos procedimentos, entretanto, não marcadas com anti HbF) são consideradas para definir gates e separar populações de F-Cells. Entretanto, por este método há uma superestimativa das F-Cells, já que na maior parte dos casos, a população de F-cells é igual ou >90. Isso pode ocorrer devido a marcação com anti-HbF marcar de forma inespecífica células sem HbF, causando um deslocamento no eixo X(HbF-PE). Pensando nesta limitação de segregação de populações e da requisição de um tubo extra para controle negativo, consideramos a própria população (RBC HbF -) presente no controle Spike-In para separar e definir gates. As células RBC (HbF-) contidas no controle, são sabidamente negativas, portanto, qualquer marcação inespecífica ou diferença de intensidade de Background resultaria em uma estimativa mais fidedigna a população de F-cells dos pacientes, estratificando melhor a distribuição de HbF (Figura 24 e 25).

Figura 24. Determinação gates a partir do método clássico de F-Cell e derivada dos RBC HbF - do método de Spike-In (F-Cell Single Tube).



A definição de RBC HbF(-) pelo método classico (FC) envolve a abrangência de 98% das células não marcadas, determinados com base nos respectivos tubos controles, foram aplicados às respectivas amostras marcadas com o anti-HbF-PE, permitindo a determinação das porcentagens de F-cells, enquanto a determinação pelo método de Single Tube (ST) considera a célula negativa presente no próprio controle Spike-In.

Figura 25. Comparativo entre os gates definidos pelo método clássico de F-Cell e derivada dos RBC HbF - do método de Spike-In (F-Cell Single Tube)



Claramente, a determinação de F-cells derivada do próprio Spike separou melhor as populações celulares, especialmente para amostras com populações intermediárias de HbF. Dito, geramos para cada paciente as equações de regressão linear que permitiram a conversão de MIF(HbF:PE) para cHbF. Portanto, realizamos um gate capaz de abranger eritrócitos com conteúdo de HbF >10 pg, como descrito na literatura e considerado cutoff com efeito protetor. Comparamos os três métodos de F-Cell Classico, F-Cell Spike-In, e cHbF (Figura 25)

Figura 26. Comparação entre os métodos clássicos de estimativa de F-Cell com o método desenvolvido por Spike-In.

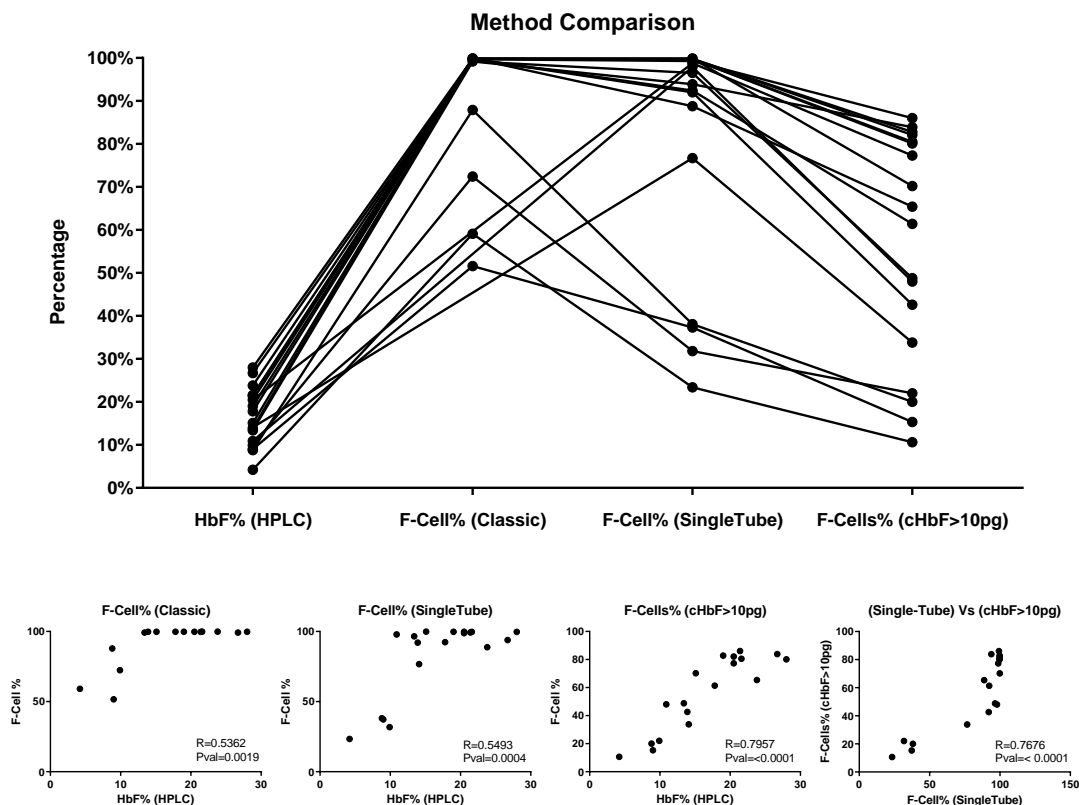
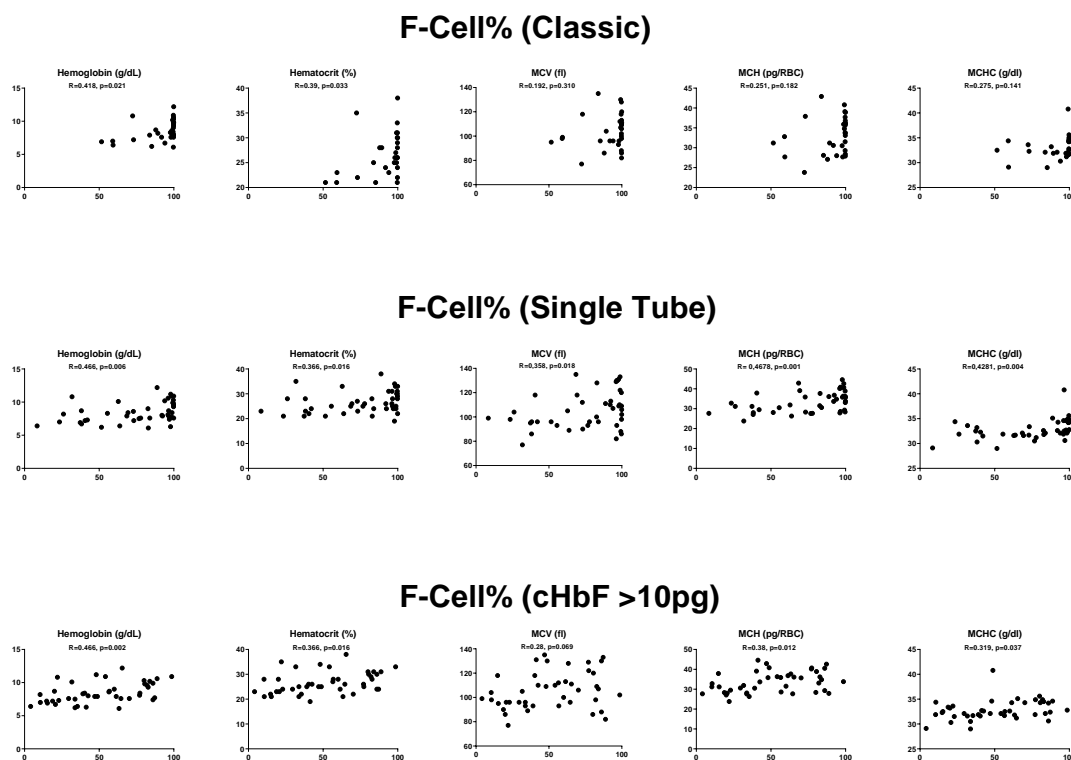


Figura descritiva na parte superior comparando a % de F-Cell Clássica, F-Cell estimada por Single Tube, Porcentagem de F-cells utilizando o método de Spike-In com cutoff de >10 pg, e % de HbF estimada por HPLC. Na parte inferior, correlações obtidas comparando diferentes os métodos relacionados.

Claramente, na maior parte dos casos estimados pelo método clássico, a porcentagem de F-Cells situou-se entre 100%, em apenas 04 casos com porcentagens de F-Cells variadas, enquanto a determinação de F-Cell derivada pelo método Spike -In (Single Tube) e F-Cells (cHbF >10pg) estratificou melhor as % de F-Cells, quando comparados ao método de estimativa por HPLC. Para poder comparar os três métodos aqui, apresentados, realizamos uma análise de correlação com os dados hematimétricos obtidos de 12 pacientes que tiveram os níveis de F-cell avaliados por diferentes métodos, aqui abordados. (Figura 27)

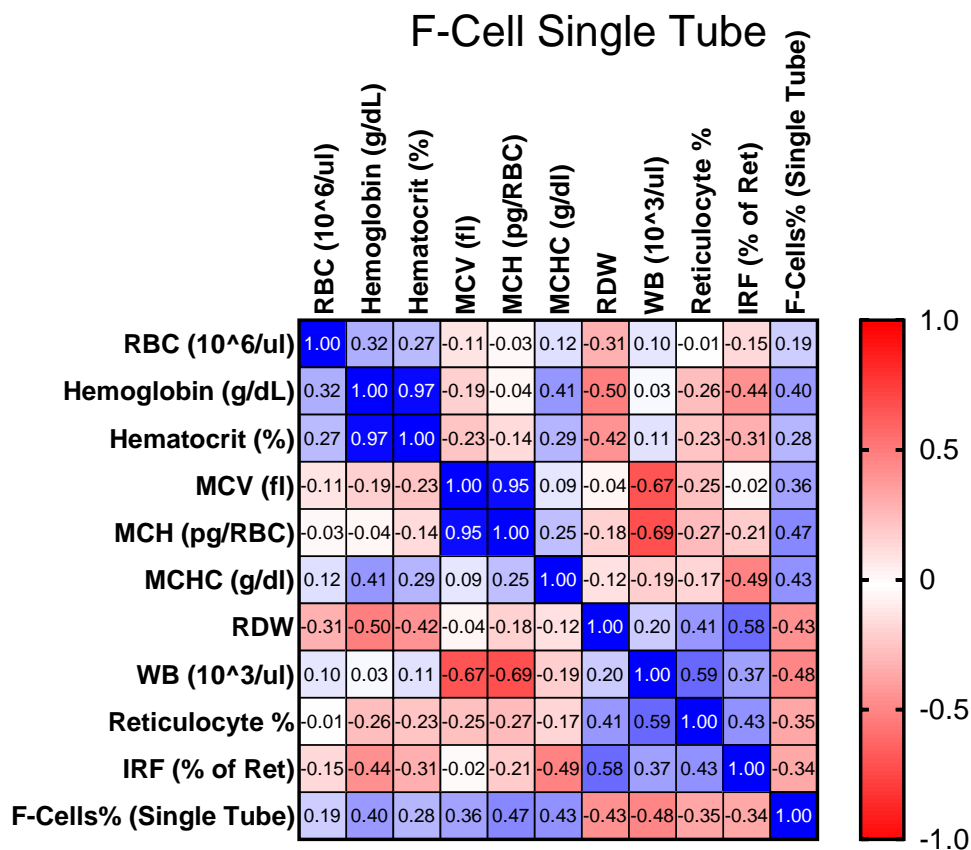
Figura 27. Gráfico representativo das Análises de correlações positivas obtidas entre os métodos quantitativos de % F-Cell Clássico, F-Cell Single Tube, F-Cell >10pg com dados hematimétricos.



A figura apresenta os gráficos e os valores de correlação de Pearson (R) e os valores de significância estatística (pVal) correspondentes (obtidos utilizando o software GraphPad Prism).

Os métodos de %F-Cell Single Tube obtiveram um valor de P muito mais significativo com os parametros Hemoglobina (R=0,2844; Pvalue: 0,0064); VCM (R=0,3581; Pvalue: 0,0184); HCM (R=0,4678; Pvalue: 0,0016); CHCM (R=0,4281; Pvalue: 0,0042), enquanto as correlações negativas foram RDW (R= -0,4349; Pvalue: 0,0036); Leucócitos (R=-0,4765; Pvalue: 0,0012), Reticulócitos % (R=-0,3504, Pvalue; 0,0266), IRF(R=-0,3429, Pvalue: 0,0303), como pode ser visualizado na figura 28.

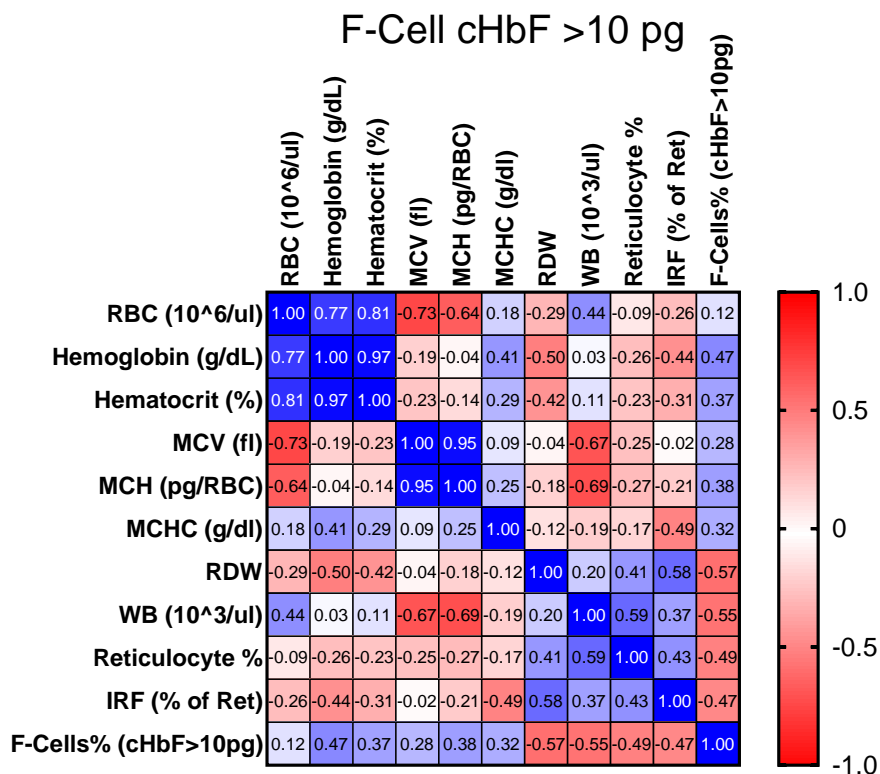
Figura 28. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo Single Tube.



As correlações estão coloridas com tons em diferentes intensidades para destacar as maiores correlações, tanto positivas (em azul) como negativas (em vermelho). As correlações estatisticamente significativas (two-tailed, correlação de Pearson) estão destacadas com caixas em negrito. Análise realizada utilizando o software GraphPad Prism.

Da mesma maneira, os valores de correlação obtidos para o método Spike cHbF>10pg considerando Hemoglobina(R=0,466; Pvalue: 0,0016); Hematócrito (R=0,366; Pvalue: 0,0156); HCM (R=0,3803; Pvalue: 0,0119); CHCM(R=0,3185; Pvalue: 0,0374) e com correlações negativas para IRF (R=-0,470; Pvalue: 0,002); Reticulócito% (R=-0,494; Pvalue: 0,0012); Leucócitos (r=-0,549 ;Pvalue: 0,001); RDW (R=-0,5682; Pvalue: 0,001). (Figura 29)

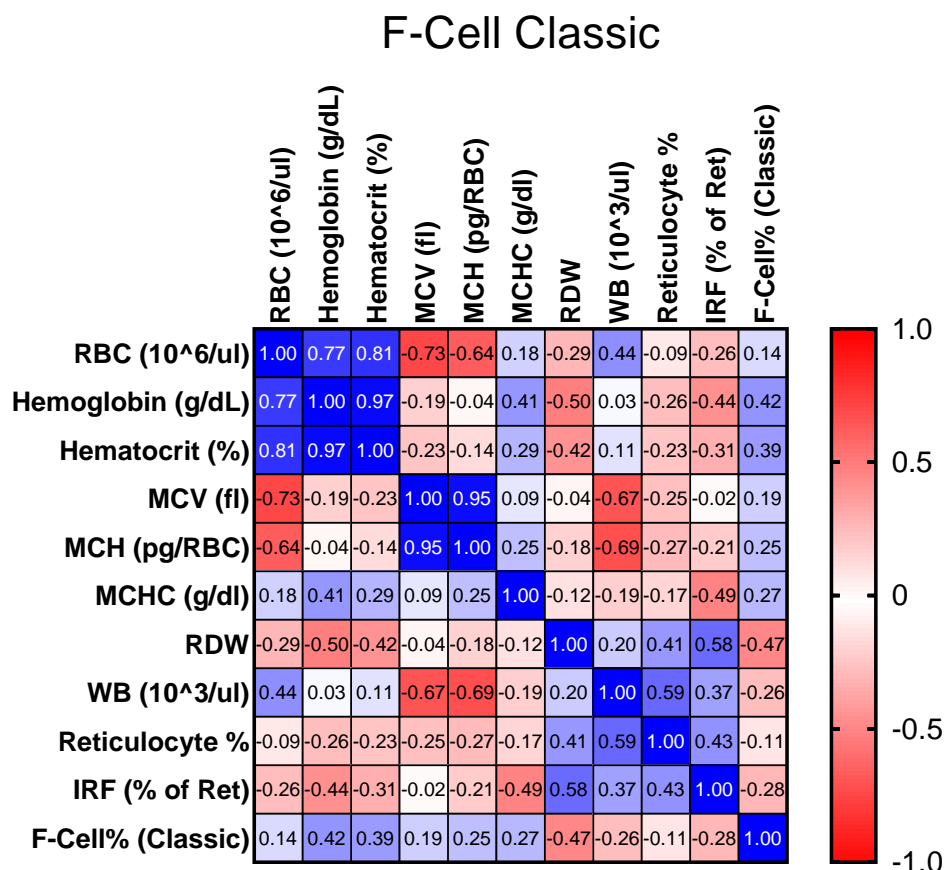
Figura 29. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo F-Cell >10 pg.



As correlações estão coloridas com tons em diferentes intensidades para destacar as maiores correlações, tanto positivas (em azul) como negativas (em Vermelho). Análise realizada utilizando o software GraphPad Prism, two-tailed, correlação de Pearson.

Quando comparado as correlações obtidas utilizando o método clássico de F-Cell Clássico que obtiveram correlações significativas para Hemoglobina (R=0,418;Pvalue: 0,021); Hematócrito (R= 0,389; Pvalue: 0,033), CHCM (R=0,275; Pvalue:0,141), enquanto apresentou correlação negativa para RDW (R=-0,472; Pvalue: 0,009), respectivamente. Como pode ser observado na Figura 30

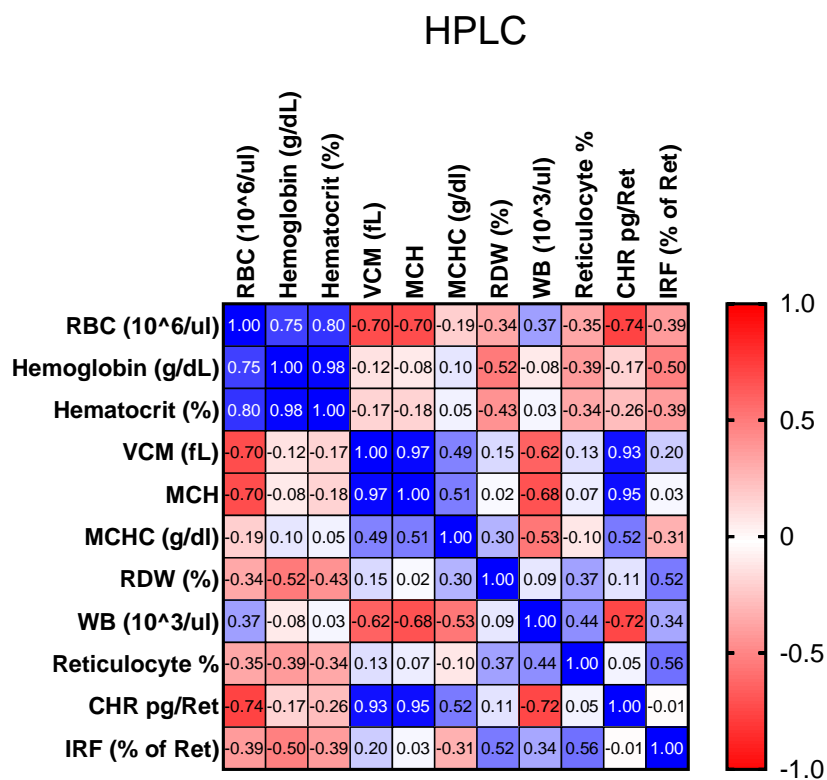
Figura 30. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo F-Cell Classic.



As correlações estão coloridas com tons em diferentes intensidades para destacar as maiores correlações, tanto positivas (em azul) como negativas (em Vermelho). Análise realizada utilizando o software GraphPad Prism, two-tailed, correlação de Pearson.

Dado que o HPLC é o principal método para estimativa de F-Cell, comparamos os dados hematimétricos dos pacientes e os dados obtidos pela estimativa de HbF (%) por HPLC. Os valores de correlação positiva e significativamente estatística foram obtidos somente para os parâmetros de Hemoglobina ($R=0,5129$; $Pvalue=0,0295$), enquanto, correlações negativas foram referentes ao RDW ($R=-0,5820$; $Pvalue=0,0113$), Reticulócitos ($R=-0,6455$; $Pvalue=0,0051$). Isso reflete que o método de Spike-In desenvolvido aqui, tem melhores correlação com métodos clínicos laboratoriais do que o método clássico de F cell, e HPLC (Figura 31).

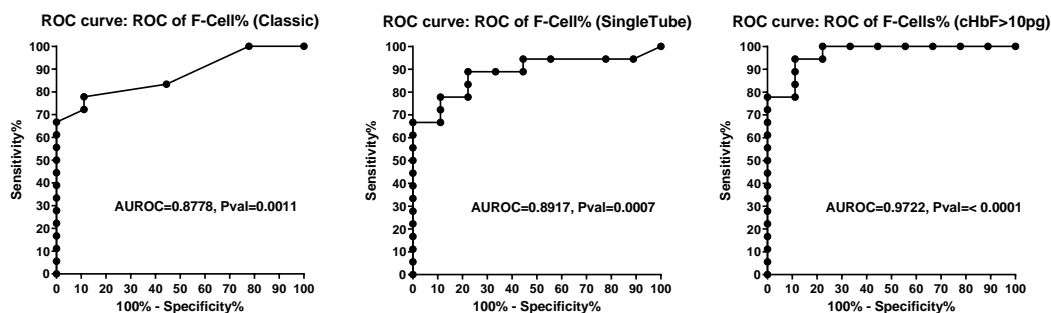
Figura 31. Matrix apresentando os valores de R derivados da análise de correlação envolvendo quantificação de HbF por HPLC.



As correlações estão coloridas com tons em diferentes intensidades para destacar as maiores correlações, tanto positivas (em azul) como negativas (em Vermelho). Análise realizada utilizando o software GraphPad Prism, two-tailed, correlação de Pearson.

Performamos uma análise de curva ROC para avaliarmos a sensibilidade e especificidade do método de Spike-In (i.e, RBC>10pg), F-Cell Clássico, e F-Cell Single tube, em estratificar pacientes com níveis de hemoglobina >9 g/dL e aqueles abaixo de <9 g/dL (Figura 32).

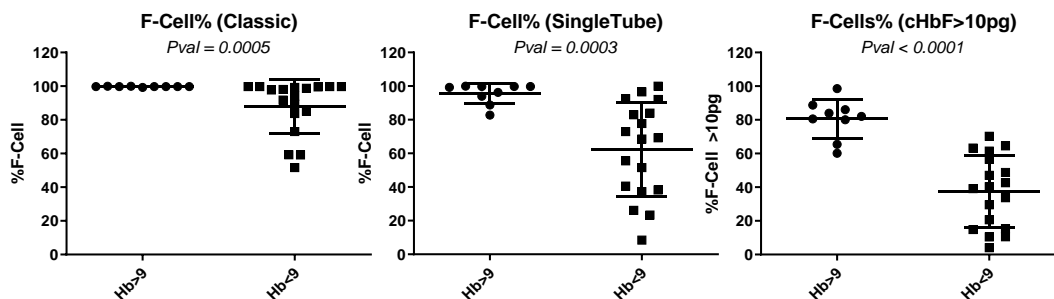
Figura 32. Análise de especificidade e sensibilidade comparativa entre os métodos F-Cell Classico, F-Cell Single Tube, e F-Cell cHbF>10 pg em pacientes com Hemoglobina >9 e <9 respectivamente.



Os dados foram plotados e analisados pelo software GraphPad Prism.

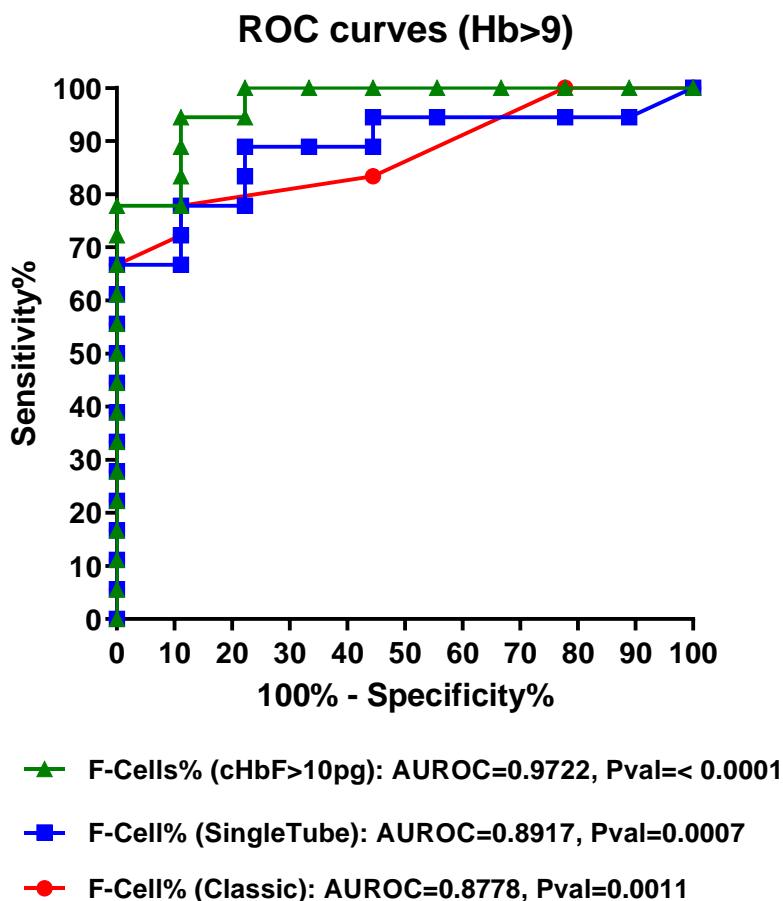
O método de Spike-In cHbF>10 Pg, apresentou uma sensibilidade de 94,4% e especificidade de 88,9% em estratificar pacientes com base nos níveis de hemoglobina, quando o percentual de eritrócitos protegidos (>10pg) era de <65% (AUROC=0,9722, Pval=<0,001) enquanto o método de determinação de F-Cell Single Tube apresentou sensibilidade de 77,7% e especificidade de 88,9% quando a determinação de F-Cells era de < 90,4% (AUROC=0,8917, Pval=0.0007). Esses dados indicam que a abordagem proposta por nós possui uma melhor especificidade e sensibilidade quando comparado aos demais métodos, representado na figura 25. Para o método Clássico, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 83,3 e 55,5% respectivamente, quando a % de F-Cells era de <99,7. (AUROC=0,8778, Pval=0,0011). Comparamos ainda, a distinção entre os métodos nos pacientes com Hb>9 e <9, de maneira evidente, o método Single Tube e cHbF>10pg são capazes de apresentar melhor como pode ser visualizado na Figura 34

Figura 33. Porcentagem de F-Cells em amostras analisadas de pacientes com hemoglobina >9 e <9. A figura apresenta os gráficos de distribuição de %F-Cells, entre os diferentes métodos de estimativa.



Os dados foram plotados e analisados pelo GraphPad Prims, utilizando two-tailed Mann-Whitney test.

Figura 34. Análise de especificidade e sensibilidade comparativa entre os métodos F-Cell Clássico, F-Cell Single Tube, e F-Cell cHbF>10 pg em pacientes com Hemoglobina >9 e <9 respectivamente.



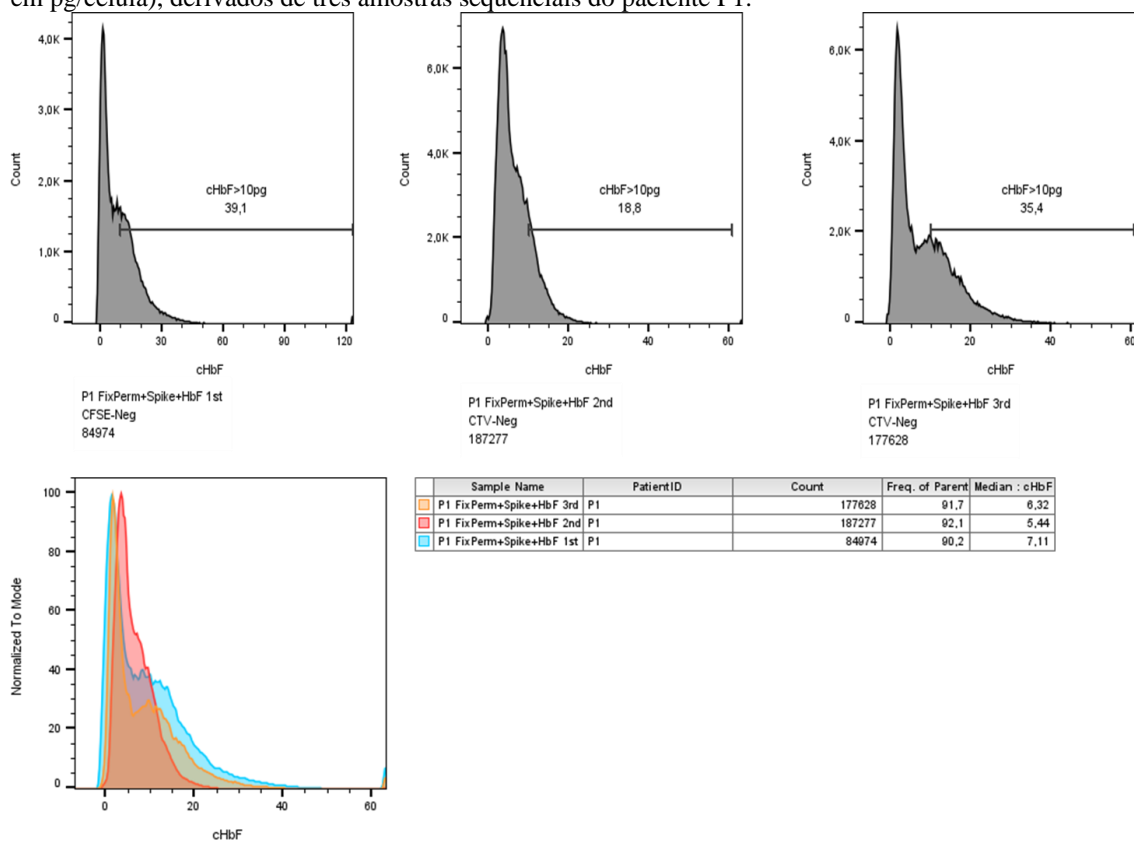
5.4 Seguimento de Pacientes

Para demonstrar se o método desenvolvido por nós apresenta algum potencial preditivo clínico, realizamos análise sequencial de sete pacientes de maneira consecutiva. Três dos sete pacientes avaliados tiveram três ou mais amostras avaliadas sequencialmente, enquanto os demais tiveram apenas duas avaliações. Estes pacientes foram incluídos por apresentarem baixos níveis de cHbF avaliados anteriormente, ou histórico de crises de vaso-oclusão de repetição.

Exemplificando pelo caso do paciente 1 (P1), masculino, HbSS, o qual apresentava crise vaso oclusiva 04 semanas antes da primeira visita, necessitando analgesia para alívio clínico. Para este paciente, na ocasião da visita, nosso método identificou que apenas 39% dos eritrócitos estavam protegidos, com conteúdo de

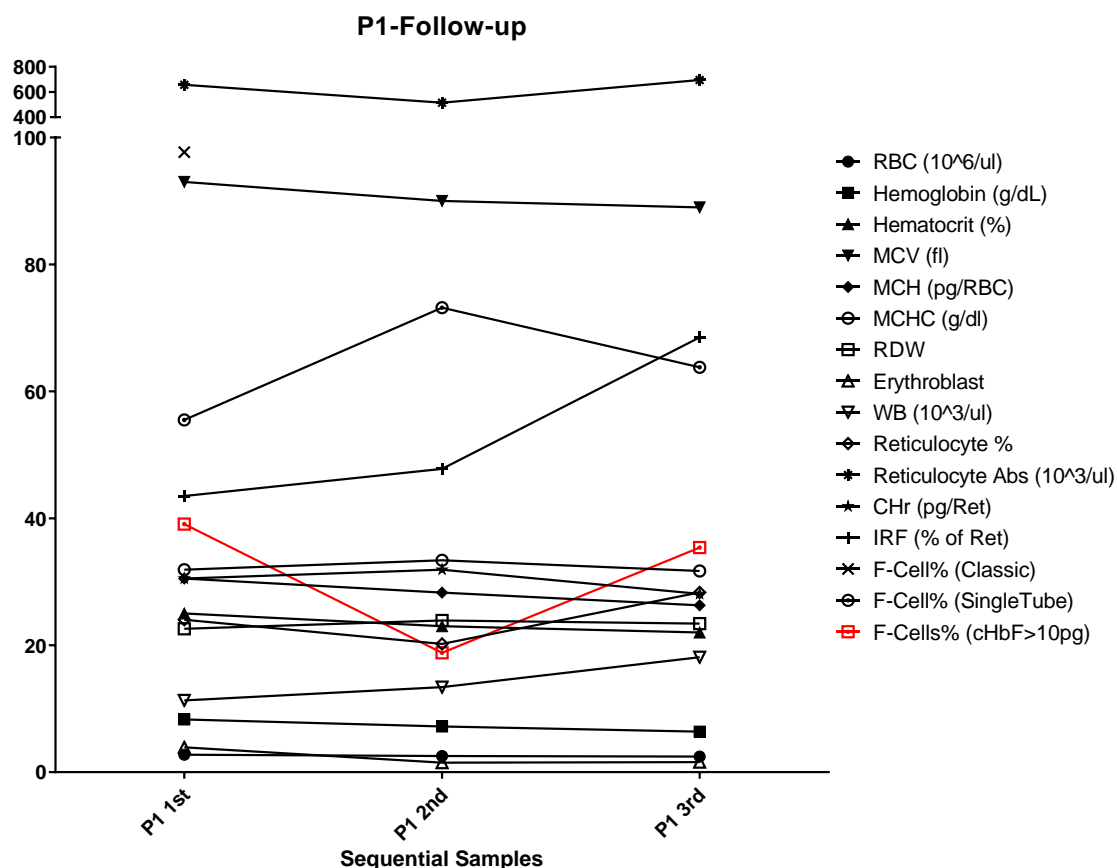
HbF>10pg, enquanto o método clássico de F-Cell identificou 97,7% de F-Cells. Na ocasião, foi prescrita hidroxiuréia a 15 mg/Kg/dia, visto que o paciente não apresentava intercorrência clínica. Na segunda visita, cinco meses após, o paciente ainda sem acesso à HU retornou queixando-se de crise álgica e persistente há dois dias, e as prescrições foram renovadas com o nível de HU mantido. Nesta segunda visita, nossas análises identificaram que a porcentagem de eritrócitos protegidos havia caído para 18%. Quatro meses após, na sua terceira visita, o paciente queixava-se de dor, especialmente na região abdominal, havendo uma referência ao uso irregular de HU pelo paciente. Nesta ocasião, nossas análises identificaram que as porcentagens de eritrócitos protegidos correspondiam a 35%. Os dados de citometria e laboratoriais podem ser visualizados nas figuras 35 e 36, respectivamente.

Figura 35. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de três amostras sequenciais do paciente P1.



Os histogramas acima apresentam as distribuições obtidas após a conversão da intensidade de fluorescência de cada célula em cHbF, com a indicação da porcentagem de células contendo mais de 10pg/célula (cHbF>10pg). Os histogramas abaixo representam a superposição de todas as amostras sequenciais obtidas do paciente P1. A tabela apresenta a contagem de eventos analisados (Count), a frequência destes dentre os eventos adquiridos (Freq. of Parents), e o conteúdo mediano de cHbF da população total dos eritrócitos das amostras obtidas do paciente, nas diferentes visitas.

Figura 36. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells, obtidos das amostras do paciente P1 nas visitas sequenciais avaliadas.

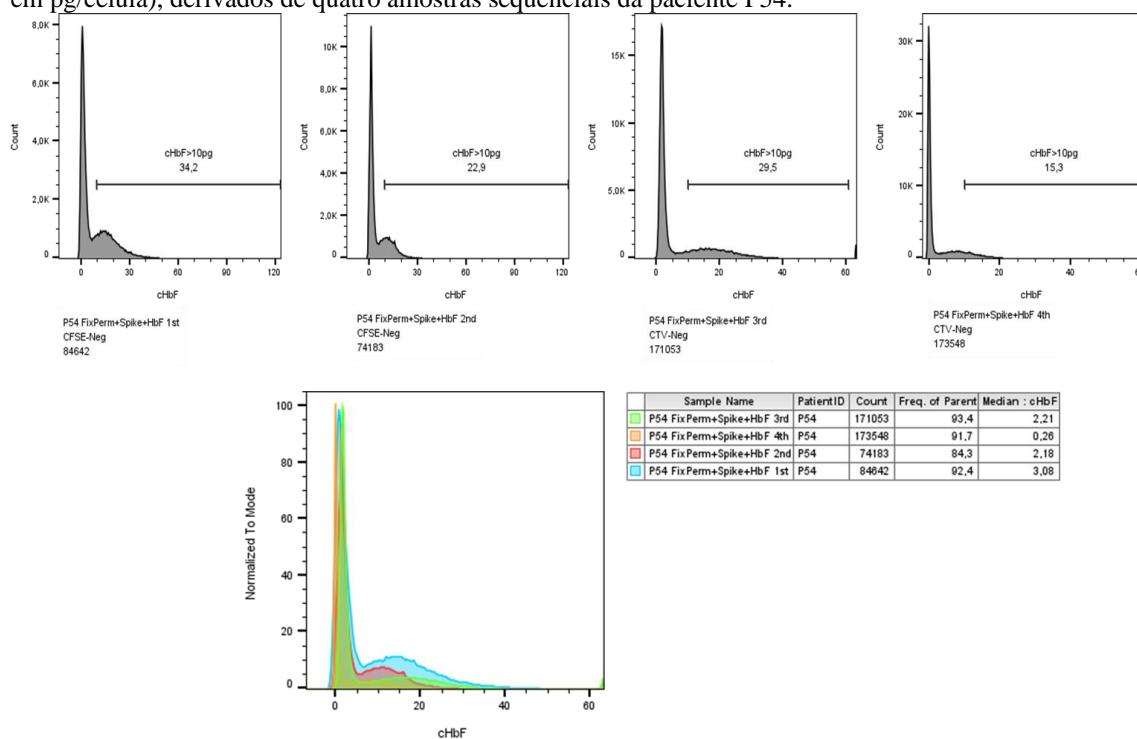


Além dos dados obtidos do hemograma do paciente, também estão representadas as porcentagens de F-Cells (F-Cell%) obtidas pelo nosso novo método quantitativo (cHbF>10pg, i.e. efetivamente protegidas); pelo método clássico, baseado no uso de um tubo controle adicional com células não marcadas para definição do cutoff de células HbF-positivas (Classic); e por uma variação do método clássico, baseada no uso da população de células HbF-negativa (sangue de adulto saudável contido no Spike-In) como controle para definição do cutoff. Os valores derivados de cada amostra proveniente do paciente P1 foram plotados utilizando software GraphPad Prism.

A paciente P54, feminino, HbSS, com histórico de má adesão à medicação, compareceu à primeira visita sem crise de dor, após infecção viral, teve a dosagem de Hidroxiuréia aumentada para 41 mg/Kg. Nesta visita nosso método indicava que 33,8% dos eritrócitos estavam protegidos com níveis de HbF >10pg, enquanto o método clássico estimava 85% de F-Cells. Na segunda visita avaliada, após 04 meses (amostra não-sequencial), a paciente sem intercorrência retorna, porém, dado a baixa aderência a HU (Com limites de VCM dentro da normalidade) e a ocorrência de eventos vaso-oclusivos de repetição, Voxelotor 1500 mg/dia foi introduzido e a dosagem de HU foi mantida. Na terceira visita, 03 meses posterior, relata crise algica necessitando de atendimento médico para melhora; medicamentos para alívio de dor foram ofertados, e a dose prescrita de HU e Voxelotor foram mantidas. Nesta ocasião, a porcentagem de eritrócitos com níveis

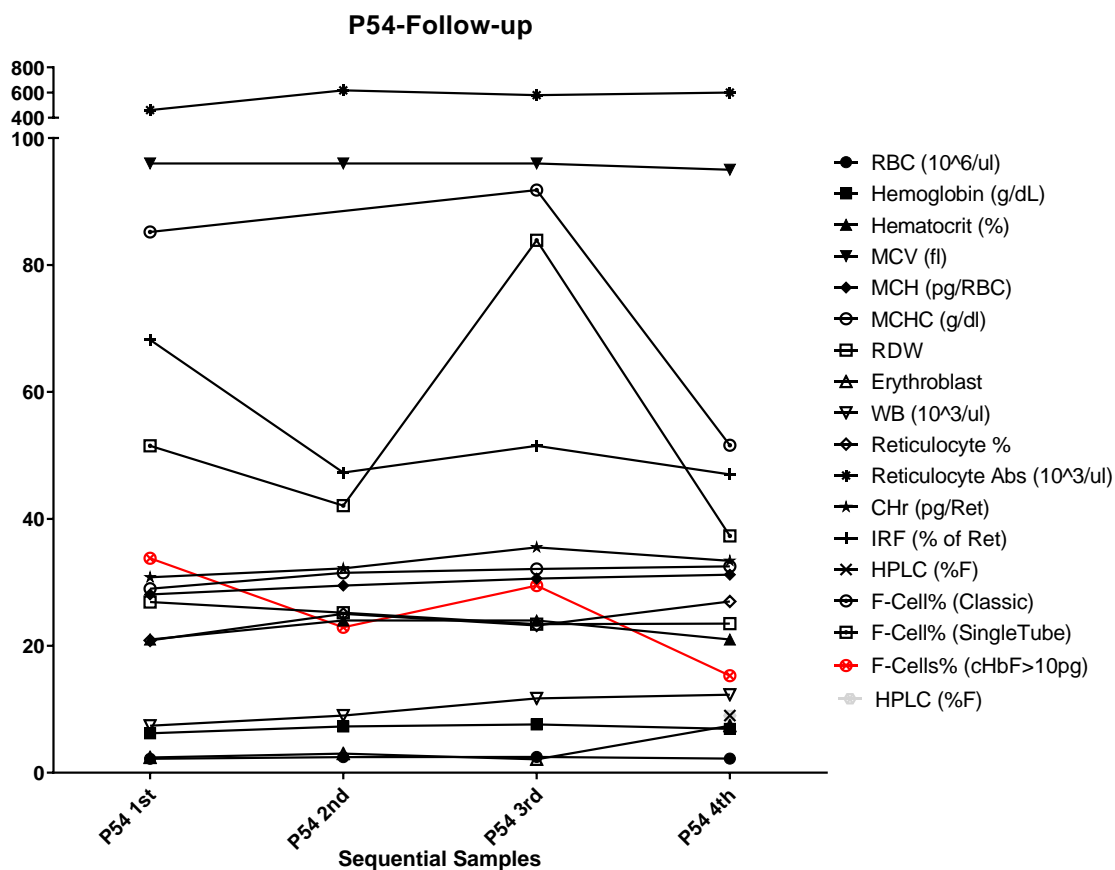
protetivos de cHbF (>10pg/célula) caíram para 29,5%, enquanto o método clássico de F-Cell evidenciava 91% de células HbF-positivas. Após dois meses, paciente retorna referindo crise de dor persistente, nosso método identificou que apenas 15,3% dos eritrócitos tinham cHbF>10pg, e simultaneamente, a análise por HPLC identificou que o percentual de HbF era de 9% (Figura 37 e 38).

Figura 37. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de quatro amostras sequenciais da paciente P54.



Os histogramas acima apresentam as distribuições obtidas após a conversão da intensidade de fluorescência de cada célula em cHbF, com a indicação da porcentagem de células contendo mais de 10pg/célula (cHbF>10pg). Os histogramas abaixo representam a superposição de todas as amostras sequenciais obtidas da paciente P54. A tabela apresenta a contagem de eventos analisados (Count), a frequência destes dentre os eventos adquiridos (Freq. of Parents), e o conteúdo mediano de cHbF da população total dos eritrócitos das amostras obtidas do paciente, nas diferentes visitas.

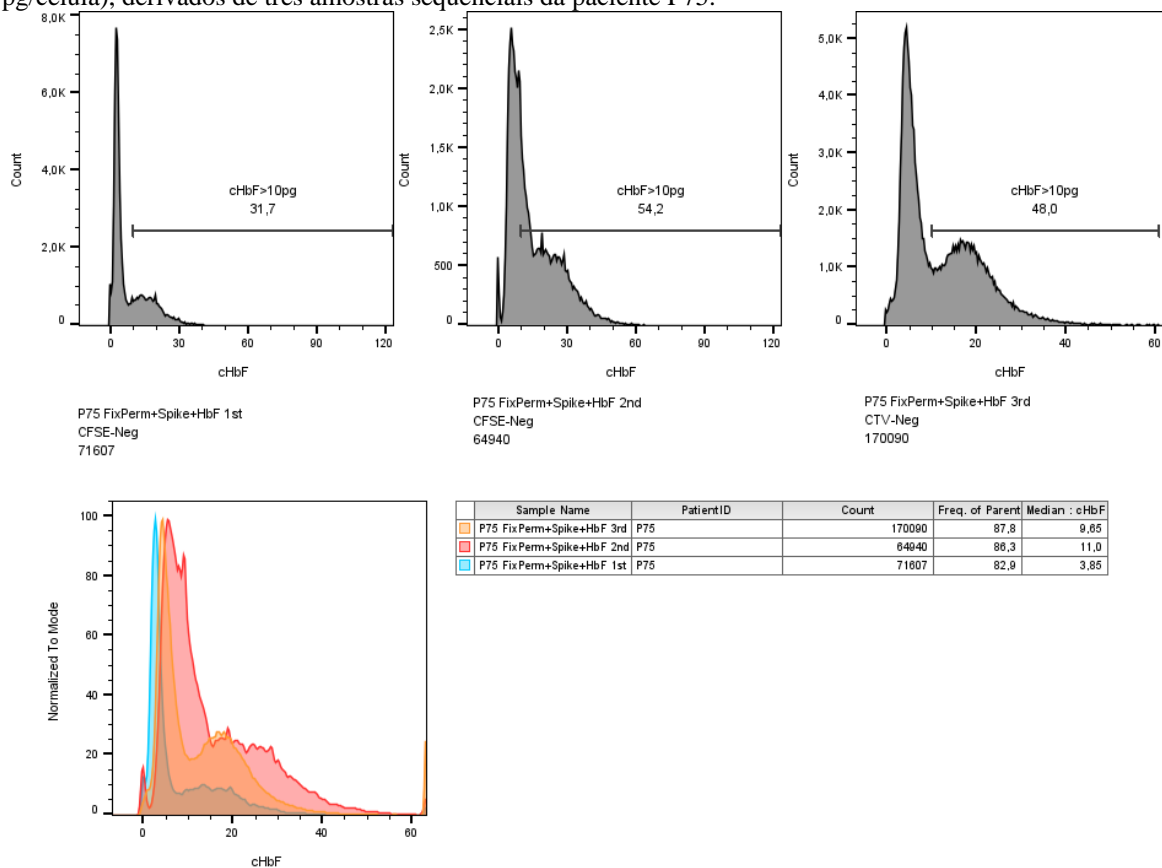
Figura 38. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P54, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.



Além dos dados obtidos do hemograma do paciente, também estão representadas as porcentagens de F-Cells (F-Cell%) obtidas pelo nosso novo método quantitativo (cHbF>10pg, i.e. efetivamente protegidas); pelo método clássico, baseado no uso de um tubo controle adicional com células não marcadas para definição do cutoff de células HbF-positivas (Classic); e por uma variação do método clássico, baseada no uso da população de células HbF-negativa (sangue de adulto saudável contido no Spike-In) como controle para definição do cutoff. A porcentagem de HbF obtida por HPLC na quarta visita também é indicada. Os valores derivados de cada amostra proveniente da paciente P54 foram plotados utilizando software GraphPad Prism.

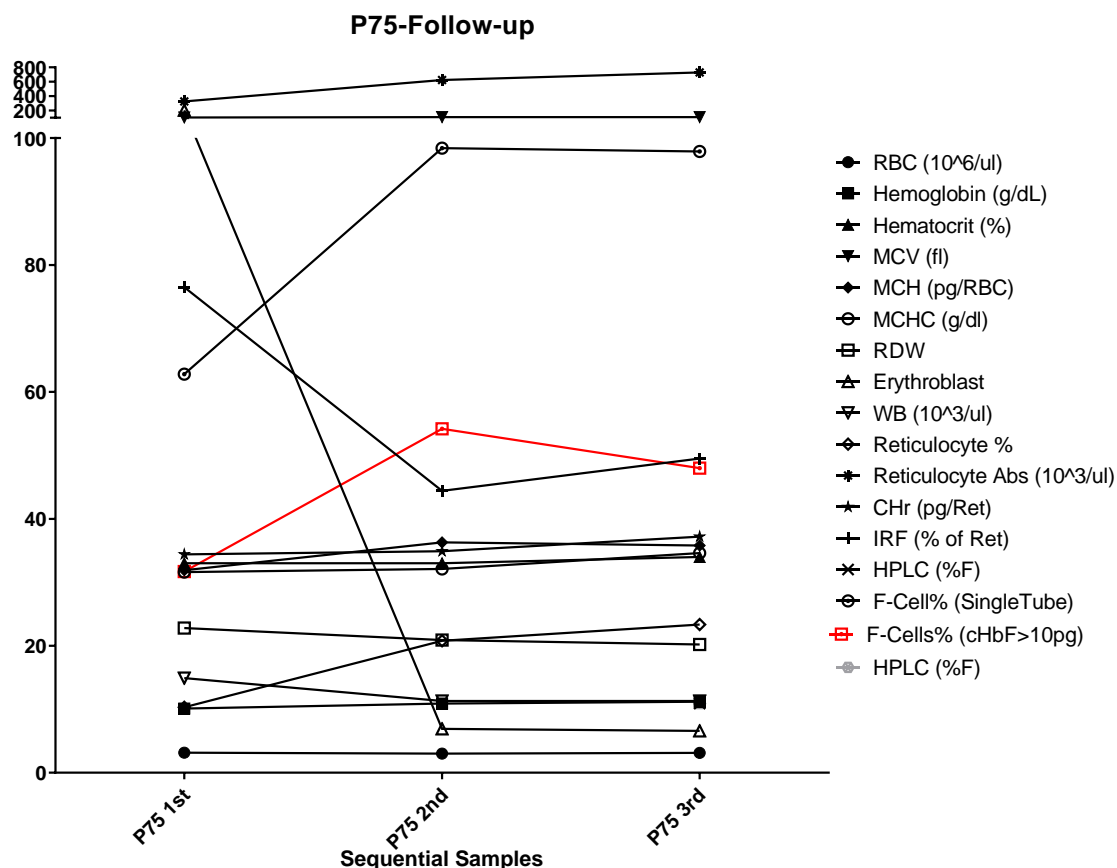
A paciente P75, feminino, HbSS, em uso de HU 23 mg/Kg, compareceu à primeira visita com queixa de crise álgica precedente há duas semanas, e a dose de HU foi escalonada para 26 mg/Kg. Nesta ocasião, nosso método identificou que apenas 31,7% dos eritrócitos tinham cHbF>10pg. Cerca de cinco semanas após, em seu retorno, as porcentagens de eritrócitos protegidos (cHbF>10pg) foram para 54,2%. Na terceira visita (amostra não-sequencial), com a paciente sem queixa de dor ou qualquer intercorrência, realizamos análise visando comparativo com os valores obtidos por HPLC que foi realizado simultaneamente na obtenção (Figura 39 e 40).

Figura 39. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de três amostras sequenciais da paciente P75.



Os histogramas acima apresentam as distribuições obtidas após a conversão da intensidade de fluorescência de cada célula em cHbF, com a indicação da porcentagem de células contendo mais de 10pg/célula (cHbF>10pg). Os histogramas abaixo representam a superposição de todas as amostras sequenciais obtidas da paciente P75. A tabela apresenta a contagem de eventos analisados (Count), a frequência destes dentre os eventos adquiridos (Freq. of Parents), e o conteúdo mediano de cHbF da população total dos eritrócitos das amostras obtidas do paciente, nas diferentes visitas.

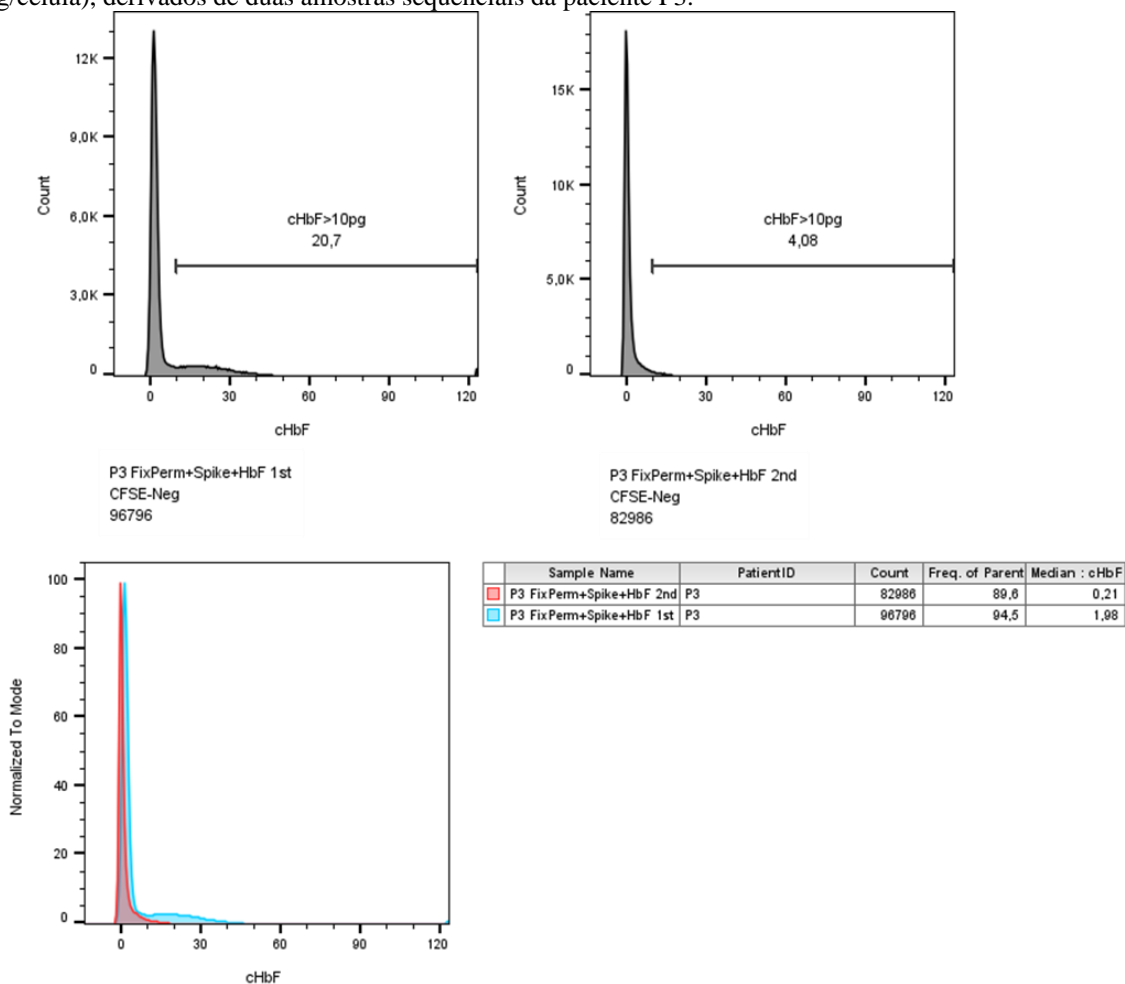
Figura 40. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P75, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.



Além dos dados obtidos do hemograma do paciente, também estão representadas as porcentagens de F-Cells (F-Cell%) obtidas pelo nosso novo método quantitativo (cHbF>10pg, i.e. efetivamente protegidas); pelo método clássico, baseado no uso de um tubo controle adicional com células não marcadas para definição do cutoff de células HbF-positivas (Classic); e por uma variação do método clássico, baseada no uso da população de células HbF-negativa (sangue de adulto saudável contido no Spike-In) como controle para definição do cutoff. A porcentagem de HbF obtida por HPLC na terceira visita também é indicada. Os valores derivados de cada amostra proveniente da paciente P75 foram plotados utilizando software GraphPad Prism.

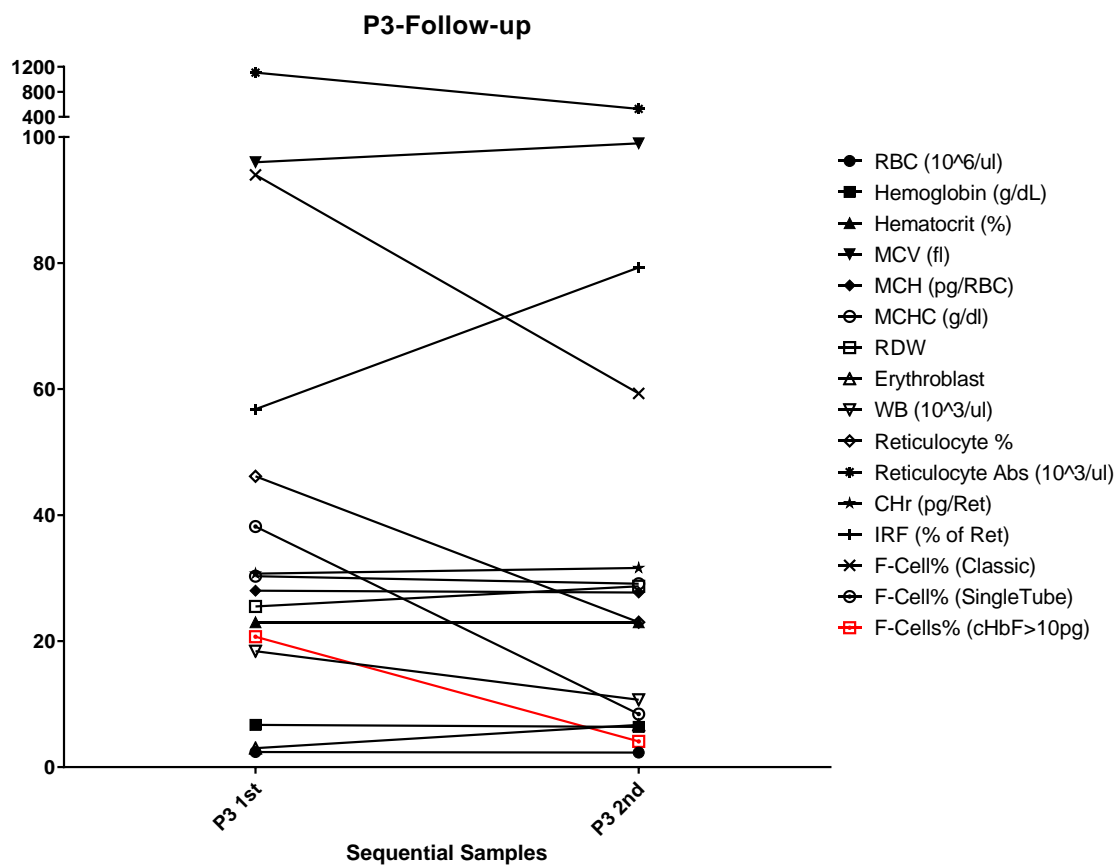
Dentre os demais pacientes que tiveram duas análises consecutivas, a Paciente P3, feminino, HbSS, 3 anos de idade, apresentava, na primeira visita, uma porcentagem de F-cells pelo método clássico de mais de 90%. No entanto, nosso novo método quantitativo revelou que apenas 20,7% dos eritrócitos possuíam níveis de cHbF >10pg, portanto, revelando uma porcentagem de eritrócitos protegidos extremamente baixa e alarmante, a qual poderia sugerir uma maior susceptibilidade a algum evento vaso-oclusivo eminente. De fato, cerca de 3 semanas após, a paciente retornou apresentando crise alérgica, com a porcentagem de F-Cells protegidas (cHbF>10pg) de apenas 4%, enquanto o método clássico ainda indicava cerca de 60% de F-Cells (Figura 41 e 42).

Figura 41. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de duas amostras sequenciais da paciente P3.



Os histogramas acima apresentam as distribuições obtidas após a conversão da intensidade de fluorescência de cada célula em cHbF, com a indicação da porcentagem de células contendo mais de 10pg/célula (cHbF>10pg). Os histogramas abaixo representam a superposição das amostras sequenciais obtidas da paciente P3. A tabela apresenta a contagem de eventos analisados (Count), a frequência destes dentre os eventos adquiridos (Freq. of Parents), e o conteúdo mediano de cHbF da população total dos eritrócitos das amostras obtidas do paciente, nas diferentes visitas.

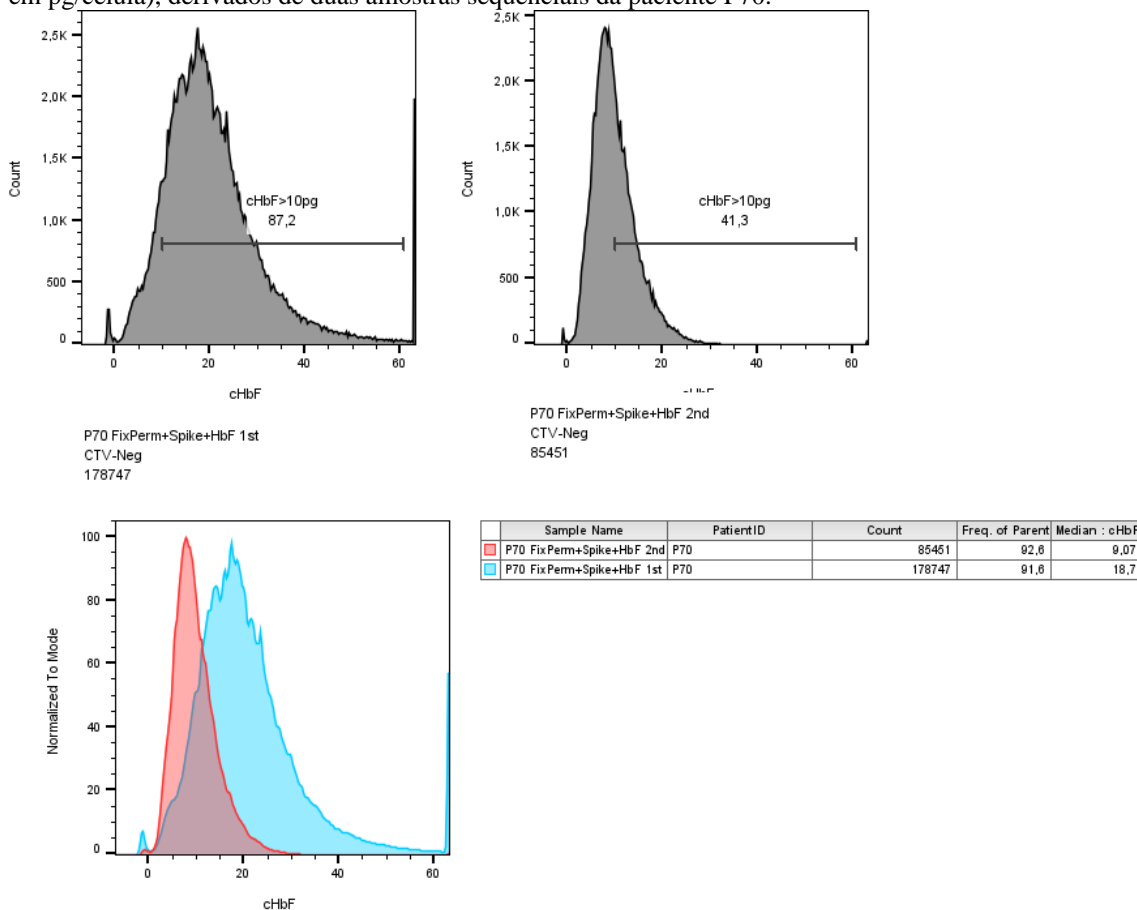
Figura 42. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P3, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.



Além dos dados obtidos do hemograma do paciente, também estão representadas as porcentagens de F-Cells (F-Cell%) obtidas pelo nosso novo método quantitativo (cHbF>10pg, i.e. efetivamente protegidas); pelo método clássico, baseado no uso de um tubo controle adicional com células não marcadas para definição do cutoff de células HbF-positivas (Classic); e por uma variação do método clássico, baseada no uso da população de células HbF-negativa (sangue de adulto saudável contido no Spike-In) como controle para definição do cutoff. Os valores derivados de cada amostra proveniente da paciente P3 foram plotados utilizando software GraphPad Prism.

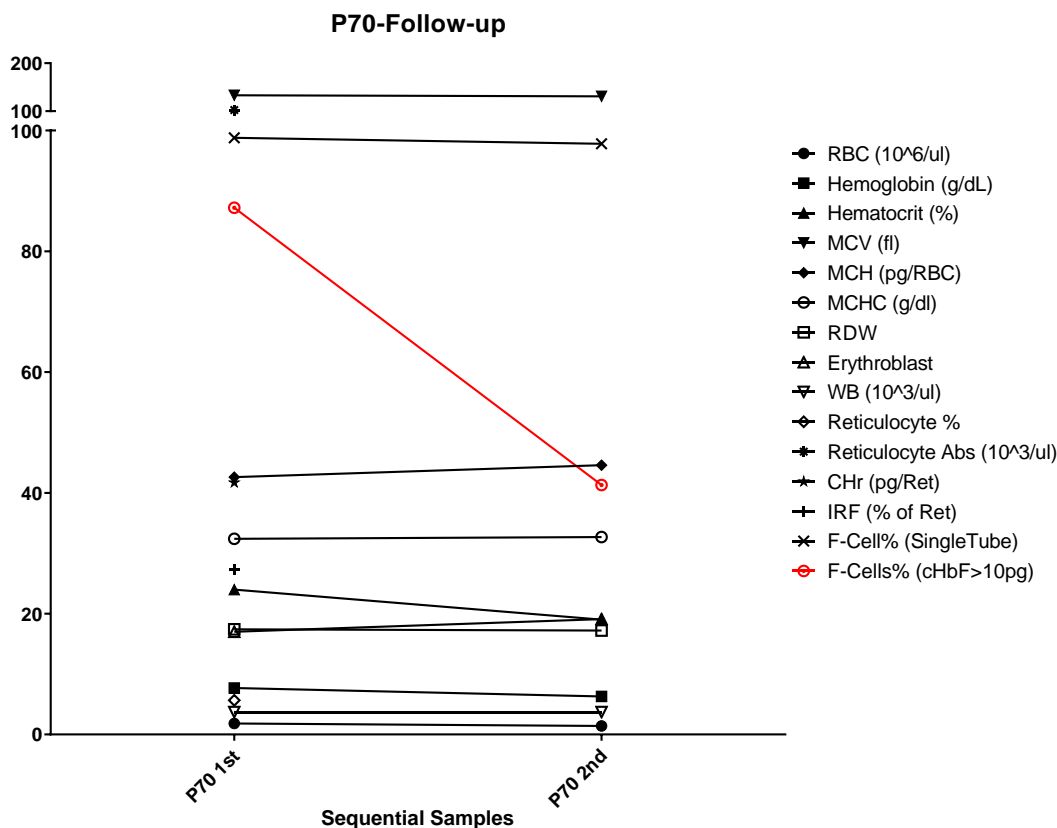
Interessantemente, no que se refere a paciente P70, em uso de HU na dosagem de 34,2 mg/Kg, nossa análise demonstrou na primeira visita, um total de 87,2% de eritrócitos protegidos e dentro de duas semanas, adjunto a uma queda hematimétrica brusca, os valores caíram para 41%, sem qualquer intercorrência ou manifestação clínica. Embora, este, não tenha sido preditivo para previsão de eventos clínicos agudos, a paciente em questão apresenta múltiplas complicações crônicas, e níveis de eritrócitos com HbF >10pg abaixo de 40% parecem ser fatores determinantes para previsão de ocorrências (Figura 43 e 44).

Figura 43. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de duas amostras sequenciais da paciente P70.



Os histogramas acima apresentam as distribuições obtidas após a conversão da intensidade de fluorescência de cada célula em cHbF, com a indicação da porcentagem de células contendo mais de 10pg/célula (cHbF>10pg). Os histogramas abaixo representam a superposição das amostras sequenciais obtidas da paciente P70. A tabela apresenta a contagem de eventos analisados (Count), a frequência destes dentre os eventos adquiridos (Freq. of Parents), e o conteúdo mediano de cHbF da população total dos eritrócitos das amostras obtidas do paciente, nas diferentes visitas.

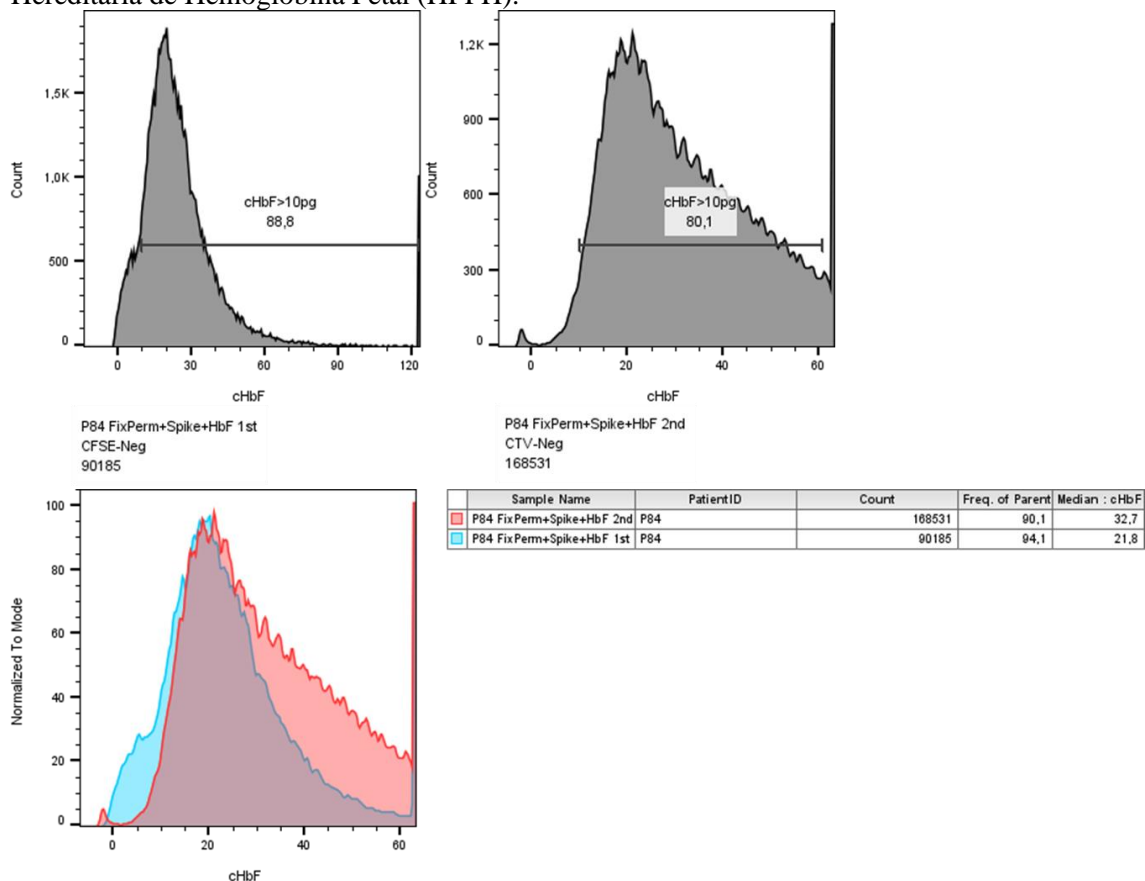
Figura 44. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P70, obtidos nas visitas sequenciais avaliadas.



Além dos dados obtidos do hemograma do paciente, também estão representadas as porcentagens de F-Cells (F-Cell%) obtidas pelo nosso novo método quantitativo (cHbF > 10pg, i.e. efetivamente protegidas); pelo método clássico, baseado no uso de um tubo controle adicional com células não marcadas para definição do cutoff de células HbF-positivas (Classic); e por uma variação do método clássico, baseada no uso da população de células HbF-negativa (sangue de adulto saudável contido no Spike-In) como controle para definição do cutoff. Os valores derivados de cada amostra proveniente da paciente P70 foram plotados utilizando software GraphPad Prism.

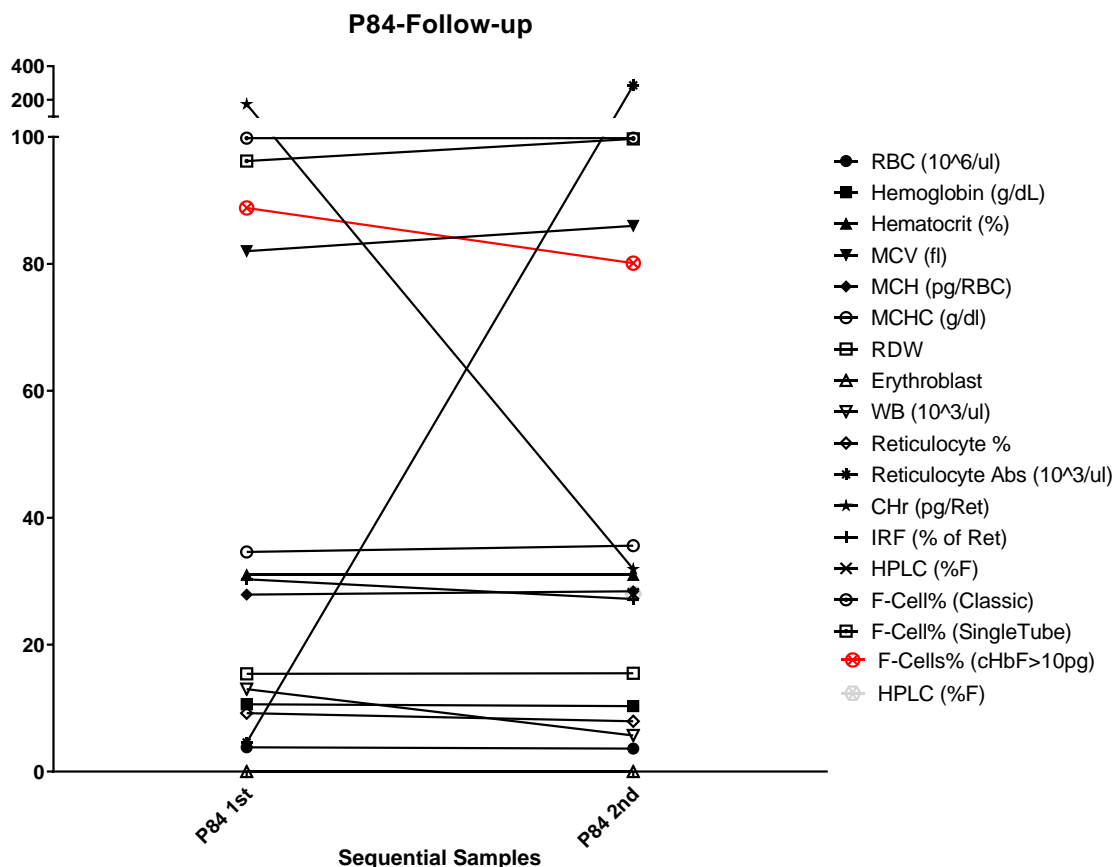
Por fim, analisamos a paciente P84, feminino, HbSS com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH), que não utilizava HU em nenhuma das duas visitas. Nosso método evidencia claramente a clássica distribuição homogênea e pancelular de HbF nos eritrócitos destes pacientes, revelando adicionalmente, o alto conteúdo de HbF na população de eritrócitos destes pacientes assintomáticos, como revelado pelos valores da mediana de cHbF (Figura 45e 46).

Figura 45. Comparação dos padrões de distribuição dos eritrócitos, com base no conteúdo de HbF (cHbF, em pg/célula), derivados de duas amostras sequenciais da paciente P84 com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH).



Os histogramas acima apresentam as distribuições obtidas após a conversão da intensidade de fluorescência de cada célula em cHbF, com a indicação da porcentagem de células contendo mais de 10pg/célula (cHbF>10pg). Os histogramas abaixo representam a superposição das amostras sequenciais obtidas da paciente P84. A tabela apresenta a contagem de eventos analisados (Count), a frequência destes dentre os eventos adquiridos (Freq. of Parents), e o conteúdo mediano de cHbF da população total dos eritrócitos das amostras obtidas do paciente, nas diferentes visitas.

Figura 46. Valores hematimétricos e porcentagens de F-cells das amostras da paciente P84 com Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH).



Obtidos nas visitas sequenciais avaliadas. Além dos dados obtidos do hemograma do paciente, também estão representadas as porcentagens de F-Cells (F-Cell%) obtidas pelo nosso novo método quantitativo (cHbF>10pg, i.e. efetivamente protegidas); pelo método clássico, baseado no uso de um tubo controle adicional com células não marcadas para definição do cutoff de células HbF-positivas (Classic); e por uma variação do método clássico, baseada no uso da população de células HbF-negativa (sangue de adulto saudável contido no Spike-In) como controle para definição do cutoff. A porcentagem de HbF obtida por HPLC na segunda visita também é indicada. Os valores derivados de cada amostra proveniente da paciente P84 foram plotados utilizando software GraphPad Prism.

6 Discussão

Composta por um complexo proteico envolvendo duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$) a hemoglobina fetal, ou HbF, é considerada o principal modulador clínico no manejo da Doença Falciforme. O mecanismo protetor relacionado é decorrente de dois mecanismos principais: a redução na concentração relativa de HbS, em função do aumento do conteúdo de HbF intracelular, prejudicando a formação de heterotetrâmeros $\alpha_2\beta S_2$; e a dissociação de tetrâmeros híbridos mistos entre HbF e HbS ($\alpha_2\beta S\gamma$), que impede a formação de fibras poliméricas (ATWEH; SCHECHTER, 2001).

Entretanto, muito foi discutido sobre a quantidade de HbF necessária para reprimir a polimerização, Steinberg e colaboradores caracterizaram que eritrócitos >10pg de HbF inibiam a formação do polímero da HbS quando a saturação de oxigênio variava de 40 a 70% na microcirculação. Esses dados também foram corroborados com estudos em indivíduos heterozigotos portadores de persistência hereditária da hemoglobina fetal (HPFH) com distribuição de HbF pancelular, esses indivíduos possuem um nível típico de HbF de 30% (HPLC) e uma hemoglobina corpuscular média de 30pg, portanto, cada eritrócito contem cerca de 10pg de HbF, notavelmente, pacientes acometidos por essa condição apresentam fenótipo normal ou apenas hemólise mínima (BUCHANAN, 2014; SEBASTIANI; STEINBERG, 2023; STEINBERG; CHUI; DOVER; SEBASTIANI *et al.*, 2014).

Atualmente, existem diferentes abordagens técnicas para avaliar as variantes de hemoglobina, sendo a principal metodologia usada, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como também é o padrão ouro para monitoramento da terapia farmacológica (efeito de indução de HbF) na DF. O HPLC se baseia no tempo necessário para eluição do gradiente de frações de hemoglobina (tempo de retenção) que varia em virtude do momento da injeção da amostra, até a detecção do pico máximo. O tempo de retenção da hemoglobina é calculado e plotado em cromatograma. A vantagem do HPLC consiste no poder de resolução, reprodutibilidade, automatização e quantificação de globinas variantes (KHERA; SINGH; KHUANA; GUPTA *et al.*, 2015). No entanto, a análise por HPLC, comparada à determinação da % de F-Cells, só quantifica o percentual de HbF (%HbF) obtido de uma amostra de sangue após a lise das células, de modo que a compartimentalização unicelular de HbF é perdida, uma informação que seria importante para estimar a quantidade de células protegidas contra a falcização. Além disto, na janela de eluição de HbF, outras variantes de hemoglobina podem eluir o que pode impedir a quantificação precisa de HbF (SZUBERSKI; OLIVEIRA; HOYER, 2012).

O advento de abordagens de citometria de fluxo para quantificação mais precisa de células F e seu conteúdo de HbF rendeu informações adicionais. Em um estudo da expressão de HbF em uma grande coorte de crianças com vários genótipos de DF (incluindo hemoglobinas SS, S β^0 , S β^+ e SC), bem como pacientes com HbSS/HPFH, Marcus e colaboradores observaram uma faixa ampla de expressão de HbF por HPLC (%HbF) e citometria de fluxo (% de F-Cells). Especificamente, eles observaram que a % de HbF por HPLC aumenta logaritmicamente com um aumento linear no percentual de F-Cells para todos os genótipos de DF. A implicação desta relação é que um mesmo aumento em termos de % de HbF resultaria num aumento muito maior na % de F-Cells em um paciente com baixos níveis de HbF (e.g. aumento da % de HbF de 2% para 13%, equivalendo a um aumento na % de F-Cells de 20% para 70%), do que em um paciente já com níveis mais elevados (e.g. aumento da % de HbF de 10% para 21%, equivalendo a um aumento na % de F-Cells de 60% para 80%). No entanto, esses resultados refletem a limitação associada à determinação da % de F-Cells pelo método clássico de citometria de fluxo, uma vez que o aumento na % de F-Cells, por si só, não captura o aumento no conteúdo de HbF da população de F-Cells (KHANDROS; BLOBEL, 2021; MARCUS; KINNEY; SCHULTZ; O'BRANSKI *et al.*, 1997). Apesar de informativos, a determinação da % de F-Cells pelos métodos clássicos de citometria de fluxo podem apresentar muitas fontes de variabilidade relacionadas à fixação, número de células, tempo de permeabilização, solução de saturação, tempo de incubação e quantidade de anticorpos adicionados. Além destes fatores, o fato dos controles negativos serem derivados das mesmas amostras submetidas aos mesmos processos relacionados, entretanto não marcadas desconsidera completamente a fluorescência derivada da marcação inespecífica com o anticorpo anti-HbF. Por outro lado, a incubação das células do tubo controle com um controle isotípico marcado com o mesmo fluoróforo, considera um sinal inespecífico de um anticorpo controle que não reflete necessariamente a marcação inespecífica derivada do anticorpo anti-HbF. EM ambos os casos, isso leva a uma estimativa inadequada da porcentagem de F-Cells, tendo em vista a impossibilidade de se estabelecer um valor de cutoff adequado para definir células HbF-positivas que, de fato, expressam HbF. Assim, o ensaio clássico de citometria detecta, no melhor dos cenários, apenas a porcentagem de eritrócitos com qualquer conteúdo de HbF, mesmo que mínimo. Ainda, uma marcação inespecífica pode gerar suficientemente sinal e ser considerada como F-Cell.

Pensando na importância do papel modulador da HbF na DF, Hebert e colaboradores desenvolveram, recentemente, um método para quantificação de HbF em hemácias ao nível unicelular. Este método também é baseado na correlação entre a HbF corpuscular média (MCHbF), calculado utilizando os valores da % de HbF (obtida por HPLC) e do HCM (derivado de um contador automatizado), e a intensidade de fluorescência obtida pela MIF (*Median Fluorescence Intensity*) derivada dos dados de citometria de fluxo. No entanto, o método de Hebert et al utiliza um grupo de amostras de pacientes com diferentes valores de MCHbF para derivar uma curva padrão de regressão linear, com base nos valores de MCHbF pré-calculados e nos valores de MIF obtidos por citometria. Utilizando esta curva, a intensidade de fluorescência derivada do anti-HbF PE de cada eritrócito é convertida em um conteúdo de HbF por célula (cHbF) (HEBERT; RAKOTOSON; BODIVIT; AUDUREAU *et al.*, 2020). O método desenvolvido por Hebert requer a identificação de indivíduos com diferentes % de HbF (determinadas por HPLC) e com populações de eritrócitos com padrões de distribuição de HbF pan-celulares e homogêneos (i.e. distribuição normal e pequena variância), o que envolve raros pacientes com talassemia HbS/beta e HbS/HPFH (persistência hereditária de hemoglobina fetal), dificultando a sua implementação e ampla adoção. Adicionalmente, por envolver a geração de uma curva padrão, com todo um conjunto de amostras analisadas em separado das amostras dos pacientes, o método de Hebert et al esta sujeito a todas as variáveis analíticas descritas acima. A fim de corrigir a variabilidade derivada da ligação do anticorpo (que pode variar de lote para lote), o método de Hebert adota um kit de calibração especial (QuantiBRITE PE, BD Biosciences), composto por quatro populações de esferas (beads) de tamanhos distintos (cada uma com um número conhecido diferente de moléculas de PE por esfera). Além da necessidade de adicionar este controle de alto custo a todas as amostras analisadas (da curva padrão e dos pacientes), as amostras tem de ser adquiridas no mesmo citômetro de fluxo, usando as mesmas configurações, de forma a obter um valor de fluorescência de HbF normalizado (Moléculas de PE por RBC) que possa ser diretamente comparado entre as amostras. Como destacado pelos próprios autores, apesar do uso das beads de calibração, num contexto clínico seria necessário refazer uma nova curva padrão para cada novo lote de beads ou anticorpos.

Tendo em vista a complexidade do método estabelecido por Hebert e colaboradores, desenvolvemos um método utilizando um controle celular interno composto por duas populações de eritrócitos com quantidade de HbF conhecidas. Especificamente, no

presente trabalho, utilizamos amostras de sangue de cordão umbilical (UCB) devido à distribuição pancelar e homogênea de HbF dentre os eritrócitos. No entanto, nenhuma das amostras avaliadas por HPLC possuía 100% de HbF, em decorrência da troca (switch) de hemoglobina já presente ao nascimento. Um trabalho publicado por Oneal e colaboradores (2006) avaliou a cinética da troca de hemoglobina, utilizando técnicas de quantificação por HPLC, citometria, e PCR quantitativo, após o nascimento e durante a infância de crianças. O estudo demonstrou que a hemoglobina adulta já era presente ao nascimento e que o silenciamento da expressão de HbF se deu por completo dos 4 aos 6 meses de idade (ONEAL; GANTT; SCHWARTZ; BHANU *et al.*, 2006).

Obtivemos 33 amostras de sangue de cordão umbilical, todas sendo excedentes de amostras utilizadas em exames laboratoriais de rotina para a tipagem sanguínea. Devido ao volume limitado de certas amostras, realizamos a quantificação da % de HbF por HPLC em apenas 13 amostras que tinham volume suficiente. Algumas destas amostras, utilizamos para padronização do ensaio de citometria envolvido aqui, e analisando o padrão de distribuição de HbF por citometria de fluxo, optamos por utilizar uma amostra com 66,7% de HbF para a composição do Spike-In (controle de células HbF-positivas), tendo em vista o padrão de distribuição mais homogêneo de F-Cells e a ausência de células HbF-negativas (i.e. com o switch completo). Para a amostra HbF-negativa (obtidas de um adulto normal saudável) utilizada no preparo do Spike-In, a caracterização dos eritrócitos por HPLC e por citometria de fluxo, e a obtenção dos índices hematimétricos, foi feita a cada novo lote de Spike-In preparado. Esta caracterização foi feita para garantir a ausência de HbF nas amostras, uma vez que em situações de estresse, privação de nutrientes, ou aumento da demanda de oxigênio, pode ocorrer um fenômeno conhecido como eritropoiese de estresse, resultando na produção de eritrócitos contendo HbF, mesmo em indivíduos adultos hígidos, sem qualquer hemoglobinopatia adjacente ou em uso de hidroxiuréia (MABAERA; WEST; CONINE; MACARI *et al.*, 2008; RISSO; FABBRO; DAMANTE; ANTONUTTO, 2012).

Digno de nota, eritrócitos de cordão umbilical com tipagens distintas não necessitam de compatibilidade antigênica com as células HbF-negativas de adultos para realização do Spike-In, uma vez que o plasma contendo anticorpos é descartado, além de que, cada uma das amostras são marcadas com o reagente fluorescente e fixada independentemente uma da outra, para depois serem unidas em um mesmo produto.

Para o estabelecimento do ensaio de citometria de fluxo, inúmeros testes de padronização foram realizados para definição das melhores condições experimentais,

como pode ser visualizado nos dados suplementares. Dentre eles, demonstramos que a condição experimental que utilizava 2uL de anti-HbF para a marcação de 1×10^6 eritrócitos por tubo permitia que as populações HbF+ e HbF- contidas no Spike-In fossem corretamente distinguidas em amostras com até 50% de células de UCB. Em contraste, nas amostras simuladas com proporção de cordão umbilical superior a 50%, a disponibilidade dos anticorpos utilizados se tornava limitante para garantir a separação adequada das populações HbF+ e HbF- contidas no Spike-In. Esta limitação não foi observada quando utilizamos a condição experimental baseada no uso de uma quantidade de 5uL de anti-HbF para a marcação de um total de 1×10^5 eritrócitos.

Tendo em vista a baixa expressão de HbF nos pacientes falciformes, e de modo a economizar os insumos, realizamos todos nossos testes de validação na condição experimental utilizando menores quantidades de anticorpo (i.e, 2uL de anti-HbF para 1×10^6 RBCs). Interessantemente, quando realizamos a conversão da intensidade de fluorescência do anti-HbF-PE de cada célula, em conteúdo de HbF corpuscular absoluto estimado (cHbF), nosso método foi capaz de normalizar e corrigir as variações experimentais visualizada em diferentes condições com proporções de UCB distintas.

Para validação do método de Spike-In utilizamos amostras de sangue de cordão umbilical que tiveram a % de HbF obtida por HPLC, e o HCM obtido por um analisador hematológico, de forma a podermos pré-calcular o MCHbF de cada amostra para, então, compará-lo à média dos valores de cHbF da população total de eritrócitos (obtidos pelo método de citometria utilizando o Spike-In). Inicialmente, havíamos considerado somente a área uniformemente expressa e referente a um pico homogêneo de HbF, dito isto, observamos que os valores de MCHbF obtidos por ambas as abordagens, pré-calculados (a partir do HPLC e HCM) ou derivados por citometria (pelo método Spike-In), foram praticamente iguais para as amostras que eram frescas. As amostras referidas como frescas, foram disponibilizadas cerca de 24h (D1) após a coleta na maternidade, momento no qual tiveram seus dados hematimétricos obtidos por um analisador hematológico e, paralelamente, foram glicerolizadas. Ao mesmo tempo, uma alíquota destas amostras foi encaminhada para a avaliação da % de HbF por HPLC, a qual ocorreu 1 dia depois (D2).

Em um segundo grupo as amostras processadas tardiamente, os valores derivados por citometria foram superiores aos pré-calculados. Digno de nota, as amostras processadas tardiamente já apresentavam intensa hemólise (3/4+) no momento da quantificação por

HPLC. Adicionalmente, estas amostras foram glicerolizadas apenas cerca de 3 dias após a quantificação de HbF por HPLC. Um fator técnico que pode ter impactado nossa quantificação exata nas amostras não-frescas, é decorrente do fato das amostras de cordão umbilical possuírem eritroblastos que, por sua vez, são células resistentes a lise. Contadores automatizados modernos detectam a presença destas células e realizam uma contagem diferencial e hematimétrica corrigida e exata, caso contrário, eritroblastos são agrupados na contagem de leucócitos totais cujo aumento de densidade óptica pode resultar em níveis de hemoglobina falsamente elevados. Amostras com alto grau de hemólise podem apresentar contagens de eritrócitos e hematócritos diminuídos e, em contrapartida, parâmetros como RDW, HCM e CHCM elevados, resultando em desvios (PENG; XIANG; ZHOU; CAO *et al.*, 2020). Um trabalho realizado por Jonge e colaboradores (2018) avaliaram o efeito da hemólise mecânica sobre a quantificação derivada de um contador automatizado por impedância, e relataram um viés de -6,4% para quantificação de eritrócitos, -8,3% para hematócrito, 2% HCM e 3,3% CHCM respectivamente (DE JONGE; DOS SANTOS; CRUZ; SIMIONATTO *et al.*, 2018). Como utilizamos o parâmetro HCM, junto com a % de HbF obtida pelo HPLC, para derivar o valor de MCHbF (pg), muito provavelmente, essa fonte de variação nas amostras não frescas era devido a hemólise. Amostras frescas, com tempo de processamento de até 24 horas, tiveram seus níveis precisamente medidos e correlacionados com o estimado por HPLC, inclusive, amostras com quantidade % de HbF superior a quantidade de HbF contida nas células do Spike foram corretamente mensuradas, o que indica que nosso Spike funciona independentemente da quantidade de HbF a ser avaliada na amostra teste. Entretanto, observamos que a maioria das amostras de cordão umbilical tinham um pico referido como Acetil-F, cujo tempo de retenção era muito próximo e similar ao de HbF considerada para realização dos cálculos de MCHbF descritos anteriormente. Derivada de uma modificação pós-traducional que contém um resíduo de glicina (Gly, G) na posição N-terminal da cadeia da γ -globina, a hemoglobina fetal acetilada, pode corresponder cerca de 10 a 15% de HbF nos eritrócitos, especialmente de cordão umbilical.(MANNING; MANNING; DUMOULIN; PADOVAN *et al.*, 2020; SCHROEDER; CUA; MATSUDA; FENNINGER, 1962)

Adicionalmente, calculamos novamente o MCHbF considerando agora, os valores correspondentes a HbF acetilada e refizemos as análises para comparar com nossos dados anteriormente observados. (Dados disponíveis no anexo)

Enquanto a correlação de ambas as amostras (incluindo amostras frescas e não frescas) foi de ($r=0,6518$, One-tailed; $Pval=0,0286$) quando recalculamos os valores de MCHbF levando em conta a fração acetilada, obtivemos para todas as amostras uma correlação muito mais significativa de ($r=0,8324$, One-tailed; $Pval=0,0027$). Os valores anteriormente obtidos em amostras frescas ($r=0,9121$ One-tailed, $Pval=0,0154$) e não frescas ($r=0,3069$, One-tailed, $Pval=0,3466$) foram devidamente corrigidos sendo para as amostras frescas ($r=0,6803$, One-tailed, $Pval= 0,1031$) e para amostras não frescas ($r=0,9237$, One-Tailed, $Pval=0,0363$). Estes dados indicam que nosso anticorpo é capaz de reconhecer e se ligar também na fração acetilada da hemoglobina fetal. Nossos valores discrepantes nas duas condições amostrais descritas, era proveniente do fato de que amostras não frescas possuíam níveis mais altos de HbF acetilada quando comparados as amostras do grupo frescas, e após a correção dos dados, portanto, os valores obtidos tiveram uma maior correlação e significância.

Ao longo deste estudo, diferentes lotes de Spike-In foram gerados. A cada novo lote, tanto a célula controle HbF-negativa (sangue de adulto) como as células HbF-positivas de UCB (desglicerosiladas) foram caracterizadas por citometria previamente. Inicialmente, a marcação do Spike-In foi realizada com o corante CFSE, entretanto, devido a baixa estabilidade de fluorescência, para atingir uma marcação uniforme, concentrações maiores eram requeridas. Em contrapartida, à medida que a concentração para marcação era aumentada, devido à alta toxicidade do CFSE, tínhamos um produto final com pouca quantidade de células; especialmente, as células do cordão umbilical devido ao estresse adicional causado pela desglicerosilização. Testamos diferentes corantes, com propriedades lipofílicas, entretanto, ocorria transferência de fluorescência, das células marcadas do Spike-In para as células não marcadas sendo avaliadas, mediante a permeabilização com a solução contendo o detergente Triton X-100. Adicionalmente, os corantes lipofílicos utilizados são diluídos em etanol, o que mesmo em baixas concentrações, causava a lise das células. Posteriormente, adquirimos o corante CellTrace Violet, que apresenta as mesmas propriedades do CFSE utilizado, mas com a vantagem de propiciar uma marcação mais intensa e homogênea (mesmo quando utilizando em concentrações mais baixas), além de ser menos tóxico para as células (K; PARLANE; RILEY; GEE *et al.*, 2020; QUAH; PARISH, 2012).

Avaliamos 43 amostras proveniente de 31 pacientes com diagnóstico de Anemia Falciforme (HbSS), sendo que apenas um paciente era portador de S-Beta Talassemia (P103). Comparamos os dados laboratoriais obtidos dos pacientes com os dados obtidos

pela técnica de Spike-In. Devido à limitação de insumos, a determinação da % de F-Cells pelo método clássico foi realizada em apenas 27 amostras. Por sua vez, a avaliação por HPLC foi obtida de 15 pacientes, que tiveram o estudo da hemoglobina realizado como rotina no mesmo dia da coleta da amostra avaliada por nós. Finalmente, 12 amostras foram caracterizadas por todos os três métodos. Ao que se refere ao método clássico de F-Cell, cada amostra teve seu controle negativo realizado em paralelo. Basicamente, as mesmas amostras são submetidas aos mesmos processos de fixação, permeabilização e saturação, no entanto, essas amostras não são marcadas com anticorpos anti-HbF, e servem como um guia para definição de um limite (threshold), a partir do qual se define a população de F-Cells HbF-positivas. Percebemos que pacientes com diferentes respostas hematimétricas e clínicas, quando avaliados pelo método clássico, não apresentavam variações significativas no número de F-Cells, em decorrência da superestimativa de F-Cells em função do controle negativo não incorporar nenhuma fluorescência inespecífica (tendo em vista a ausência de um anticorpo controle marcado). Pensando nisto, utilizamos como controle negativo, as próprias células HbF-negativas do Spike-In, sabidamente negativas e que foram submetidas aos mesmos processos (inclusive, com a etapa adicional de marcação). Denominamos esse método alternativo de F-Cell Single tube (FC-ST). A determinação da porcentagem de F-Cells pelo método FC-ST distinguiu e estratificou os pacientes de uma maneira muito mais robusta, quando comparado ao método clássico de F-Cell; adicionalmente, contando com a vantagem da redução de insumos, uma vez que o controle negativo encontra-se dentro da própria amostra teste.

Obtivemos correlações muito melhores entre os dados hematimétricos e as % de F-Cells obtidas pelo método de Single Tube e, especialmente, com a % de F-Cells efetivamente protegidas ($cHbF > 10pg$) obtidas pelo método do Spike-In; quando comparadas às correlações obtidas com a % de F-Cells obtida pelo método clássico. Especialmente, como esperado, nossas correlações positivas indicaram que pacientes com maiores taxas percentuais de eritrócitos com conteúdo de $cHbF > 10pg$ possuem taxas de hemoglobina, e hematócrito, de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), mais elevadas, em concordância com a literatura (FRANCO; YASIN; PALASCAK; CIRAOLO *et al.*, 2006; KEIKHAEI; YOUSEFI; BAHADORAM, 2015; PLATT, 2008). As correlações observadas seriam decorrentes de dois principais fatores: 1- Fato do bloqueio de polimerização em eritrócitos, decorrente da alta quantidade de HbF intracelular, levar um

menor número de ciclos de falcização, por sua vez, reduzindo a hemólise, amenizando o estresse eritropoético na medula óssea, fruto da sobrevida aumentada das F-Cells na circulação; 2- A utilização de HU promove diminuição da eritropoiese ineficaz além de aumentar os níveis de HbF e melhorar os parâmetros hematológicos (BREWIN; EL HOSS; STROUBOULIS; REES, 2022; CAZZOLA, 2022; EL HOSS; COCHET; GODARD; YAN *et al.*, 2021; YASARA; PREMAWARDHENA; METTANANDA, 2021)

Diversos trabalhos já apontaram, como terapia alternativa, uso de medicações, sangrias terapêuticas e até dietas com restrição de ferro para diminuir os níveis de CHCM, uma vez que, eritrócitos com quantidade de hemoglobina corpuscular reduzida tem menor probabilidade de falcização e de hemólise, conseqüentemente (LI; KAZMI; LEE; ZHANG *et al.*, 2023; PARROW; VIOLET; GEORGE; ALI *et al.*, 2021). De modo contrário, essa lógica só se aplicaria a eritrócitos predominantemente com HbS, com conteúdo mínimo ou ausente de HbF. No nosso caso, representado aqui, pacientes com maiores índices de eritrócitos protegidos, também possuem maior HbF como um todo, portanto a estimativa do HCM e CHCM representada leva em conta o aumento percentual de hemoglobina fetal nestas amostras. Obtivemos uma correlação negativa para IRF (Fração imatura de reticulócitos), este é um parâmetro relativamente novo disponível em analisadores hematológicos automatizados que avalia a maturidade dos reticulócitos circulantes, por meio da quantificação da fração de reticulócitos que apresentam maior intensidade de marcação para RNA citoplasmáticos. Especialmente, este parâmetro avalia a cinética de glóbulos vermelhos e demonstrou ser útil no prognóstico de aplasia ocasionada por parvovírus B19 (MITRANI; GOLLOMP; LAMBERT; OBSTFELD, 2018). Reticulócitos aumentados e parâmetros de IRF mostraram utilidade e especificidade na previsão de crises vaso-oclusivas em pacientes com doença falciforme (FEUGRAY; KASONGA; GRALL; BENHAMOU *et al.*, 2022), em concordância com nossos achados. Encontramos correlações negativas com a % total de reticulócitos. A hemólise crônica e a anemia levam à eritropoiese de estresse com uma robusta reticulocitose na DF, e modelos *ex vivo* demonstraram que reticulócitos imaturos de estresse são as primeiras células a aderir as vênulas pós capilares, estreitando assim o lúmen e facilitando a vaso-oclusão, além de expressarem de maneira aumentada receptores de adesão (FRANCO; YASIN; PALASCAK; CIRAOLO *et al.*, 2006; HEBBEL; BOOGAERTS; EATON; STEINBERG, 1980; HOOVER; RUBIN; WISE; WARREN, 1979). Portanto, seria esperado que pacientes com alta porcentagem de HbF

possuísem níveis mais baixos de reticulócitos, ao contrário de pacientes com baixos níveis, nos quais os eritrócitos expostos a diferentes ciclos de falcização possuem maior hemólise e, conseqüentemente, reticulocitose. Utilizando nossa abordagem aqui, adaptada para a marcação de reticulócitos utilizando anti-CD71 (Receptor da Transferrina) e/ou Laranja de Tiazol (Corante de RNA), poderíamos extrair uma informação valiosa acerca dos níveis de expressão de HbF na população dos reticulócito, o que permitiria prever se a eritropoese em andamento estaria associada à geração futura de eritrócitos protegidos, ou não, adicionando um componente temporal à avaliação do paciente.

Obtivemos também uma correlação negativa da % de F-Cells protegidas (cHbF>10pg) com os parâmetros de contagem global de leucócitos e RDW. É bem estabelecido que pacientes com doença falciforme e sem ocorrência de foco infeccioso, possuem contagens totais elevadas de leucócitos ($10^3/uL$) cuja etiologia pode ser decorrente de hipo/asplenia, produção medular hiperativa devido ao estímulo sustentado da eritropoese, ou estimulação indireta via inflamação crônica. Especialmente, no que se diz a inflamação crônica, a heme extracelular desencadeia a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, levando a danos constitutivos não só no sistema endotelial, mais também à ativação de vias inflamatórias que levam a produção de interleucinas responsáveis por estimular a leucopoese (NADER; ROMANA; CONNES, 2020; WEST; WETHERS; SMITH; STEINBERG, 1992). Diversos trabalhos já relataram a leucocitose na doença falciforme como um preditor de mortalidade (CASTRO; BRAMBILLA; THORINGTON; REINDORF *et al.*, 1994; COLLER, 2005; CURTIS; DANDA; ETZION; COHEN *et al.*, 2016; LITOS; SARRIS; BEWLEY; SEED *et al.*, 2007; PLATT; BRAMBILLA; ROSSE; MILNER *et al.*, 1994). De acordo com nossa a correlação inversa encontrada, pacientes com maiores percentuais de eritrócitos com conteúdo de cHbF>10pg tem contagens de glóbulos brancos mais baixas, o que pode ser explicado por duas razões: 1- Pacientes com maiores percentuais de eritrócitos protegidos (cHbF>10pg) têm menores níveis de hemólise, conseqüentemente, menor inflamação portanto menor estimulação leu-eritropoética; 2-Pacientes em dose ideal de hidroxiúreia apresentam uma leucoredução em decorrência do efeito citotóxico da HU, especialmente sobre a eritropoese ineficaz (WARE, 2010; 2013; WEST; WETHERS; SMITH; STEINBERG, 1992; YASARA; PREMAWARDHENA; METTANANDA, 2021).

De maneira similar, o mesmo se aplica ao RDW (*Red Blood Cell Distribution Width*), este parâmetro reflete a distribuição do tamanho dos eritrócitos por meio da razão entre o

desvio padrão do volume dos eritrócitos (DP) e o volume corpuscular médio (VCM), com resultado expresso em porcentagem, de tal modo que $RDW = DP/(VCM) \times 100$. Quando elevado na doença falciforme, pode indicar a presença de eritrócitos com morfologias distintas, isto é, drepanócitos ou células irreversivelmente falciformes (FAVA; CATTAZZO; HU; LIPPI *et al.*, 2019; THAME; GRANDISON; MASON; THOMPSON *et al.*, 1991). Condizente com as correlações encontradas por nós, um estudo com 1.121 pacientes com pacientes HbSS em “*steady state*” demonstrou que o parâmetro RDW estava negativamente correlacionado com os parâmetros de % de HbF, hemoglobina total, CHCM, e VCM, estando positivamente correlacionado com a contagem de reticulócitos. Adicionalmente, menores valores de RDW estavam associados com uma menor incidência de crises vaso-oclusivas e com a melhora clínica dos pacientes (THAME; GRANDISON; MASON; THOMPSON *et al.*, 1991). Em linha, um dos efeitos da hidroxiuréia é a redução do RDW (QUINN; NISS; DONG; PFEIFFER *et al.*, 2021), em concordância com nossos dados, uma vez que dos 31 pacientes avaliados em nosso estudo, apenas 02 não estavam em uso de HU.

Também obtivemos uma alta correlação ($r=0,7917$ Pearson, One-tailed; Pval: $<0,0001$) quando comparamos o método derivado do Spike-In ($cHbF > 10pg$) com o método de quantificação de MCHbF (produto entre a fração de HbF, obtida por HPLC, e o HCM) em 18 amostras que tiveram o estudo da hemoglobina realizado por HPLC no mesmo dia da fixação para a realização da citometria. Após recalcularmos os valores médios de cHbF levando em conta a fração acetilada de HbF nestes pacientes, nossa correlação obtida passou para ($r= 0,8103$, Pearson One-tailed; Pval: $<0,0001$)

Após excluirmos 3 pacientes que haviam recebido transfusão recentemente (evidenciada pela presença elevada de HbA no HPLC), nosso valor de correlação permaneceu alto ($r=0,7977$, Pearson, One-tailed; Pval= 0.0002), indicando que mesmo em caso de pacientes com transfusão recente, nosso método foi capaz de correlacionar-se com o método padrão ouro de quantificação por HPLC, novamente, após recalcularmos os valores médios de cHbF levando em conta a fração acetilada de HbF nestes pacientes, nossa correlação obtida passou para ($r=0,8170$, Pearson, One-tailed; Pval: $0,0001$) (Dados podem ser visualizados no Anexo 6)

Entretanto, geramos os gráficos de Bland-Altman para avaliar a comparação entre os MCHbF derivados do HPLC e obtidos pela técnica de Spike-In nas amostras de pacientes, curiosamente o viés obtido da comparação inter-técnicas foi de (Bias= $9,027$; Desvio Padrão= $9,727$) para as amostras não recalculadas, e de (Bias= $9,405$; Desvio Padrão=

9.986) para as amostras recalculadas. Em linha, as amostras de pacientes com melhor correspondência entre os valores de MCHbF pré-calculados (pelos dados de HPLC e MCH) ou derivados pelo método de citometria quantitativa (com o Spike), tinham todas menos de 15% de HbF (determinado por HPLC), enquanto as outras amostras tiveram valores mais altos (chegando a ~30%), ou seja, a medida que os valores de MCHbF aumentavam, a discrepância entre as técnicas também (Figura pode ser encontrada no anexo 5). Para poder compreender a fonte desta variabilidade, excluímos 9 pacientes que possuíam maior MCHbF, curiosamente, o viés caiu para (Bias=0,8298; SD=3,243), deste modo, comparamos a marcação do controle Spike-In tanto nas amostras com baixo MCHbF e nas amostras com alto MCHbF (Anexo 6). Observamos que nas amostras com alto MCHbF o padrão de marcação do Spike-In foi heterogêneo quando comparado as amostras com baixo MCHbF, entretanto, essa diferença não foi estatística.

Essa discrepância, especialmente observada em amostras com maior MCHbF não havia sido observada nos dados obtidos das amostras de cordão umbilical e pode ser explicada por diferentes razões: 1- O HPLC utiliza sangue total para estimar o percentual (%) dos diferentes tipos de globinas presentes, de modo que a hemoglobina livre no plasma (resultante da hemólise in vitro, ou proveniente da hemólise intravascular) também é quantificada, uma vez que não é utilizado concentrado de hemácias para realização do método, portanto, questões logísticas de coleta de amostras dos pacientes e consequentemente envio ao laboratório, poderiam levar maior lise de células com alto teor de HbS, levando uma estimativa menor na área de quantificação da HbF, já que o mesmo quantifica a Hb livre no plasma. 2- Para a quantificação nas amostras de cordão umbilical utilizamos uma proporção de células com HbF positivas correspondente a 0,2% (o que considerando uma média de HbF de 80% nas amostras, levaria cerca de 16% de células positivas), diferentemente dos pacientes que tiveram 90% de células analisadas, e que estas apresentam distribuições de HbF heterocelulares. Todavia, a limitada quantidade de anticorpo utilizada em pacientes com alta quantidade de HbF na composição amostral de 90% poderia levar discrepâncias na distribuição da marcação e consequentemente na estimativa da mediana utilizada para os cálculos e comparações, resultando em valores de cHbF variáveis. Se este for o caso, o uso de quantidades maiores do anticorpo (ou um número menor de células por marcação) permitirão a correção do viés proporcional observado.

É importante ressaltar que o HPLC (%HbF) estimado de todas as amostras de cordão umbilical avaliadas aqui, devido a substituição, não é o mesmo equipamento que foi

utilizado para quantificação nas amostras de pacientes, e que os analisadores hematológicos também são distintos (Dados hematimétricos dos pacientes foram obtidos por meio da análise de prontuário, no mesmo dia da obtenção da amostra), este fator técnico também poderia justificar essa variância.

Diversos trabalhos já estabeleceram a associação entre HbF elevada e taxa reduzida de episódios vaso-oclusivos, bem como redução dos índices de mortalidade e morbidade em pacientes com doença falciforme, e a principal terapia farmacológica de indução de HbF, se dá pela Hidroxiuréia (HU). A terapia medicamentosa com HU, seja na dosagem fixa ou baixa dosagem com escalonamento gradativo, pode produzir níveis de HbF entre 10 a 25%, muitas das vezes, se assemelhando a condição de persistência de hemoglobina fetal (QUINN; NISS; DONG; PFEIFFER *et al.*, 2021; STEINBERG, 2020). Todavia, o padrão de distribuição de HbF entre os eritrócitos pode ser extremamente heterogêneo, variando de uma característica heterocelular, até um padrão de distribuição pancelular, isto pode ser exemplificado pela seguinte situação hipotética, uma condição com níveis aproximados de HbF estimado em 30%, pode, nos ensaios de citometria de fluxo produzir 100% de F-Cells com característica pancelular se cada célula conter 10pg de HbF, considerando uma concentração de hemoglobina corpuscular de 30pg/dL. Por outro lado, em outra situação hipotética com 30% de HbF total, poderia produzir uma distribuição heterocelular, onde cerca de 70% são F-Cells com quantidade de HbF acima de 10pg, enquanto os outros 30% contêm um nível muito baixo para gerar emissão de um sinal de fluorescência. Estudos de modelagem demonstraram que quando o conteúdo de HbF por célula é de 9 a 12pg, a polimerização de desoxiHbS seria evitada completamente em condições de saturação venosa e capilar entre 40 e 70% (MAIER-REDELSPERGER; NOGUCHI; DE MONTALEMBERT; RODGERS *et al.*, 1994; STEINBERG, 2020).

Finalmente, realizamos avaliação consecutiva de 7 pacientes, porém apenas 03 tiveram mais do que duas avaliações consecutivas, devido ao tempo de retorno ao ambulatório de hemoglobinopatias. No sentido de previsão de complicações, o método proposto por nós foi capaz de detectar piora clínica em 3 pacientes que tinham <40% de eritrócitos com cHbF>10pg/RBC, cujos índices hematimétricos e os níveis de F-Cell pelo método clássico se mantinham estáveis. A capacidade de prever os outros pacientes foi prejudicada, pois amostras anteriores ao evento não haviam sido armazenadas, citando o exemplo do paciente P75 que estava em crise vaso-oclusiva na primeira visita. Cabe ressaltar, que nosso método detectou também o aumento de HbF em caso de pacientes

que tiveram doses de HU aumentadas (2ª visita do paciente 75; e 2ª visita do paciente P39, respectivamente).

Também, separamos os pacientes em dois grupos, sendo eles: pacientes com hemoglobina >9 g/dL e pacientes com hemoglobina <9 g/dL para avaliar a especificidade e sensibilidade do método desenvolvido, bem como F-Cell Classico e F-Cell ST, para distinguir estes dois grupos de pacientes. Considerando as análises supracitadas acima, o método de Spike-In apresentou maior especificidade (88,9%) e sensibilidade (94,4%) para distinguir pacientes com Hb >9 e <9 , quando o valor de corte foi de $<65\%$ de eritrócitos protegidos. Obviamente, esse critério estabelecido para avaliar a sensibilidade vs especificidade foi para demonstrar a capacidade do método desenvolvido por nós em separar e estratificar o risco de pacientes em apresentarem manifestações clínicas decorrentes de vaso-oclusão, o que, quando aplicado em um contexto clínico permitiria a equipe médica intervir antes de um determinado desfecho, considerando a alta mortalidade e morbidade de pacientes convivendo com Doença Falciforme. Definimos esse critério arbitrário para separação de pacientes com base na dosagem de hemoglobina, pois os pacientes avaliados possuíam uma média de hemoglobina de 8,4 g/dL. Além disso, um trabalho randomizado em pacientes com Doença falciforme, considerando Hb <9 g/dL, quando receberam transfusão no pré-operatório, tiveram uma redução significativa de complicações clinicamente importantes, quando comparados aos pacientes com Hb <9 g/dL não transfundidos, além de diferentes recomendações utilizarem esse cutoff (HAN; HENSCH; TUBMAN, 2021; HOWARD; MALFROY; LLEWELYN; CHOO *et al.*, 2013).

Cabe ressaltar que nossa pretensão futura, não é estratificar os pacientes pelo nível de hemoglobina, mais sim, a capacidade do método desenvolvido prever a ocorrência de eventos vaso-oclusivos, em função do nível de eritrócitos protegidos. Considerando um estudo brasileiro recente, a prevalência de pelo menos um evento vaso-oclusivo (VOC) no período de um ano foi de cerca de 88%, com uma média de aproximadamente 4 crises, sendo que cerca de 45% dos pacientes apresentam entre 2 a 4 crises no ano, enquanto cerca de 12% apresentaram apenas um episódio (PINTO; ARAUJO; GUALANDRO; BUENO *et al.*, 2020). Com isto em vista, as avaliações dos pacientes a cada três meses, com nosso método quantitativo de citometria, seria suficiente para obter o perfil da distribuição do conteúdo de cHbF nos pacientes tanto antes como após os eventos vaso-oclusivos ao longo de um ano. Esta avaliação permitiria traçar a dinâmica do padrão de

expressão de HbF na população de eritrócitos dos pacientes, de forma a identificar padrões preditivos.

6.1 Discussão suplementar

6.2 Etapas de validação- Controle de qualidade e seus interferentes

No que se refere a testes laboratoriais, as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica são as três fases da prática laboratorial que influenciam de maneira direta ou indiretamente a qualidade e a precisão de um determinado teste laboratorial, aqui, retrataremos potenciais fontes de erro que podem comprometer o resultado do método de Spike desenvolvido. Especialmente, a fase pré-analítica envolve os processos que compreendem desde a solicitação médica, coleta, preparação, particularidades biológicas, nutricionais, emocionais do paciente, coleta e transporte de amostra, preparação e armazenamento de material biológico, podendo corresponder até 70% de erro laboratorial (SONMEZ; YILDIZ; AKKAYA; TANELI, 2020).

As principais fontes de erro relacionado a etapa pré-analítica, são decorrentes da coleta de material biológico, muito se sabe que e estase venosa devido á aplicação prolongada de torniquete, ou decorrente de agitação de paciente, especialmente, em casos pediátricos, coletas de difícil acesso, incluindo, calibres de agulhas hipodérmicas impróprios, adjuntos a práticas inadequadas de dispensação de material biológico, pode não só alterar a concentração e atividade de certos analitos como promover destruição celular especialmente, no que se trata a série vermelha do sangue, sendo assim, a hemólise é a interferência pré-analítica mais comum e representa um desafio devido o comprometimento em diversos testes laboratoriais. (LIPPI; BLANCKAERT; BONINI; GREEN *et al.*, 2008; WAN AZMAN; OMAR; KOON; TUAN ISMAIL, 2019). Como discutido anteriormente, o papel da hemólise em testes hematológicos de rotina, pode ocasionar uma discrepância em índices hematimétricos. Considerando nosso teste desenvolvido aqui, a hemólise poderia ser um fator importante a se considerar, uma vez que células com HbSS e células irreversivelmente falciformes, predominantemente, tem uma tendência a maior de lise do que células com HbF, o que resultaria em um enriquecimento de F-Cells em relação a amostragem total. Outro fator associado, é em decorrência de que amostras envelhecidas e com altas taxas de hemólise contêm mais detritos celulares, provenientes da destruição celular, embora, este não seja um fator diretamente impactante no resultado, a presença de células apoptóticas em amostras

adquiridas por citometria de fluxo, podem representar um desafio para segmentação e definição de gates, devido ao fato de se apresentarem dispersas entre populações expressas tanto em FSC quanto SSC, portanto serem confundidas com eritrócitos sem HbF. Facilmente, este fator poderia ser corrigido por meio de lavagens adicionais em baixa centrifugação para que os detritos fiquem na camada do sobrenadante e possam ser eficientemente removidos, além de uma boa estratégia de gate visando a formação de debris e agregados celulares, como foi adotada por nós, aqui.

Outro fator impactante, é a correta e frequente homogeneização da amostra teste, pois, eritrócitos, são células naturalmente carregadas e apresentam uma rápida sedimentação em decorrência da presença de moléculas com característica negativa presentes na membrana celular eritróide em condições fisiológicas (ALENDE-CASTRO; ALONSO-SAMPEDRO; VAZQUEZ-TEMPRANO; TUNEZ *et al.*, 2019) e podem sedimentar mais rápido em condições associadas a inflamação crônica ou na presença de HbS, já que as hemácias falciformes, além de maior rigidez, possuem maior densidade (BARTOLUCCI; BRUGNARA; TEIXEIRA-PINTO; PISSARD *et al.*, 2012; DAMANHOURI; JARULLAH; MAROUF; HINDAWI *et al.*, 2015). Especialmente, quando uma amostra de sangue total proveniente de um paciente com HbSS é centrifugada em gradiente de densidade, quatro frações celulares podem ser obtidas. A primeira fração corresponde a eritrócitos jovens e reticulócitos, essas células possuem um volume corpuscular maior, e baixo CHCM. Na terceira fração, encontram-se eritrócitos mais senescentes, com alterações de formato, e com HCM elevado. Na quarta fração, situam-se eritrócitos senescentes, de formato rígido, densidade superior, e células falciformes irreversíveis, com baixo VCM e alto CHCM. (KAUL; FINNEGAN; BARABINO, 2009). Alguns trabalhos já abordaram a diferença entre frações de eritrócitos em pacientes com diferentes concentrações de HbF e de maneira esperada, os níveis de HbF diminuem a medida que a fração de células mais densas aumenta (BERTLES; MILNER, 1968; HORIUCHI; STEPHENS; ADACHI; ASAKURA *et al.*, 1993), portanto, para evitar predomínio de apenas uma fração durante os teste é recomendável a homogeneização delicada e constante, anteriormente a pipetagem.

Outro fator de extrema importância, entre a fase pré-analítica e analítica, é referente ao cuidado com o preparo de soluções utilizadas para lavagem e principalmente marcação, dentro deste contexto, o tampão mais utilizado para preparação e a solução salina tamponada com fosfato (PBS), basicamente composta por cloreto de sódio, fosfato de sódio, podendo ou não, conter cloreto e/ou fosfato de potássio em sua formulação. Os

eritrócitos em situações fisiológicas são células muito susceptíveis a variações osmóticas, portanto, quaisquer variações na composição e concentração iônica podem levar a lise celular. Hemácias falciformes quando lavadas exclusivamente com PBS na ausência de glicose, podem sofrer alterações estruturais eritrocíticas, consequentemente hemólise (KLARL; LANG; KEMPE; NIEMOELLER *et al.*, 2006), da mesma maneira, soluções com cloreto de cálcio, levam à ativação do canal de Gardos, uma espécie de transportador seletivo de potássio dependente de Ca^{2+} que é hiperexpresso em eritrócitos falciformes cujo o papel central se dá por meio da desidratação seguida de falcização, resultado em aberrações morfológicas e hemólise, especialmente em amostras com maiores concentrações de HbS (FOLLER; LANG, 2020; RAPETTI-MAUSS; LACOSTE; PICARD; GUITTON *et al.*, 2015).

Não obstante que apenas alterações celulares ocorram em decorrência dos tampões de lavagem utilizados, os valores de intensidade mediana de fluorescência podem também ser dependentes de soluções utilizadas durante preparação, armazenamento e aquisição da amostra, em virtude da influência de íons H^+ livres sobre a cinética da ligação anticorpo-epítipo afetando diretamente a emissão de fluorescência pelo anticorpo. (SEDEK; FLORES-MONTERO; VAN DER SLUIJS; KULIS *et al.*, 2022)

Por sua vez, a fase analítica é referente a eventos que ocorrem durante a execução propriamente dita, dos testes em questão, é estimado que apenas 7 a 13% dos erros laboratoriais sejam decorrentes nesta fase, sendo este baixo número de erros devido à implantação de tecnologias laboratoriais e programa de controle de qualidades envolvidos. (IQBAL; TABASSUM; ARBAEEN; QASEM *et al.*, 2023) O teste desenvolvido por nós não é automatizado, portanto, pontuaremos algumas questões envolvidas nesta fase que impactariam em resultado final.

A fixação de células é o primeiro passo crítico para garantir a preservação e integridade das células que serão submetidas a outros processos químicos de permeabilização para execução finalmente a marcação e aquisição dos dados de citometria de fluxo. Dos fixadores químicos comumente usados, produtos derivados de aldeído, como paraformaldeído e glutaraldeído, atuam por meio de criação de ligações cruzadas entre proteínas intracelulares vizinhas, formando uma espécie de crosslink entre outras biomoléculas adjacentes (ICHIKAWA; WANG; MIYAZAWA; MIYATA *et al.*, 2022). Durante o processo de fixação as proteínas da membrana celular podem mover-se e formar artefatos com outras células do tipo pseudo-clusters ou duplos agregados o que

dificulta posteriormente, a permeabilização e a aquisição dos dados. Um outro fator determinante da fixação, é o tempo adjunto a concentração da solução fixadora vai permanecer em contato com as células, alguns trabalhos já demonstraram que amostras com fixação prolongada apresentavam alterações quantitativas e de sinal de fluorescência em determinados antígenos (CHUNG; SONG; YLAYA; SEARS *et al.*, 2018; KAI; YODA; KAWAGUCHI; MINESAKI *et al.*, 2019). Isso pode ser decorrente do aumento de ligações de crosslink induzidas em função do tempo prolongado. A exposição a agentes fixadores, pode limitar o processo de permeabilização subsequente e afetar o acesso de anticorpos que se ligam a componentes intracelulares (GOLDSTEIN; HEWITT; TAYLOR; YAZIJI *et al.*, 2007; SHEPHERD; THELWALL; STANISZ; BLACKBAND, 2009; ZENG; YANG; HUANG; CHEN *et al.*, 2013).

Soluções de permeabilização também causam um efeito direto sobre a marcação intracelular, diferentes agentes com propriedades físico-químicas distintas, e fatores de concentração, temperatura e tempo de exposição e quantidade de células podem ser determinantes (AMIDZADEH; BEHBAHANI; ERFANI; SHARIFZADEH *et al.*, 2014). Células que não foram eficientemente fixadas podem sofrer lise durante a etapa de permeabilização, resultando no aparecimento de debris celulares com baixo tamanho e complexidade nos eventos adquiridos por citometria de fluxo, o mesmo é válido para células cuja etapa de homogeneização não foi realizada adequadamente e pode resultar em células com maior intensidade de fluorescência em virtude da permeabilização mais eficiente em algumas células do que em outras. Um outro fator crucial para manter a precisão e a consistência dos resultados experimentais, sejam eles decorrentes de fixação, permeabilização ou marcação, são as boas práticas de pipetagem, especialmente no que se refere a aspiração de líquidos, aspiração muito rápida pode ocasionar bolhas dentro da ponta e levar a dispensação inadequada, o mesmo é visto para soluções com alta viscosidade como agentes fixadores e permeabilizadores, cuja imersão da ponta completa na solução leva consideráveis erros de volume, podendo resultar em amostras com maiores intensidades de fluorescência (PUSHPARAJ, 2020).

Anteriormente a marcação, uma etapa de saturação é requerida para minimizar os antígenos expostos durante o processo de permeabilização, evitando a marcação inespecífica e minimizando anticorpos não ligados. No entanto, soluções de saturação em alta concentração podem extinguir completamente o sinal de fluorescência e impedir a detecção completa de determinados fluoróforos (CHAPPLE; JOHNSON; DAVIDSON, 1990).

No que se refere aquisição e configurações de voltagem para aquisição das amostras por citometria de fluxo, é importante ressaltar que tanto o parametro de FSC e SSC devem ser configurados para que todas as células de interesse, estejam dispostas no gráfico, caso contrário, se torna difícil para remoção de detritos e posteriormente exclusão de aglomerados celulares. Adicionalmente, a configuração de voltagem deve respeitar o padrão de distribuição de fluorescência, evitando a saturação dos detectores, o mesmo deve ser válido para questões de compensação aplicadas. A compensação deve corrigir o transbordamento de fluorescência em todos os detectores, exceto aquele dedicado a medição da fluorescência de um determinado fluoróforo, e erros na compensação podem levar uma estimativa errônea na separação de populações fracamente positivas de populações negativas impactando diretamente na frequência e aquisição dos eventos relacionados a amostra, correspondentemente. (ROEDERER, 2002)

Considerando a possibilidade de aplicação de diferentes moléculas com padrões de fluorescência distintos, deve-se considerar os espectros de emissão, uma vez que a fluorescência de determinados corantes pode coincidir com o padrão de excitação e emissão de outros, ocasionando uma superposição, exemplificado pelo uso de FITC e PE (Spike-In CFSE, FITC) e marcação de anti-HbF, PE), este é um fator que pode ser corrigido parcialmente pela compensação, entretanto, deve ser considerado antes da realização dos experimentos

Finalmente, a etapa pós analítica, é a fase final do trabalho laboratorial, nela, os resultados são avaliados até serem divulgados, e corresponde a fase com menores taxas de erros (LENICEK KRLEZA; HONOVIC; VLASIC TANASKOVIC; PODOLAR *et al.*, 2019). A automatização da análise dos dados de citometria de fluxo provenientes do software Flowjo, minimiza o viés causado por cada análise de maneira individual, o que permite, dentro do próprio programa, criação de grupos de amostras, aplicação de configurações compartilhadas e a geração de gráficos simultaneamente. Neste sentido, devemos ressaltar que o fato de cada amostra teste necessitar de uma equação de regressão linear específica afim de converter a intensidade mediana de fluorescência do HbF PE em conteúdo corpuscular de HbF, pode ser um fator susceptível a erro.

6.2.1 Processo de validação

Todo teste laboratorial, antes de ser implementado, requer uma etapa intensa de validação, isto é necessário para fornecimento de evidências objetivas de que as especificações do produto desenvolvido, atende especificações de uso, além disto, o

método de validação busca conhecer todas as variáveis envolvidas, e otimizar o desempenho do ensaio para fornecer uma estrutura de como interpretar corretamente os dados. A precisão intra-ensaio pode ser obtida por meio da repetibilidade que envolve avaliar uma mesma amostra diversas vezes em uma corrida analítica para finalmente estimar seu coeficiente de variação entre corridas é estimado que o critério de aceitabilidade de CV em um ensaio de precisão seja de 10-25%, sendo valores de 30 % a 35% toleráveis (LEE; DEVANARAYAN; BARRETT; WEINER *et al.*, 2006)

Junto com a precisão, a estimativa de linearidade também pode ser obtida para ensaios quantitativos. A precisão reflete quão é a concordância entre o resultado medido se aproxima de um valor real verdadeiro, diferentemente dos ensaios tradicionais de citometria de fluxo, onde a obtenção de dados é semiquantitativa em função do resultado ser proporcional á amostra e suas variáveis, e não, sendo gerado decorrente de um calibrador ou material de referência. Nosso método utiliza um controle endógeno sabidamente conhecido, portanto, podemos estimar a precisão em um grupo maior de amostras conhecidas para HbF

Dentro das abordagens por citometria de fluxo, a especificidade analítica é traduzida na capacidade de estratificar o quão bem o ensaio é capaz de identificar e medir uma população celular, entre outras que possam estar presentes em uma determinada amostra, ou o quanto a detecção de um determinado antígeno pode ser influenciada por questões experimentais ou de reatividade cruzada.

A sensibilidade é um outro parâmetro que pode ser inferido, por meio da capacidade da precisão e exatidão na detecção de eventos raros ou antígenos fracamente expressos, isso pode ser evidenciado por exemplo, pela capacidade de distinção entre células com nenhuma ou pouca HbF, fato que pelos métodos tradicionais de citometria, é impossível em virtude do deslocamento ocasionado pelos processos inerentes a marcação. Conhecer exatamente os valores mínimos que um método pode quantificar e valores abaixo do limite mínimo, pode ser um desafio em virtude do padrão heterogêneo de células com HbF e da dificuldade em obtenção de amostras com baixíssimos níveis, sendo o mesmo válido para amostras com altíssimos níveis.

Devemos também considerar a estabilidade do produto de Spike-In, uma vez que embora as células do produto estejam devidamente fixadas, fatores de temperatura, armazenamento, exposição luminosa, e transporte, podem comprometer a quantificação de HbF em amostras. Portanto, conhecer o produto em um longo estudo longitudinal

permitiria a exata compreensão da estabilidade e dos valores aceitáveis de variação em diferentes lotes de Spike, ou ainda, em lotes envelhecidos.

6.2.1 Efeito das modificações pós-translacionais sobre a quantificação da HbF pelos diferentes métodos e implicações para este estudo

A força de interação do tetrâmero da hemoglobina fetal (HbF) é cerca de 70 vezes maior que a da hemoglobina adulta (HbA), o que se deve aos efeitos alostéricos mediados pelo resíduo de glicina (Gly, G) na posição N-terminal da cadeia da γ -globina (codificada pelos genes HBG1 ou HBG2), em contraste com a valina (Val, V) presente na posição N-terminal da cadeia da β -globina (codificada por HBB) da HbA. Importaneamente, a acetilação da Gly-1 da γ -globina na HbF, a qual resulta na variante translacional conhecida como HbF₍₁₎ (ou Acetil-F), modula a força das interações entre as subunidades que compõe o tetrâmero da hemoglobina, aumentando cerca de 30 vezes a dissociação de HbF₍₁₎, em comparação com HbF. Mais especificamente, a acetilação da Gly-1 faz com que a HbF₍₁₎ se comporte como a HbA, no que se refere às propriedades de associação tetrâmero-dímero moduladas pelas alterações fisiológicas de pH, que ocorrem ao longo do transito das hemácias entre o sangue arterial oxigenado e o sangue venoso hipóxico dos capilares (DUMOULIN; MANNING; JENKINS; WINSLOW *et al.*, 1997; MANNING; MANNING, 2001)

Adicionalmente, a acetilação de Gly-1 na HbF₁ reduz sua ligação com o regulador alostérico 2,3-DPG (o qual se liga a um sítio entre as duas cadeias β) a ponto de torna-la irresponsiva a esse modulador, de forma que a afinidade de HbF₁ pelo oxigênio na presença de DPG seria maior que a da HbF (BUNN; BRIEHL, 1970)

Digno de nota, a acetilação de três resíduos no sítio de ligação com o DPG na cadeia β mutada da HbS, incluindo a valina n-terminal (Val-1), pelo agente Methyl Acetyl Phosphate, aumenta a afinidade pelo oxigênio; portanto, atua reduzindo a falcização (BUNN; BRIEHL, 1970; UENO; BENJAMIN; MANNING, 1987; UENO; MANNING, 1988; UENO; YATCO; BENJAMIN; MANNING, 1992)

O enfraquecimento gradativo da estrutura tetramérica da HbF, em decorrência de sua lenta acetilação ao longo do desenvolvimento poderia contribuir facilitando a transição para a formação de tetrâmeros de HbA, que não é (ASHIUCHI; YAGAMI; WILLEY; PADOVAN *et al.*, 2005; MANNING; MANNING; DUMOULIN; PADOVAN *et al.*, 2020). No entanto, não é claro se os níveis de HbF₁ diminuem ou aumentam ao longo da gestação (UENO; YATCO; BENJAMIN; MANNING, 1992). Métodos melhorados

podem vir a permitir uma melhor quantificação destas variantes. (DUPONT; GAGNON; ARDILOUZE; AURAY-BLAIS, 2011), Digno de nota, os níveis de HbF₁ aparentemente não são afetados pela concentração de glicose, temperatura e/ou armazenamento das amostras (DAVISON; GREEN; ROBERTS, 2008)

Como notado por outros, enquanto o método baseado na resistência à desnaturação alcalina resulta na quantificação de toda a HbF, no método de HPLC a fração acetilada da HbF (ou HbF₁) é eluída antes da fração principal de HbF, sendo em geral desconsiderada, o que resulta em um valor significativamente inferior. Embora isso possa não ser clinicamente relevante, isto tem implicações importantes nas análises comparativas dos métodos discutidos por nós (MOSCA; PALEARI; LEONE; IVALDI, 2009)

7 Conclusão

Em suma, os resultados deste estudo demonstram a validade do método de Spike-In na avaliação da distribuição de hemoglobina fetal (cHbF) nas células vermelhas do sangue, com correlações significativas entre os valores derivados por nosso método de Spike-In desenvolvido quando comparados aos valores pré-calculados obtidos pelo padrão ouro por HPLC. Além disso, conseguimos determinar um cutoff levando em conta a concentração protetiva de HbF de >10 pg nos eritrócitos, indicando o potencial clínico deste último como um marcador prognóstico para pacientes com doença falciforme. Particularmente, acreditamos que um estudo clínico e longitudinal poderia auxiliar na identificação de indivíduos com DF que apresentem alto risco de desenvolvimento de complicações com base no percentual de glóbulos vermelhos protegidos, isto é (cHbF>10PG). A capacidade única do método de Spike em distinguir diferentes padrões de distribuição de cHbF entre as células vermelhas ressalta sua utilidade na compreensão mais aprofundada da fisiopatologia da DF. É importante ressaltar que nossa abordagem proposta aqui, além de simplificada, apresenta um baixo custo e poderia ser utilizada como um marcador preditivo de risco clínico, estratificação de pacientes e a orientação de intervenções terapêuticas precoces, com potencial impacto significativo na gestão e no prognóstico da doença falciforme. Além disso, os achados deste estudo também apontam para possíveis futuras aplicações nos casos de terapias de edição genética que visam a inibição dos repressores transcricionais da HbF.

8 Informações Suplementares - Citometria de Fluxo

8.1 Seleção de amostras de SCU

Dado a dificuldade de obtenção de amostras de indivíduos com HPPH, o sangue do cordão umbilical expressa homogeneamente níveis muito elevados de HbF, exibindo uma distribuição gaussiana normal, que diminuem até seis meses de vida pós-natal (HORIUCHI; OSTERHOUT; KAMMA; BEKOE *et al.*, 1995; NAVENOT; MERGHOUB; DUCROCQ; MULLER *et al.*, 1998; ONEAL; GANTT; SCHWARTZ; BHANU *et al.*, 2006), dado a alta expressão de HbF optamos por sua utilização.

Para obtermos a fração de hemoglobinas presentes na amostra, realizamos em parceria com o Laboratório de Anemias Hereditárias, coordenado pela Sra. Ana Paula Rocha Diniz Zanelli a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) em apenas 15 amostras de cordão umbilical, enquanto os dados hematimétricos da amostra foram obtidos por contagem automatizada pelo equipamento Sysmex KX21N antes e após o descongelamento (Tabela S1 e S2). As demais amostras de SCU não foram avaliadas por possuírem pouco volume restante.

Tabela suplementar 1. Quantificação de hemoglobinas via HPLC em diferentes amostras de cordão umbilical.

Amostra	Quantidade de HbF%	HbA	Hemoglobina Variante
1	74	22,1	Não
2	73,3	11,8	HbS
3	80,2	15,6	Não
4	71,6	23,1	Não
5	64,9	24,8	Não
6	74,2	11,3	Não
7	70,8	18,1	Não
8	64	25,7	Não
9	57,5	34,4	Não
10	73,2	16,8	Não
11	66,7	17,8	Não
12	59,6	27,3	Não
13	60,7	12,5	HbS
14	52,8	33	Não
15	60	27,7	Não

As amostras de SCU foram coletadas logo após ao nascimento e enviadas ao laboratório de Imunohematologia da Fundação Hemocentro para serem tipadas. O TCLE foi coletado e a sobra remanescente dos tubos coletados foi fornecida. A quantificação cromatográfica foi realizada pelo equipamento Trinity Biotech Premier Resolution, 2.0.4.5.

Tabela suplementar 2. Dados hematimétricos obtidos das amostras de cordão umbilical.

Amostra	Eritrócitos x10 ³	Hb (g/dL)	HT%	VCM(fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
1	5.54	13.1	42	118.6	37	31.2
2	4.01	13.3	42	104	33.2	31.7
3	3.85	13.6	42.6	110.6	35.3	31.9
4	2.93	10.6	34.7	118.4	36.2	30.5
5	4.30	15.5	48.7	113.7	36	31.8
6	4.61	16.1	52.6	114.1	34.9	30.6
7	1.90	6.7	20.5	107.9	35.3	32.7
8	2.22	7	21.7	97.7	31.5	32.3
9	1.62	5.4	17.4	107.4	33.3	31
10	3.65	13.3	40.4	110.7	36.4	32.9
11	5.11	17.8	54.5	106.7	34.8	32.7
12	4.53	15	49.3	108.8	33.1	30.4
13	5.15	18.3	57.3	111.3	35.5	31.9
14	3.82	14.7	45	117.8	38.5	32.7
15	3.86	14.2	45.6	118.1	36.8	31.1

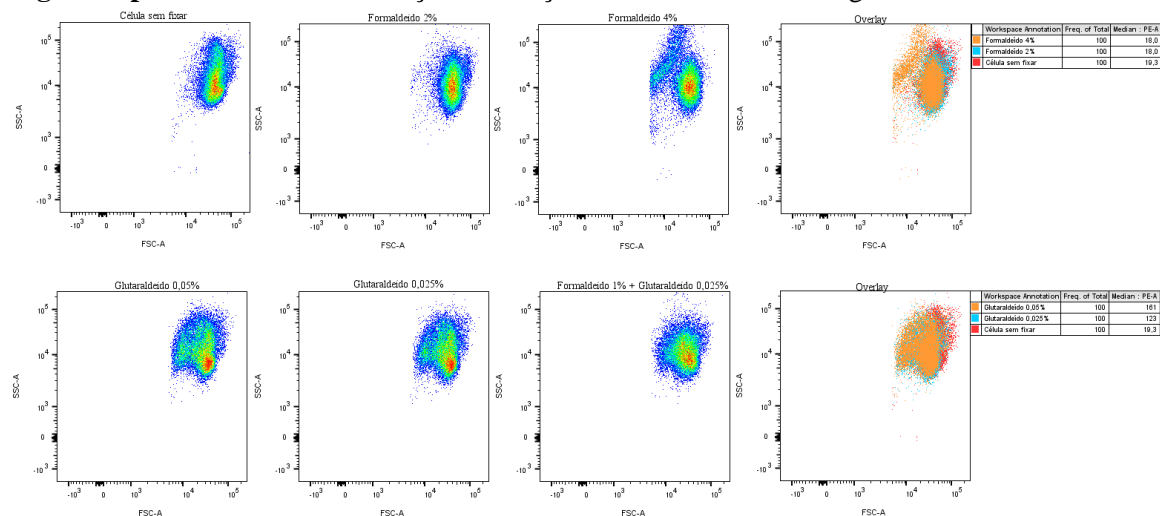
Cada amostra de SCU, cerca de 70 uL de sangue total foi avaliado via contador automatizado Sysmex, modelo KX21N. Hb: Hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Para evitar lesões de armazenamento, e hemólise das células de SCU enquanto padronizávamos os testes de fixação e permeabilização, as amostras foram submetidas a um protocolo de glicerolização descrito previamente por Rogers (2018) (ROGERS; DOSIER; MCMAHON; ZHU *et al.*, 2018) e desglicerolizadas quando necessário.

Embora protocolos de fixação e permeabilização de eritrócitos para ensaios de avaliação de HbF tenham sido muito bem descritos, curiosamente, as amostras de SCU apresentam maior sensibilidade a fixação. Quando ao fixar 5×10^6 células, em Formoldeído 1% a contagem final de células após o procedimento de fixação seguido de lavagens, era de 2×10^3 . Sendo uma perda significativa, que afetaria a execução dos experimentos, a padronização de fixação foi realizada considerando células SCU. Protocolos descritos previamente na literatura (CHOW; HEDLEY; GROM; MAGARI *et al.*, 2005; EERNSTMAN; VELDHUISEN; LIGTHART; VON LINDERN *et al.*, 2021; LU; FENG; PARK; VIDA *et al.*, 2008; MUNDEE; BIGELOW; DAVIS; PORTER, 2000) foram avaliados, e por esta razão os seguintes fixadores foram escolhidos para avaliação: glutaraldeído 0,025% (G 0,025%), glutaraldeído 0,05% (G 0,05%), formaldeído 1% com adição de glutaraldeído 0,025% (F+G), Formaldeído 2% (F 2%), formaldeído 4% (F 4%). O tempo de fixação variou de 10 minutos para fixação em glutaraldeído, e 15 minutos para fixação em formaldeído e o volume de 1 mL foi mantido para todos os casos, considerando a fixação em 1×10^6 eritrócitos de cordão umbilical por condição experimental. Após o tempo, as amostras foram lavadas por duas vezes com

2 mL de PBS 1 x e o sobrenadante descartado. Para avaliar efeitos dos fixadores na morfologia e complexidade celular, fato que impacta diretamente nos ensaios de fixação em placa, as amostras foram adquiridas na citometria para obtenção de dados de FCS-A e SSC-A. (Figura S1)

Figura suplementar 1. Padronização da fixação utilizando diferentes agentes fixadores.



Dados de citometria de fluxo demonstrando FSC-A em relação ao SSC-A de amostras fixadas com diferentes agentes. Dados obtidos por meio do software FlowJo.

Para determinar a eficiência da fixação em células SCU, foi adicionado 1mL de água destilada seguida de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. A adição de água deionizada causa um choque hipotônico o que leva a hemólise em células não fixadas (LI; TAO; LIU; LU *et al.*, 2018). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, em 1500 xg e o sobrenadante armazenado para determinação de hemoglobina livre, em parceria com o Laboratório de Controle de Qualidade do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Um mL de sobrenadante foi adicionado a cubetas limpas e a leitura por espectrofotometria foi realizada nos seguintes comprimentos de onda: 380nm, 415nm, 450nm, como estabelecido no método de Harboe, para a quantificação de hemoglobina livre em mg/dL. O método de Harboe é o padrão ouro para identificação de hemoglobina livre no sobrenadante, sendo capaz de identificar baixos limites de detecção por intermédio de leitura em três comprimentos de onda. Após a estimativa de absorbância a seguinte fórmula é aplicada:

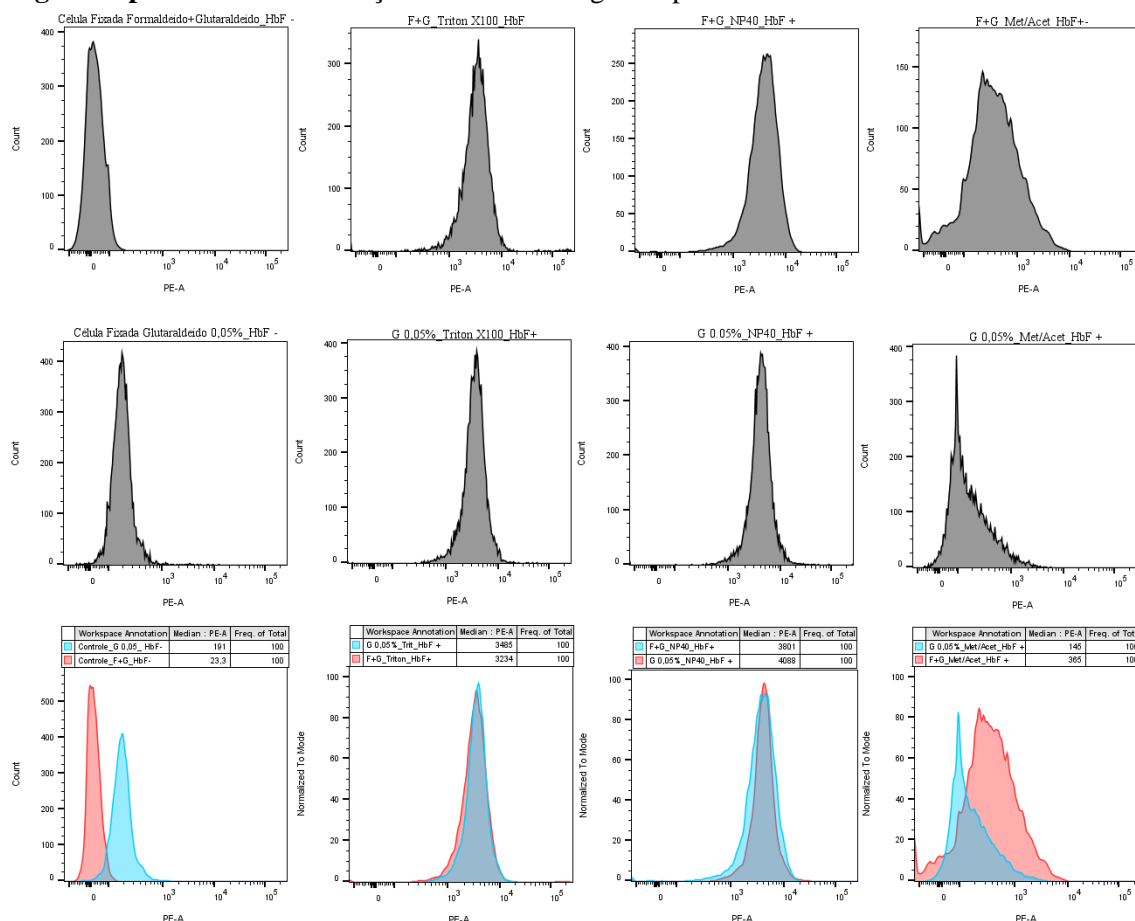
$$(1,68 \times A_{415}) - (84 \times A_{380}) - (84 \times A_{450}) = \text{Hemoglobina livre (mg/dL)}$$

Tabela suplementar 3. Avaliação da eficácia da fixação e detecção de hemoglobina livre.

Condição	380nM	415nM	450nM	Hb Total (mg/dL)
Célula sem fixação+H ₂ O	0,151	0,616	0,096	8,17
Formaldeído 2%	0,168	0,642	0,108	8,43
Formaldeído 4%	0,128	0,441	0,079	5,64
Formaldeído 1% e Glutaraldeído 0,025%	0,057	0,057	0,054	0,03
Glutaraldeído 0,05%	0,047	0,041	0,079	-0,06
Glutaraldeído 0,025%	0,041	0,039	0,03	0,03

As células fixadas como descrito anteriormente, foram incubadas com água destilada e o sobrenadante avaliado por espectrofotometria considerando os seguintes comprimentos de onda: 380nM, 415nM; 150nM.

Como pode ser visto na Figura S1 e na Tabela S1, a utilização de formaldeído em concentrações de 2 e 4% embora afetasse menos as células nos gráficos de tamanho e complexidade, evidenciados pelos experimentos de citometria, após adição de água destilada, as amostras foram hemolisadas, significando a falha do processo de fixação. Em comparação com a fixação utilizando glutaraldeído, as alterações provenientes nos gráficos de SSC e FCS são decorrentes do vazamento de K⁺, o que desencadeia a desidratação celular alterando seu tamanho (VASSAR; HARDY; BROOKS; HAGENBERGER *et al.*, 1972). Dado que a fixação utilizando formol 1% com adição de glutaraldeído 0,025 %, ou fixação única de glutaraldeído 0,05% apresentaram baixos níveis de hemólise, optamos por realizar um teste de permeabilização, nestas duas condições de fixação, já que os processos fixativos causam um crosslink entre biomoléculas celulares e pode afetar diretamente a permeabilização (HOBRO; SMITH, 2017). Dado que as condições de fixação utilizando formaldeído acrescido de glutaraldeído, e glutaraldeído 0,05% apresentaram melhor ação, foi performado um teste utilizando diferentes agentes permeabilizantes e a capacidade de permeabilização foi avaliada por meio da marcação com anti-HbF (Figura S2).

Figura suplementar 2. Avaliação de diferentes agentes permeabilizantes

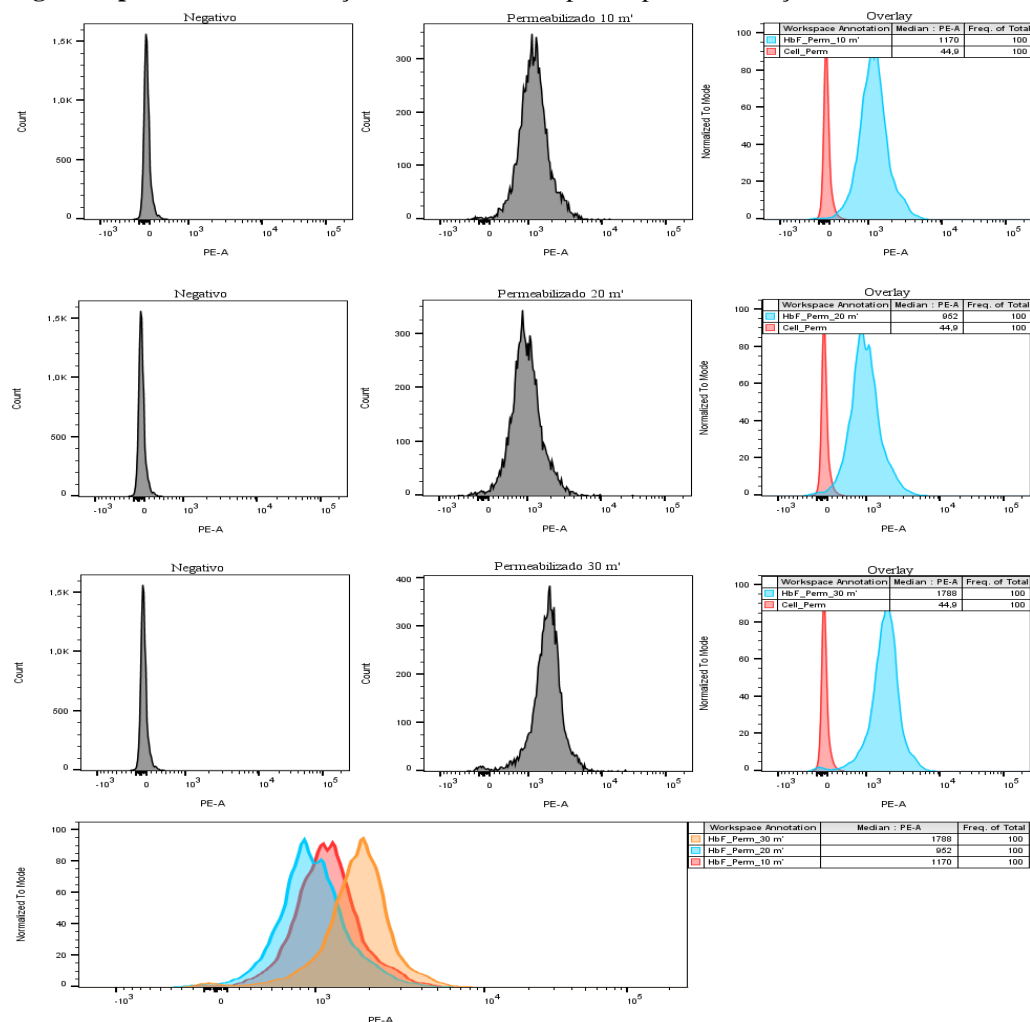
Células fixadas com glutaraldeído 0,05% ou glutaraldeído 0,025% acrescido de formaldeído 1% e foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1%, NP40 0,05%, ou Metanol/Acetona, e marcadas com anti-HbF. A primeira coluna à esquerda (Negativo) corresponde a células somente fixadas. As demais colunas correspondem às condições fixadas e permeabilizadas, sem a adição do anti-HbF e/ou com a marcação do anti-HbF. A última coluna à direita apresenta a sobreposição dos histogramas obtidos pela marcação com anti-HbF nas três condições de permeabilização testadas. A última linha abaixo apresenta a sobreposição dos histogramas comparando a marcação obtida com os dois métodos de fixação testadas (com a mesma permeabilização).

Para permeabilização utilizando Triton X-100 0,1% e NP40 0,05%, ambos reagentes foram adicionados em 10mL de PBS BSA 0,1% e mantidos em freezer até a permeabilização. 1mL da solução de permeabilização foi adicionada simultaneamente em amostras de sangue de cordão umbilical contendo 1×10^6 células já fixadas e incubados durante 20 minutos em temperatura ambiente. Para permeabilização utilizando Metanol-Acetona, de acordo com protocolos da literatura uma proporção de $\frac{1}{4}$ de metanol-acetona foi preparada e mantido em freezer -20°C até o momento da permeabilização. Após adição de 1mL da preparação, as células permaneceram em incubação durante 2 minutos e foram lavadas em PBS 1x. Para comparar a intensidade de fluorescência de amostras permeabilizadas e marcadas com anti-HbF, a permeabilização foi realizada em duplicata onde um tubo não teve adição de anti-HbF, e o outro tubo teve 2 μL de anti-HbF

adicionado. A sobreposição de amostras fixadas com F+G ou G considerando diferentes reagentes de permeabilização não foi alterada (demonstrada no quadrante inferior da imagem). Como pode ser visto nos histogramas na primeira coluna à esquerda da figura (Negativo), comparando células não fixadas (Vermelho) com aquelas somente fixadas (Azul), embora a fixação com glutaraldeído a 0,05% tenha apresentado uma pequena autofluorescência no canal de aquisição PE-HbF, a mesma pode ser minimizada a níveis desprezíveis com a realização de lavagens adicionais (3 a 4) em PBS. Por questões de praticidade, optamos pela fixação utilizando apenas glutaraldeído 0,05%.

Levando em conta, a avaliação dos agentes permeabilizantes em questão, embora a permeabilização utilizando NP40 resulte numa intensidade de fluorescência levemente superior, por questões de maior disponibilidade e acessibilidade, foi optado a utilização de TritonX-100 0,1%. Os protocolos na literatura recomendam o tempo de permeabilização com Triton x-100 variando de 5 a 30 minutos. Para otimizar o tempo do experimento, avaliamos a permeabilização com Triton X-100 em 10, 20 e 30 minutos respectivamente (Figura S3).

Figura suplementar 3. Avaliação de diferentes tempos de permeabilização com Triton x-100.



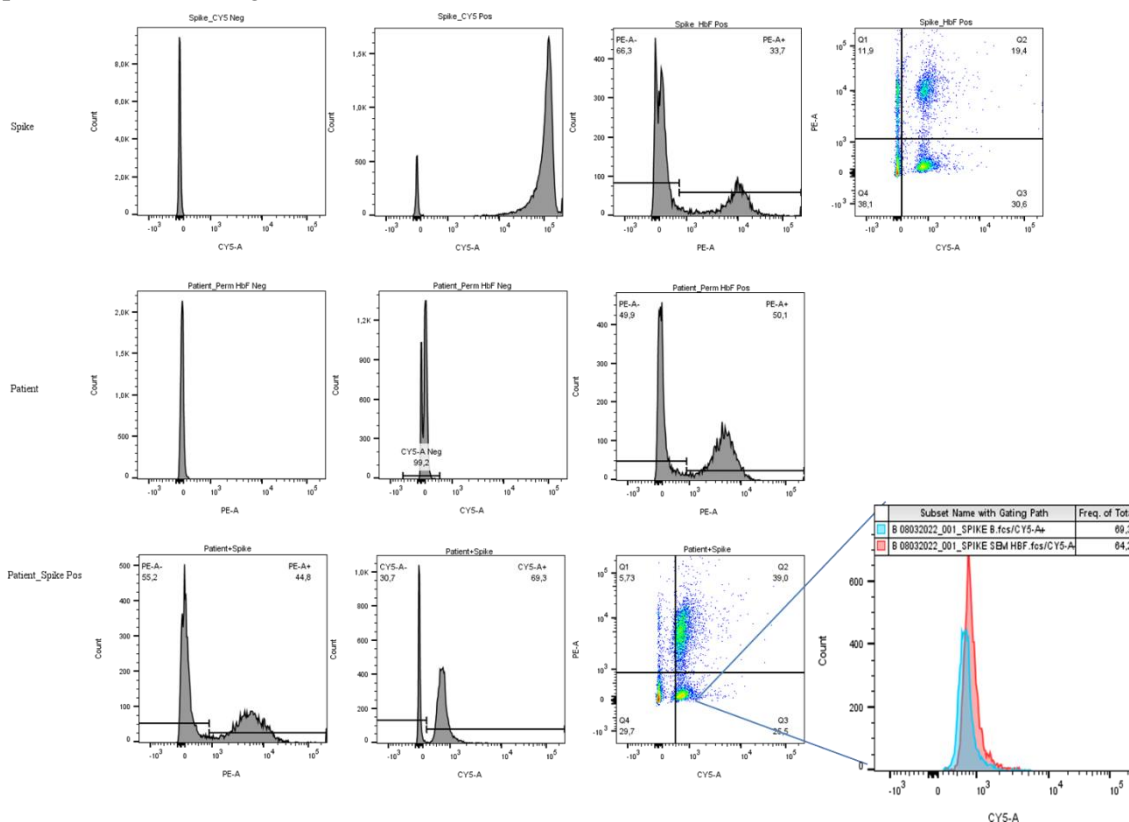
Um total de 1×10^6 células de cordão umbilical foram fixadas em glutaraldeído 0,05% e permeabilizadas com Triton X-100 em função do tempo, considerando, 10, 20 e 30 minutos, após isso foram marcadas com anti-HbF. Dados obtidos por meio do software FlowJo.

O número de eventos adquiridos na amostra permeabilizada durante 20 minutos foi menor, o que pode ter contribuído para a menor intensidade de fluorescência média nesta condição, quando comparada à amostra permeabilizada durante 10 minutos. Analisando a distribuição de fluorescência no gráfico, tendo em vista a maior marcação obtida com a permeabilização por 30 minutos, optamos por utilizar um tempo aproximado de permeabilização de 25 minutos.

8.2 Padronização do Spike

Um spike de células negativas para HbF (i.e. 0% de HbF pelo HPLC) com acréscimo de células de cordão umbilical 100% positivas para HbF (80% HbF pelo HPLC) marcadas com DiD'Oil foi realizado, fixado, cerca de 1/10 destas células foram adicionadas a 1×10^6 células já fixadas de pacientes com anemia falciforme com persistência de hemoglobina fetal. Após a adição, ambas amostras foram permeabilizadas com Triton x-100 (0,1%) durante 25 minutos em temperatura ambiente e marcados posteriormente com anti-HbF. Embora a população de células DiD HbF+ tenha sobreposto a população de F cells do paciente, após a permeabilização as células do paciente adquiriram fluorescência do DiD'Oil. Foi observado que as células do cordão umbilical marcadas e fixadas, acabam hemolisando, dificultando a aquisição de eventos HbF+ (Figura S4)

Figura suplementar 4. Spike de células DiD'Oil e adição em células falciformes com persistência de hemoglobina fetal.

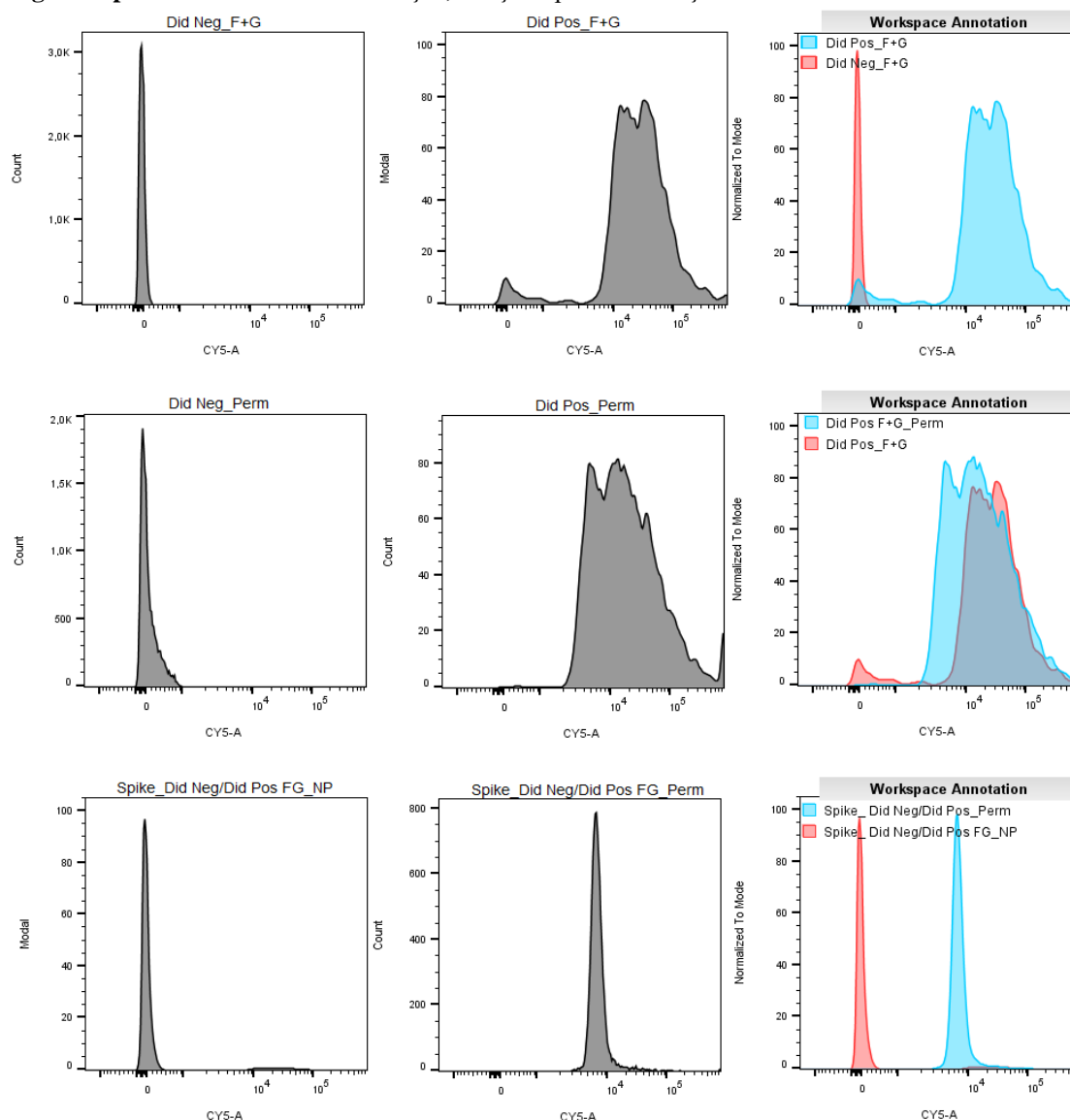


Um total 9×10^5 células de um paciente com AF tiveram 1×10^5 células do Spike marcado com DiD Oil adicionado. Cada amostra foi avaliada individualmente para a marcação de HbF.

Para avaliar a o efeito do DiD Oil, uma marcação foi realizada e as células foram fixadas, permeabilizadas, para identificar se o corante das células marcadas era capaz de transferir para células não marcadas quando permeabilizados juntamente (Figura S8).

1×10^7 células foram marcadas com uma concentração final de $2 \mu\text{M}$ de DiD'Oil e mantidas em incubação em abrigo da luz, durante 30 minutos.

Figura suplementar 5. Teste de marcação, fixação e permeabilização em amostras marcadas com DiD'Oil.

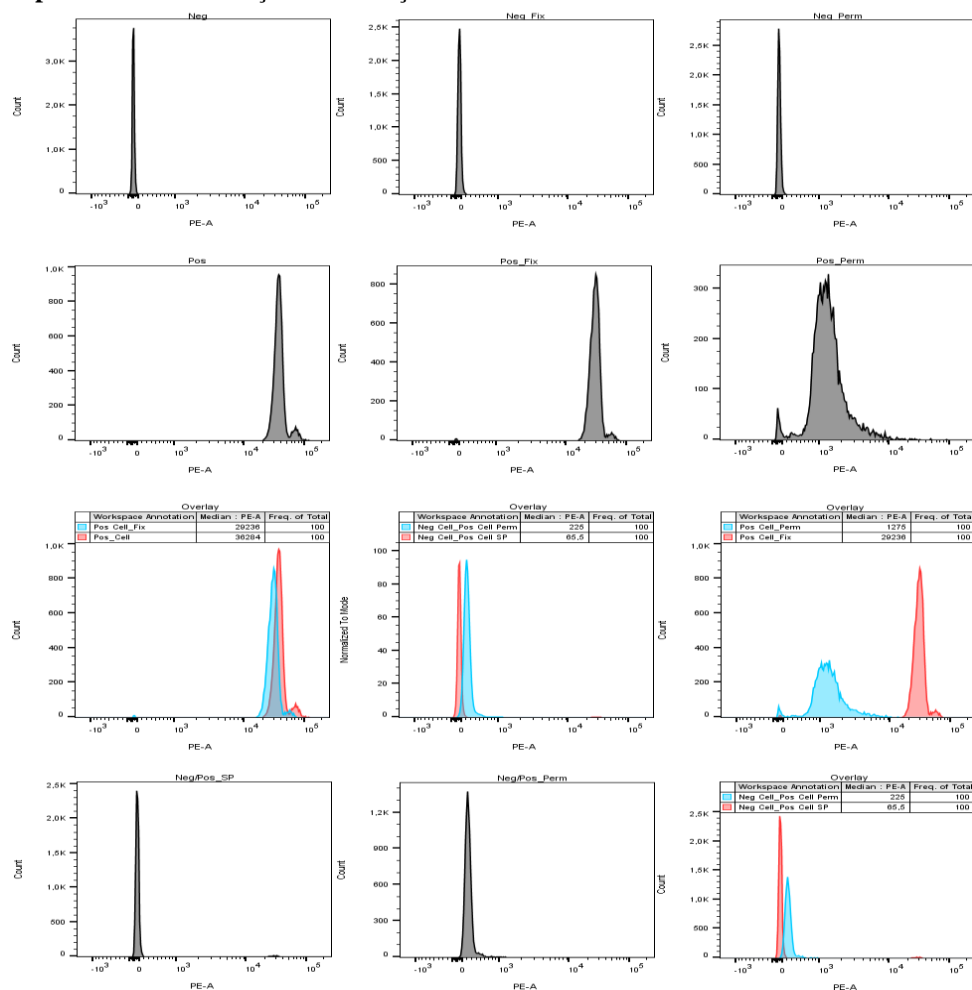


As células marcadas e não marcadas foram fixadas com formaldeído 1% acrescido de glutaraldeído 0,025% ou glutaraldeído 0,05%, e permeabilizadas com Triton X-100 0,1 % durante 25 minutos. Para avaliar a transferência de corante, 5×10^5 células negativas foram fixadas e adicionadas a 5×10^5 células DiD positivas, sendo permeabilizadas juntamente.

O baixo número de eventos adquiridos, considerando as células DiD Positivas, é decorrente de um provável efeito hemolítico, mesmo na menor concentração recomendável. O corante DiD'Oil é ressuspenso em etanol, o que pode explicar alterações de membrana que levam a lise das células vermelhas. Neste contexto, toxicidade também foi relatada em outros trabalhos (NAGYOVA; SLOVINSKA; BLASKO; GRULOVA *et al.*, 2014; ST JOHN, 1991).

Alternativamente o corante de membrana PKH26 possui caudas alifáticas que se ligam em regiões lipídicas da membrana celular, tendo mecanismo similar ao DiD, onde alguns trabalhos demonstram resistência a fixação/permeabilização. Em contrapartida, a excitação máxima é de 551nm enquanto a emissão máxima é em 567nm, coincidindo com o canal de leitura do PE-HbF. Foi realizada uma marcação em 1×10^7 eritrócitos em uma concentração de PKH26 de 2×10^{-6} M, que permaneceu em incubação durante 5 minutos em temperatura 37°C (Figura S6). A fixação não afeta consideravelmente a marcação, no entanto a permeabilização reduz significativamente a fluorescência. Além disso, foi descrito que a marcação com PKH-26 cursa com alterações morfológicas em eritrócitos, tornando-os eritóticos e morfológicamente reconhecíveis como equinócitos(READ; CARDINE; YU, 1991).

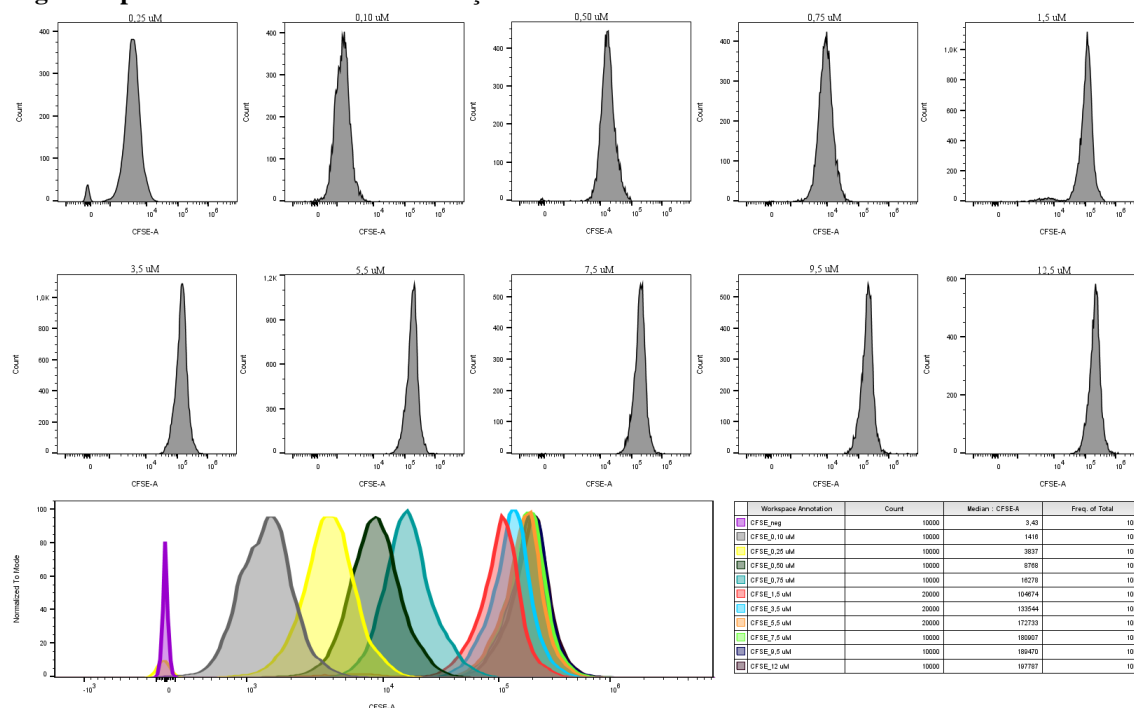
Figura suplementar 6. Avaliação da marcação com PKH26.



Cerca de 1×10^6 células de cordão umbilicadas foram marcadas em um volume de 2 mL de diluente C acrescido de PKH26 durante 5 minutos em temperatura ambiente, as células então foram fixadas em glutaraldeído 0,05% e permeabilizadas com Triton X-100 0,1%.

A interferência do PKH26 no canal do PE, inviabiliza a marcação. Com nossas opções reduzidas, pensando em alternativas para marcação do spike, testamos a marcação com o CFSE. O CFSE foi desenvolvido como um cortante fluorescente utilizado para monitorização da proliferação celular *in vitro*, cujo mecanismo de ação se dá por intermédio do precursor éster succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína, uma molécula não fluorescente com capacidade de difusão através de membranas celulares, onde uma vez no citoplasma celular, esterases intracelulares removem o grupo acetato, tornando-se uma molécula fluorescente menos permeável, que fica retida no citoplasma por longos períodos de tempo. (GRISENDI; FINETTI; MANGANARO; CORDOVA *et al.*, 2015). Dado as propriedades físico-químicas do CFSE testamos inicialmente diferentes concentrações para obter uma marcação uniforme e com alta intensidade de fluorescência, já que os procedimentos de fixação e permeabilização reduzem drasticamente a fluorescência. Para isso, as concentrações 0,25µM; 0,10µM; 0,50µM, 0,75µM; 1,5µM; 3,5µM; 5,5µM; 7,5µM; 9,5µM; e 12,5µM, foram avaliadas em 1×10^6 células de cordão umbilical, como exposto na figura suplementar 7

Figura suplementar 7. Teste de concentração do CFSE em eritrócitos de cordão umbilical.



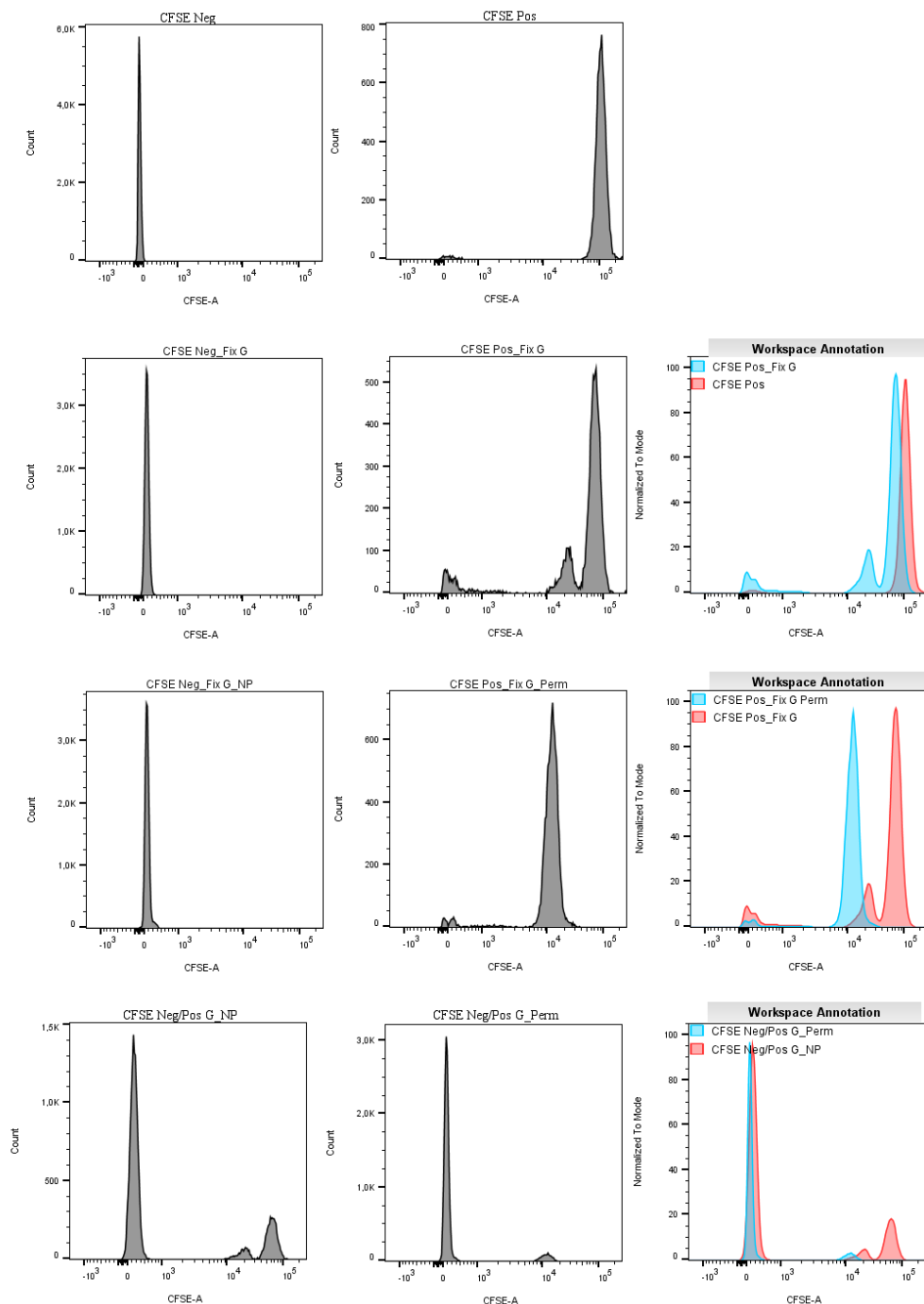
Teste de concentração do CFSE em eritrócitos de cordão umbilical. Diferentes concentrações de CFSE foram adicionadas a 1×10^6 células em um volume final de 1000 µL, e mantidas em incubação a 37°C durante 30 minutos, em constante agitação. Experimento realizado por citometria de fluxo, dados de intensidade média de fluorescência calculados utilizando o software FlowJo®

A concentração de 1,5 µM foi escolhida para utilização devido à obtenção da saturação. Concentrações superiores, embora contivessem intensidade média de

fluorescência maior, dado as circunstâncias de toxicidade pelo CFSE e pela economia de insumos, optamos pela utilização da menor concentração (LAST'OVICKA; BUDINSKY; SPISEK; BARTUNKOVA, 2009).

Para avaliar os efeitos da marcação com CFSE e a possível interferência em células fixadas, permeabilizadas, 1×10^6 eritrócitos de cordão umbilical foram marcados com CFSE na concentração de $1,5 \mu\text{M}$. Os eritrócitos foram fixados e permeabilizados. Para avaliar a transferência de corante em células CFSE+, 5×10^5 células CFSE negativas foram adicionadas em 5×10^5 células CFSE positivas, e ambas foram permeabilizadas juntamente (Figura S8).

Figura suplementar 8. Marcação do CFSE e teste de perda de fluorescência após fixação em glutaraldeído 0,05% e permeabilização com Triton X-100 0,1%.

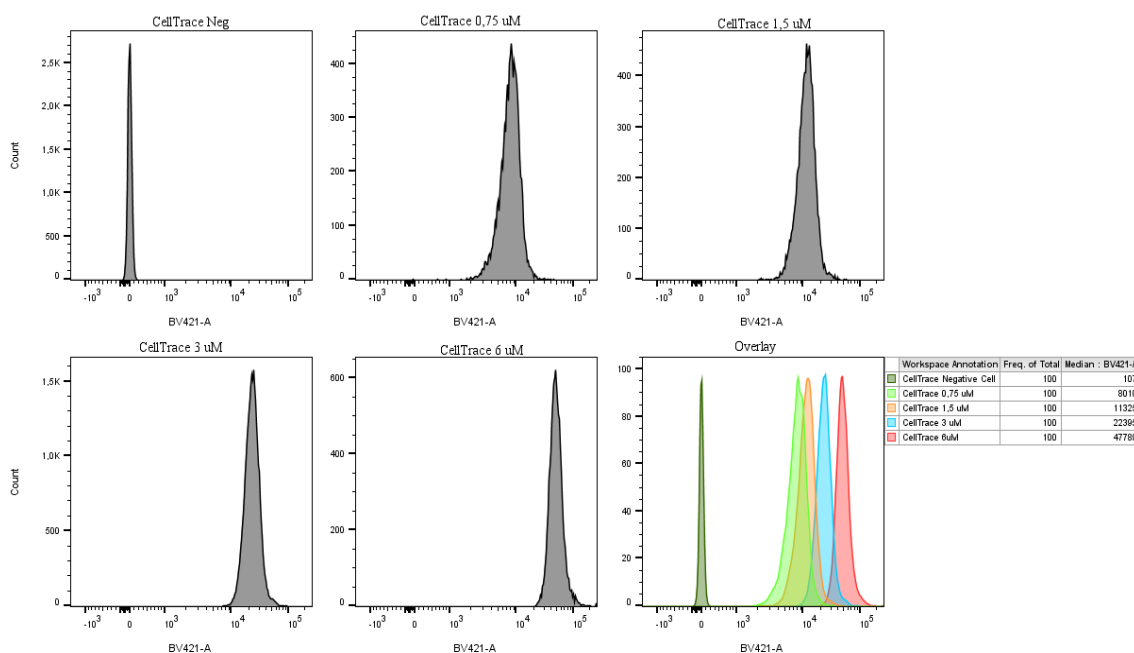


Embora a perda de fluorescência em amostras fixadas e permeabilizadas, seja significativa, ainda assim, é possível observar dois picos com diferentes intensidades de fluorescência o que permite identificar amostras CFSE negativas das populações CFSE

positivas. A marcação com CFSE não é capaz de transferir fluorescência para as células CFSE negativas. No entanto, a medida que o número de células marcadas é aumentado, a concentração de marcação do CFSE deve ser aumentada proporcionalmente para obtenção de uma boa marcação.

De maneira proporcional o aumento da concentração de CFSE, pode ser observado maior toxicidade as células marcadas, o que diminui consideravelmente o número de células finais para realização do Spike in. Alternativamente, a marcação com CellTrace Violet (Ex/Em 405/450) além de permitir uma boa marcação em linfócitos, possui uma toxicidade inferior quando comparado ao CellTrace CFSE utilizado para preparo do Spike in, para tanto, diferentes concentrações de CellTrace Violet foram avaliadas para identificar o melhor padrão de marcação. (Figura Suplementar 9)

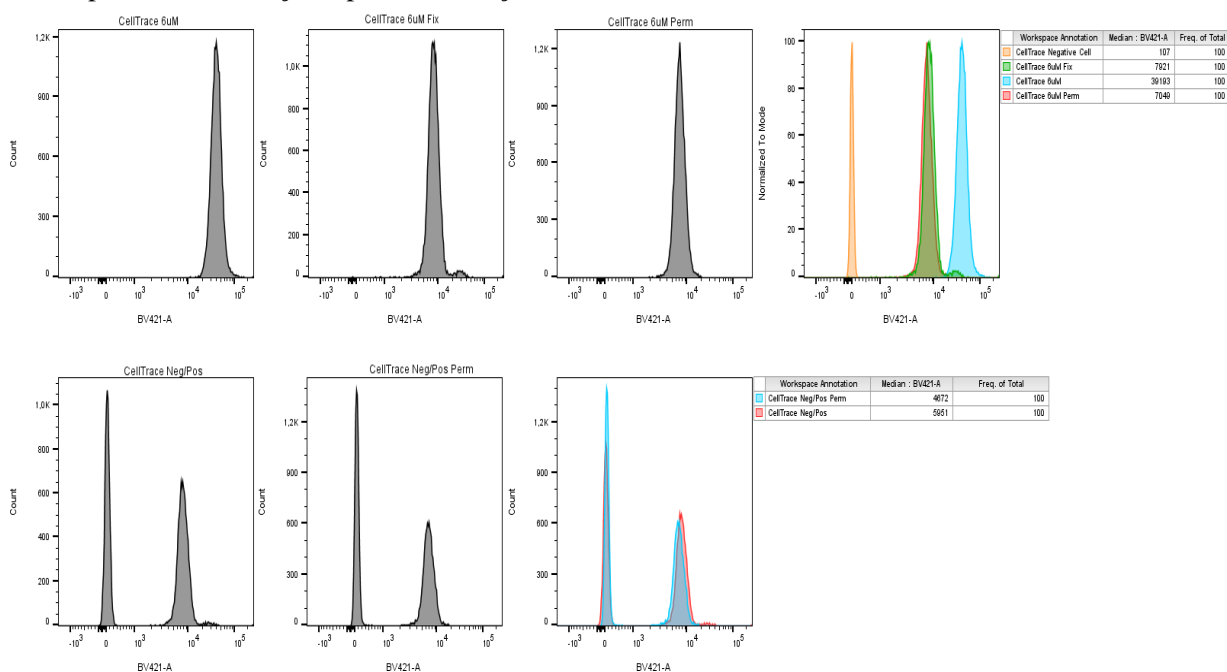
Figura suplementar 9. Padrão de marcação com CellTrace Violet. Um total de 1×10^6 eritrócitos foram marcados com CellTrace Violet em concentrações de $0,75 \mu\text{M}$, $1,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $6 \mu\text{M}$ respectivamente.



A melhor marcação foi obtida utilizando a concentração final de $6 \mu\text{M}$, entretanto, para avaliar influência da fixação e permeabilização e transferência de fluorescência, foi performedo o mesmo experimento descrito na figura S11. Um total de 1×10^6 eritrócitos marcados com uma concentração de CellTraceViolet de $6 \mu\text{M}$ foram submetidos ao processo de fixação utilizando glutaraldeído 0,05% e posteriormente permeabilizados com Triton X-100 (0,1%). Posteriormente células não marcadas foram adicionadas as células marcadas e permeabilizadas juntamente (Figura S10). Como demonstrado, a perda de intensidade de fluorescência utilizando CellTrace Violet é menor quando comparada

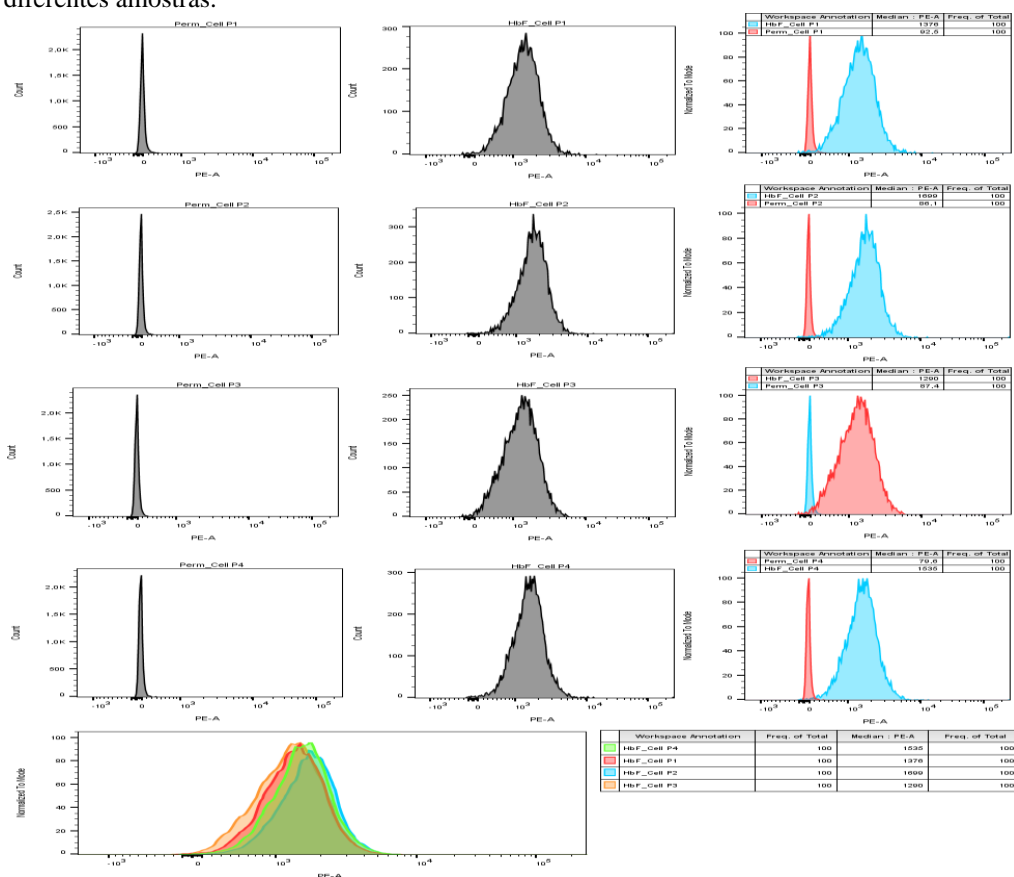
a marcação usual com CFSE, o que permite claramente distinguir duas populações celulares com base na intensidade de fluorescência.

Figura suplementar 10. Caracterização da marcação utilizando CellTrace Violet em eritrócitos submetidos ao processo de fixação e permeabilização.



Embora a marcação de células eritróides do cordão umbilical seja abundante em níveis percentuais de hemoglobina fetal estimada via HPLC, amostras de SCU podem apresentar uma população de células negativas para HbF, devido a células eritróides que já sofreram o *switch* da hemoglobina. Tendo em vista que o controle do Spike-In deve ter uma distribuição homogênea de células HbF homogeneamente positivas, de forma a permitir a extrapolação da intensidade de fluorescência mediana (MIF) para o valor MCHbF calculado, realizamos um ensaio de citometria de fluxo com anti-HbF, para avaliar qual amostra de SCU apresentava-se com uma distribuição de HbF mais homogênea, a marcação pode ser heterogênea e apresentar níveis de fluorescência variados. Com baixa disponibilidade de materiais, testamos a marcação individual de HbF em diferentes amostras de sangue de cordão umbilical recém coletadas.

Figura suplementar 11. Marcação de anti-HbF em eritrócitos de cordão umbilical provenientes de diferentes amostras.



As amostras foram lavadas, fixadas em glutaraldeído 0,05%, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% e posteriormente marcadas com anti-HbF. Célula P1 com HbF estimada por HPLC correspondente a 64%; Célula P2 correspondente a 70,8%; Célula P3 correspondente 57,3%; Célula P4 correspondente a 73,2%. Dados de intensidade média de fluorescência calculados utilizando o software FlowJo.

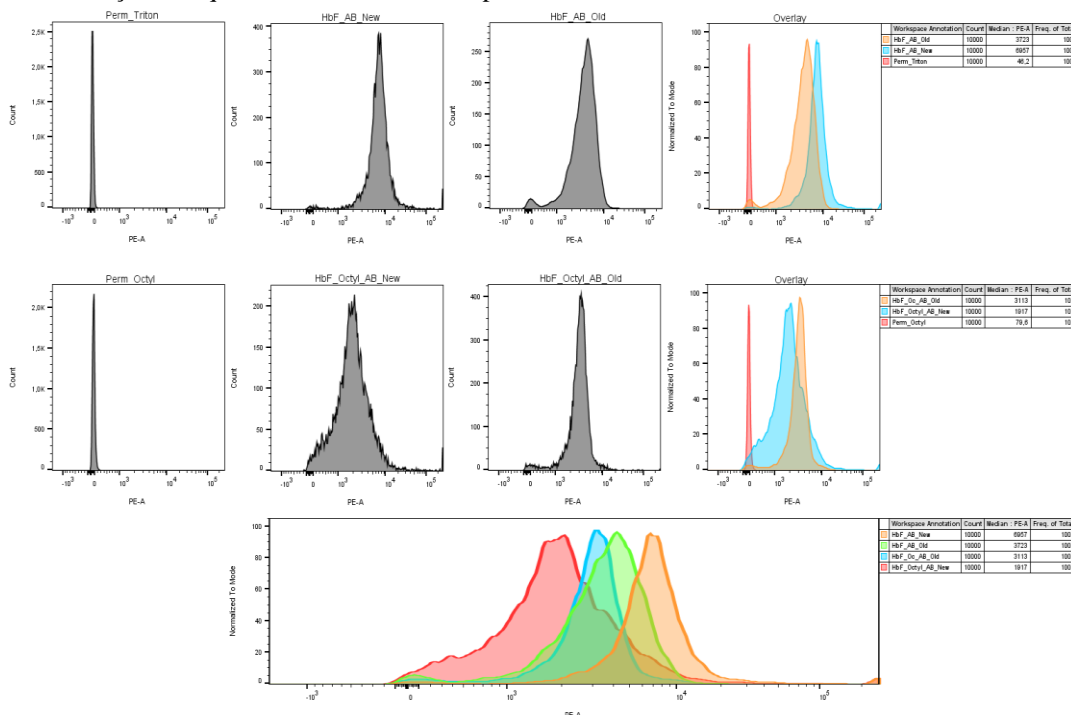
Tabela suplementar 4. Intensidade de fluorescência média de amostras de cordão marcadas com anti-HbF PE.

Condição	Frequência total	MIF anti-HbF PE	% HbF (HPLC)
Célula permeabilizada P1	100	92,5	64%
Célula P1+HbF	100	1375	
Célula permeabilizada P2	100	86,1	70,8%
Célula P2+HbF	100	1699	
Célula permeabilizada P3	100	87,4	57,3%
Célula P3+HbF	100	1290	
Célula permeabilizada P4	100	79,6	73,2%
Célula P4+HbF	100	1535	

Dados de citometria de fluxo obtidos por meio do software FlowJo.

Interessantemente, embora as amostras contivessem diferentes porcentagens estimadas de HbF por HPLC, nos dados de citometria de fluxo, as amostras não tiveram um deslocamento maior no quesito de fluorescência, como foi observado nos primeiros experimentos realizados. Questionamos se o anticorpo havia perdido a fluorescência e/ou se a permeabilização utilizando *Octyl β-D-Glucopyranoside 10 mg/mL* (do protocolo original) eram responsáveis pela falta de diferenças na marcação com anti-HbF entre as amostras. Uma nova alíquota de anti-HbF foi testada. A célula com maior quantidade de HbF (P4) foi utilizada para o experimento. A célula foi fixada, permeabilizada com Triton X-100 ou Octyl, comparando o anticorpo novo em relação à alíquota de anticorpo antiga (Figura S12).

Figura suplementar 12. Comparação da intensidade de marcação com métodos alternativos de permeabilização e alíquotas distintas do anticorpo anti-HbF.



Foram testados os métodos de permeabilização com *Octyl β-D-Glucopyranoside* e com Triton X-100 0,1%, utilizando duas alíquotas distintas do anticorpo anti-HbF marcado com PE. Dados obtidos por citometria de fluxo, e analisados pelo software FlowJo.

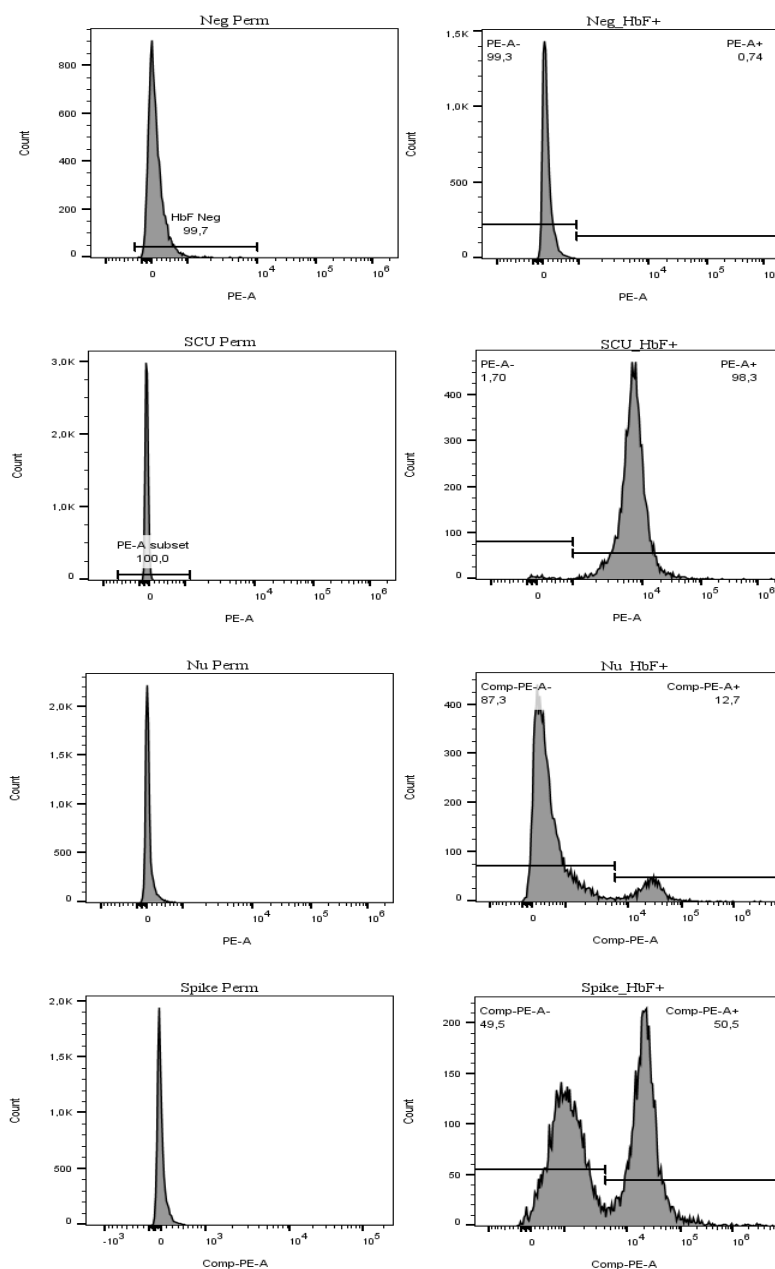
A permeabilização com Octyl β -D-Glucopyranoside não aumentou a intensidade de fluorescência em relação à célula permeabilizada com Triton X-100 0,1%. Entretanto, a alíquota do novo anticorpo aumentou a fluorescência média do PE significativamente (de 3723 para 6957). Por esta razão foi optado a marcação utilizando a alíquota nova, para experimentos posteriores.

8.3 *Validação do Controle Celular Interno (“Spike-In”)*

Uma vez padronizado o protocolo de citometria de fluxo e a marcação fluorescente do spike com CFSE, fizemos testes para aquisição de dados para cálculo de porcentagem de HbF unicelular. Para isso, utilizamos uma célula HbF negativa e um SCU com 73,2% de HbF. Para simular um sangue de uma pessoa com persistência de hemoglobina fetal, 10% de células SCU HbF+ foram adicionadas à células HbF negativas. Essas células (denominadas de “NU”) foram fixadas e contadas, de modo que foram distribuídas 9×10^5 células por experimento. Um spike contendo células HbF-negativas e HbF-positivas de SCU (numa proporção 1/1, i.e. 50% de cada) foi marcado com CFSE na concentração $5,5 \mu\text{M}$, fixados e 1×10^5 destas células (CFSE+ HbF-/SCU HbF+) foram adicionados às células NU (9×10^5), resultando numa subpopulação HbF+ numa frequência de 10%. Essas células foram permeabilizadas juntamente e marcadas com anti-HbF ($2 \mu\text{L}$). No entanto, foi possível verificar, que mesmo utilizando uma concentração maior de CFSE, em virtude da marcação de 1×10^7 células, a marcação não ficou uniforme, e ainda as células do SCU HbF+ morreram (Dados não mostrados). Para minimizar o viés de marcação e perda celular, as células HbF negativas (6×10^6) e SCU HbF+ (6×10^6) foram marcadas com CFSE independentemente, lavadas, contadas, misturadas proporcionalmente e então fixadas (Figura S13 e S14). Tendo em vista que a mesma amostra de SCU foi utilizada para produzir o Spike-In e para a amostra teste simulando um sangue de uma pessoa com persistência de hemoglobina fetal, avaliamos se a marcação com CFSE afetava a intensidade de marcação com o anticorpo anti-HbF, o que poderia comprometer a aplicabilidade de nosso Spike. Para isso, os histogramas das populações CFSE^{neg} (amostra teste) e CFSE^{pos} (controle interno Spike-In) foram superpostos e as populações HbF+ foram comparadas quanto à distribuição das intensidades de fluorescência obtidas. Os dados indicam que a população de células HbF+ (i.e. de SCU) marcadas com CFSE (i.e. do Spike) tiveram o mesmo padrão de intensidade de fluorescência para HbF-PE que a população de células HbF+ das células negativas

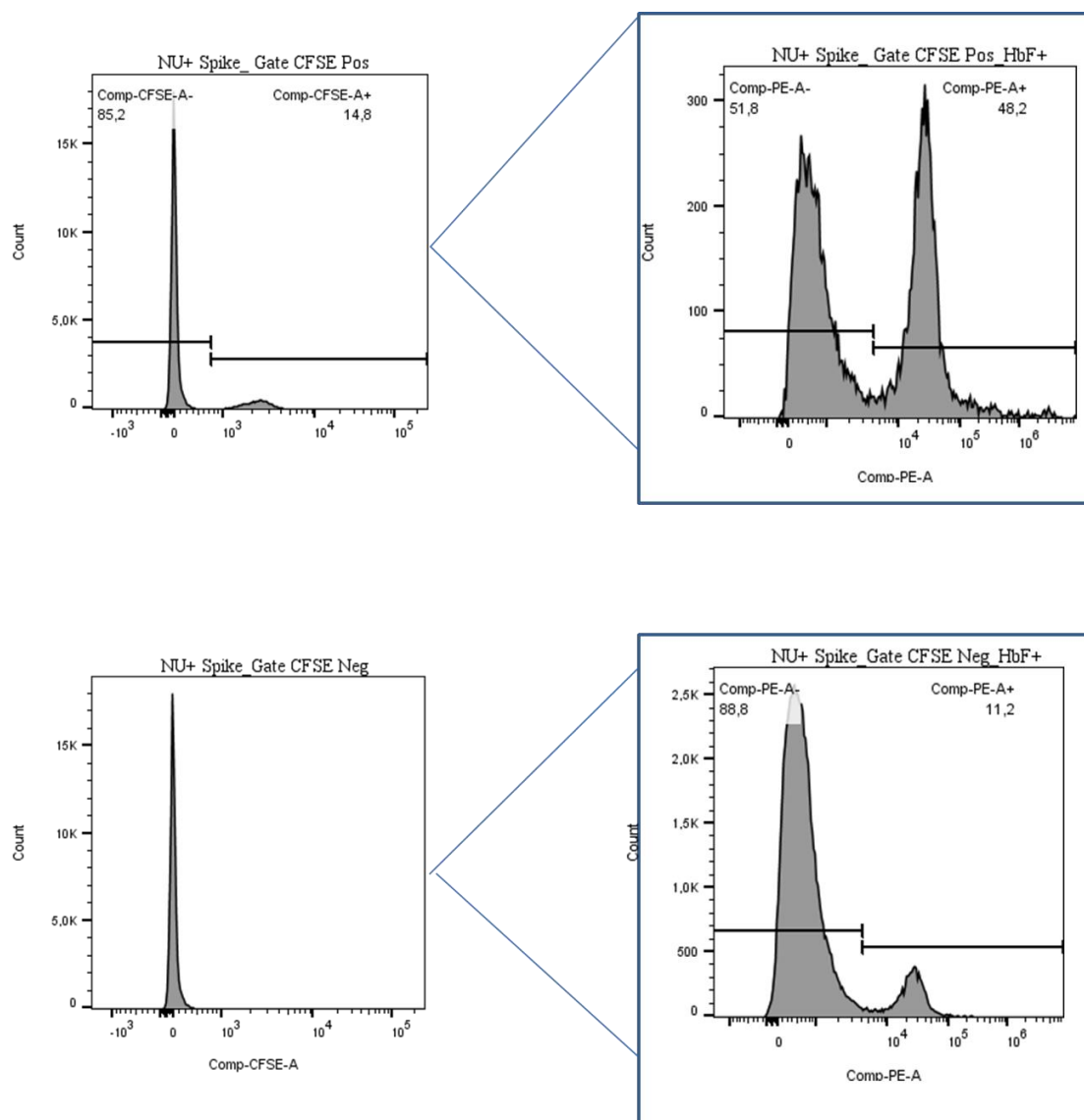
para CFSE da amostra teste (Figura S15). Isto indicou que a marcação prévia com CFSE, bem como a fixação independente, não interferiram com o padrão de marcação com o anticorpo anti-HbF-PE, de forma que a população de células HbF+ (do SCU) do Spike poderia ser utilizada como referência para a quantificação de HbF em células da amostra teste.

Figura suplementar 13. Caracterização de distribuição de hemoglobina fetal em amostras utilizadas para o preparo do spike in.



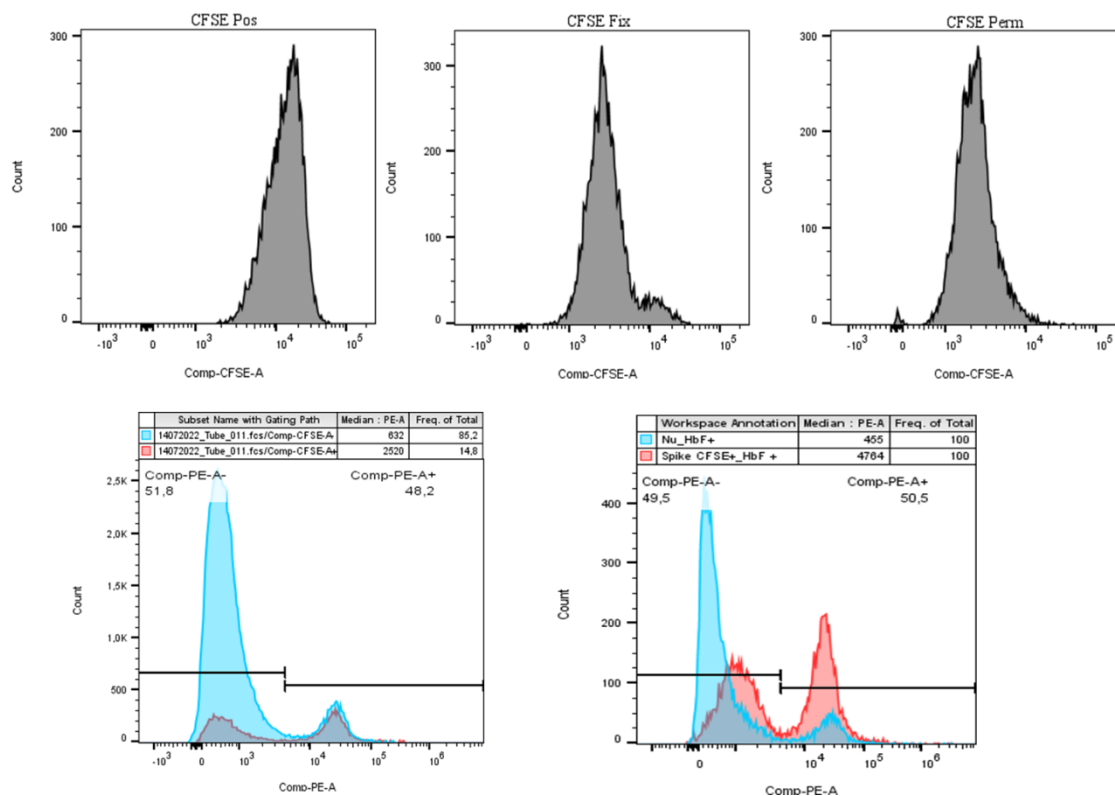
À esquerda, estão os controles sem marcação (RBCs fixados e permeabilizados), enquanto à direita estão as células marcadas com o anticorpo anti-HbF-PE. De cima para baixo estão: o controle com células HbF negativas de um indivíduo adulto, o controle positivo com células HbF-positivas de sangue de cordão umbilical, a amostra teste (células Nu) simulando o sangue de uma pessoa com persistência de hemoglobina fetal (contendo 10% de células HbF+ de SCU e 90% de células HbF- de adulto), e as células do controle Spike-In, composto por uma misturas contendo 50% de células HbF-positivas e negativas de SCU e de adulto, respectivamente. Dados de citometria de fluxo analisados por meio do software FlowJo.

Figura suplementar 14.Caracterização de células NU com adição de spike in



A amostra teste (células Nu), simulando o sangue de uma pessoa com persistência de hemoglobina fetal (contendo 10% de células HbF+ de SCU e 90% de células HbF- de adulto), foi misturada com 10% das células do controle Spike-In (composto por uma mistura contendo 50% de células HbF-positivas e negativas de SCU e de adulto, respectivamente, marcadas com o corante fluorescente CFSE). Na parte superior, um gate foi feito nas células CFSE positivas do *spike in* e a porcentagem de células HbF^{Pos} e HbF^{Neg} foi determinada. Abaixo, um gate nas células CFSE Neg (células Nu) provenientes da amostra teste foi utilizado para definir a porcentagem de células HbF^{Pos} e HbF^{Neg}.

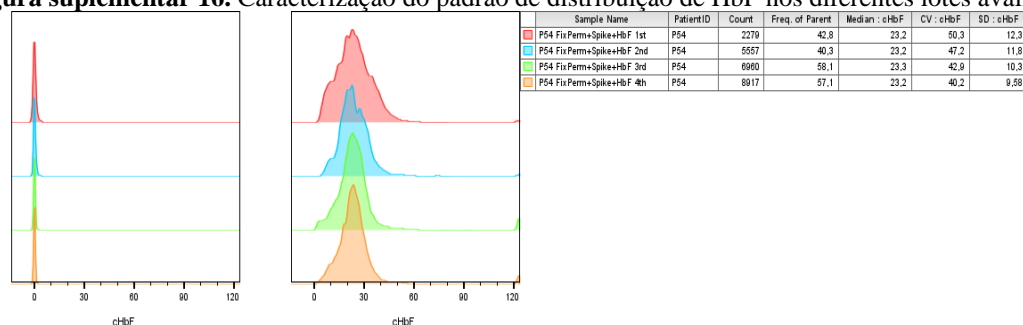
Figura suplementar 15. Caracterização do Spike-In marcado com CFSE.



As células do spike in foram marcadas com 5,5uM de CFSE, fixadas e permeabilizadas. Abaixo, imagens representando intensidade de fluorescência do anti-HbF-PE (PE-A) em amostras CFSE negativas da amostra teste em relação às células CFSE Positivas do Spike-In. Análise dos dados de citometria de fluxo feita pelo software Flow Jo.

Como dito, diferentes lotes de Spike-In foram gerados utilizando diferentes corantes, embora não tenhamos avaliado a repetibilidade destes lotes diferentes em uma mesma amostra, uma paciente em questão foi avaliada nas quatro visitas consecutivas, como pode ser visualizado na figura suplementar 16

Figura suplementar 16. Caracterização do padrão de distribuição de HbF nos diferentes lotes avaliados.



Os histogramas a esquerda representam as populações HbF negativas ou a direita, HbF positivas presentes no Spike CFSE+ (Lote 1 e 2) e CTV (Lote 1 e 2). As estatísticas descritivas como mediana, coeficiente de variação e desvio padrão considerando o conteúdo de HbF (cHbF) dessas amostras presentes na tabela

9 Referências

ADACHI, K.; KIM, J.; ASAKURA, T.; SCHWARTZ, E. Characterization of two types of fetal hemoglobin: alpha 2G gamma 2 and alpha 2A gamma 2. **Blood**, 75, n. 10, p. 2070-2075, May 15 1990.

AHMED, M. H.; GHATGE, M. S.; SAFO, M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. **Subcell Biochem**, 94, p. 345-382, 2020.

ALENDE-CASTRO, V.; ALONSO-SAMPEDRO, M.; VAZQUEZ-TEMPRANO, N.; TUNEZ, C. *et al.* Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults: New evidence for an old test. **Medicine (Baltimore)**, 98, n. 34, p. e16816, Aug 2019.

ALLALI, S.; CHALUMEAU, M.; LAUNAY, O.; BALLAS, S. K. *et al.* Conjugate Haemophilus influenzae type b vaccines for sickle cell disease. **Cochrane Database Syst Rev**, 8, p. CD011199, Aug 20 2018.

AMIDZADEH, Z.; BEHBAHANI, A. B.; ERFANI, N.; SHARIFZADEH, S. *et al.* Assessment of different permeabilization methods of minimizing damage to the adherent cells for detection of intracellular RNA by flow cytometry. **Avicenna J Med Biotechnol**, 6, n. 1, p. 38-46, Jan 2014.

ASHIUCHI, M.; YAGAMI, T.; WILLEY, R. J.; PADOVAN, J. C. *et al.* N-terminal acetylation and protonation of individual hemoglobin subunits: position-dependent effects on tetramer strength and cooperativity. **Protein Sci**, 14, n. 6, p. 1458-1471, Jun 2005.

ATWEH, G. F.; SCHECHTER, A. N. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. **Curr Opin Hematol**, 8, n. 2, p. 123-130, Mar 2001.

BALLAS, S. K. Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. **Clin Hemorheol Microcirc**, 68, n. 2-3, p. 105-128, 2018.

BARBARANI, G.; LABEDZ, A.; STUCCHI, S.; ABBIATI, A. *et al.* Physiological and Aberrant gamma-Globin Transcription During Development. **Front Cell Dev Biol**, 9, p. 640060, 2021.

BARTOLUCCI, P.; BRUGNARA, C.; TEIXEIRA-PINTO, A.; PISSARD, S. *et al.* Erythrocyte density in sickle cell syndromes is associated with specific clinical manifestations and hemolysis. **Blood**, 120, n. 15, p. 3136-3141, Oct 11 2012.

BELCHER, J. D.; CHEN, C.; NGUYEN, J.; MILBAUER, L. *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, 123, n. 3, p. 377-390, Jan 16 2014.

BELLELLI, A.; TAME, J. R. H. Hemoglobin allostery and pharmacology. **Mol Aspects Med**, 84, p. 101037, Apr 2022.

BERTLES, J. F.; MILNER, P. F. Irreversibly sickled erythrocytes: a consequence of the heterogeneous distribution of hemoglobin types in sickle-cell anemia. **J Clin Invest**, 47, n. 8, p. 1731-1741, Aug 1968.

BREWIN, J.; EL HOSS, S.; STROUBOULIS, J.; REES, D. A novel index to evaluate ineffective erythropoiesis in hematological diseases offers insights into sickle cell disease. **Haematologica**, 107, n. 1, p. 338-341, Jan 1 2022.

- BROWN, F. C.; CONWAY, A. J.; CERRUTI, L.; COLLINGE, J. E. *et al.* Activation of the erythroid K-C1 cotransporter Kcc1 enhances sickle cell disease pathology in a humanized mouse model. **Blood**, 126, n. 26, p. 2863-2870, Dec 24 2015.
- BUCHANAN, G. R. "Packaging" of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, 123, n. 4, p. 464-465, Jan 23 2014.
- BUNN, H. F.; BRIEHL, R. W. The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. **J Clin Invest**, 49, n. 6, p. 1088-1095, Jun 1970.
- CASTRO, O.; BRAMBILLA, D. J.; THORINGTON, B.; REINDORF, C. A. *et al.* The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, 84, n. 2, p. 643-649, Jul 15 1994.
- CAZZOLA, M. Ineffective erythropoiesis and its treatment. **Blood**, 139, n. 16, p. 2460-2470, Apr 21 2022.
- CHAPPLE, M. R.; JOHNSON, G. D.; DAVIDSON, R. S. Fluorescence quenching; a practical problem in flow cytometry. **J Microsc**, 159, n. Pt 3, p. 245-253, Sep 1990.
- CHOW, S.; HEDLEY, D.; GROM, P.; MAGARI, R. *et al.* Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations. **Cytometry A**, 67, n. 1, p. 4-17, Sep 2005.
- CHUNG, J. Y.; SONG, J. S.; YLAYA, K.; SEARS, J. D. *et al.* Histomorphological and Molecular Assessments of the Fixation Times Comparing Formalin and Ethanol-Based Fixatives. **J Histochem Cytochem**, 66, n. 2, p. 121-135, Feb 2018.
- COLLER, B. S. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25, n. 4, p. 658-670, Apr 2005.
- COSSARIZZA, A.; CHANG, H. D.; RADBRUCH, A.; ACS, A. *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). **Eur J Immunol**, 49, n. 10, p. 1457-1973, Oct 2019.
- CURTIS, S. A.; DANDA, N.; ETZION, Z.; COHEN, H. W. *et al.* Longitudinal Analysis of Patient Specific Predictors for Mortality in Sickle Cell Disease. **PLoS One**, 11, n. 10, p. e0164743, 2016.
- DAMANHOURI, G. A.; JARULLAH, J.; MAROUF, S.; HINDAWI, S. I. *et al.* Clinical biomarkers in sickle cell disease. **Saudi J Biol Sci**, 22, n. 1, p. 24-31, Jan 2015.
- DANA, M.; FIBACH, E. Fetal Hemoglobin in the Maternal Circulation - Contribution of Fetal Red Blood Cells. **Hemoglobin**, 42, n. 2, p. 138-140, Mar 2018.
- DAVISON, A. S.; GREEN, B. N.; ROBERTS, N. B. Fetal hemoglobin: assessment of glycation and acetylation status by electrospray ionization mass spectrometry. **Clin Chem Lab Med**, 46, n. 9, p. 1230-1238, 2008.
- DE JONGE, G.; DOS SANTOS, T. L.; CRUZ, B. R.; SIMIONATTO, M. *et al.* Interference of in vitro hemolysis complete blood count. **J Clin Lab Anal**, 32, n. 5, p. e22396, Jun 2018.
- DUMOULIN, A.; MANNING, L. R.; JENKINS, W. T.; WINSLOW, R. M. *et al.* Exchange of subunit interfaces between recombinant adult and fetal hemoglobins. Evidence for a functional

inter-relationship among regions of the tetramer. **J Biol Chem**, 272, n. 50, p. 31326-31332, Dec 12 1997.

DUPONT, F. O.; GAGNON, R.; ARDILOUZE, J. L.; AURAY-BLAIS, C. Determination of glycosylated and acetylated hemoglobins in cord blood by time-of-flight mass spectrometry. **Anal Chem**, 83, n. 13, p. 5245-5252, Jul 1 2011.

DZIERZAK, E.; PHILIPSEN, S. Erythropoiesis: development and differentiation. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 3, n. 4, p. a011601, Apr 1 2013.

EERNSTMAN, J.; VELDHUISEN, B.; LIGTHART, P.; VON LINDERN, M. *et al.* Novel variants in Krueppel like factor 1 that cause persistence of fetal hemoglobin in In(Lu) individuals. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 18557, Sep 17 2021.

EL HOSS, S.; COCHET, S.; GODARD, A.; YAN, H. *et al.* Fetal hemoglobin rescues ineffective erythropoiesis in sickle cell disease. **Haematologica**, 106, n. 10, p. 2707-2719, Oct 1 2021.

ETZION, Z.; TIFFERT, T.; BOOKCHIN, R. M.; LEW, V. L. Effects of deoxygenation on active and passive Ca²⁺ transport and on the cytoplasmic Ca²⁺ levels of sickle cell anemia red cells. **J Clin Invest**, 92, n. 5, p. 2489-2498, Nov 1993.

FAVA, C.; CATTAZZO, F.; HU, Z. D.; LIPPI, G. *et al.* The role of red blood cell distribution width (RDW) in cardiovascular risk assessment: useful or hype? **Ann Transl Med**, 7, n. 20, p. 581, Oct 2019.

FEUGRAY, G.; KASONGA, F.; GRALL, M.; BENHAMOU, Y. *et al.* Assessment of Reticulocyte and Erythrocyte Parameters From Automated Blood Counts in Vaso-Occlusive Crisis on Sickle Cell Disease. **Front Med (Lausanne)**, 9, p. 858911, 2022.

FOLLER, M.; LANG, F. Ion Transport in Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes. **Front Cell Dev Biol**, 8, p. 597, 2020.

FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 3, n. 2, p. a011684, Feb 1 2013.

FRANCO, R. S.; YASIN, Z.; PALASCAK, M. B.; CIRAOLO, P. *et al.* The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. **Blood**, 108, n. 3, p. 1073-1076, Aug 1 2006.

FUCHAROEN, S.; WINICHAGOON, P. New updating into hemoglobinopathies. **Int J Lab Hematol**, 34, n. 6, p. 559-565, Dec 2012.

GELL, D. A. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cells Mol Dis**, 70, p. 13-42, May 2018.

GHATGE, M. S.; AHMED, M. H.; OMAR, A. S.; PAGARE, P. P. *et al.* Crystal structure of carbonmonoxy sickle hemoglobin in R-state conformation. **J Struct Biol**, 194, n. 3, p. 446-450, Jun 2016.

GLADWIN, M. T.; OFORI-ACQUAH, S. F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood**, 123, n. 24, p. 3689-3690, Jun 12 2014.

GOLDSTEIN, N. S.; HEWITT, S. M.; TAYLOR, C. R.; YAZIJI, H. *et al.* Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, 15, n. 2, p. 124-133, Jun 2007.

GRISENDI, G.; FINETTI, E.; MANGANARO, D.; CORDOVA, N. *et al.* Detection of microparticles from human red blood cells by multiparametric flow cytometry. **Blood Transfus**, 13, n. 2, p. 274-280, Apr 2015.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, 241, n. 7, p. 689-696, Apr 2016.

HAMASAKI, N.; YAMAMOTO, M. Red blood cell function and blood storage. **Vox Sang**, 79, n. 4, p. 191-197, 2000.

HAN, H.; HENSCH, L.; TUBMAN, V. N. Indications for transfusion in the management of sickle cell disease. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, 2021, n. 1, p. 696-703, Dec 10 2021.

HARRINGTON, D. J.; ADACHI, K.; ROYER, W. E., Jr. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. **J Mol Biol**, 272, n. 3, p. 398-407, Sep 26 1997.

HARTEVELD, C. L.; ACHOUR, A.; ARKESTEIJN, S. J. G.; TER HUURNE, J. *et al.* The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. **Int J Lab Hematol**, 44 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 28-36, Sep 2022.

HEBBEL, R. P.; BOOGAERTS, M. A.; EATON, J. W.; STEINBERG, M. H. Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. **N Engl J Med**, 302, n. 18, p. 992-995, May 1 1980.

HEBERT, N.; RAKOTOSON, M. G.; BODIVIT, G.; AUDUREAU, E. *et al.* Individual red blood cell fetal hemoglobin quantification allows to determine protective thresholds in sickle cell disease. **Am J Hematol**, Jul 18 2020.

HOBRO, A. J.; SMITH, N. I. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. **Vibrational Spectroscopy**, 91, p. 31-45, Jul 2017.

HOOVER, R.; RUBIN, R.; WISE, G.; WARREN, R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. **Blood**, 54, n. 4, p. 872-876, Oct 1979.

HORIUCHI, K.; OSTERHOUT, M. L.; KAMMA, H.; BEKOE, N. A. *et al.* Estimation of fetal hemoglobin levels in individual red cells via fluorescence image cytometry. **Cytometry**, 20, n. 3, p. 261-267, Jul 01 1995.

HORIUCHI, K.; STEPHENS, M. J.; ADACHI, K.; ASAKURA, T. *et al.* Image analysis studies of the degree of irreversible deformation of sickle cells in relation to cell density and Hb F level. **Br J Haematol**, 85, n. 2, p. 356-364, Oct 1993.

HOWARD, J.; MALFROY, M.; LLEWELYN, C.; CHOO, L. *et al.* The Transfusion Alternatives Preoperatively in Sickle Cell Disease (TAPS) study: a randomised, controlled, multicentre clinical trial. **Lancet**, 381, n. 9870, p. 930-938, Mar 16 2013.

ICHIKAWA, T.; WANG, D.; MIYAZAWA, K.; MIYATA, K. *et al.* Chemical fixation creates nanoscale clusters on the cell surface by aggregating membrane proteins. **Commun Biol**, 5, n. 1, p. 487, May 20 2022.

IQBAL, M. S.; TABASSUM, A.; ARBAEEN, A. F.; QASEM, A. H. *et al.* Preanalytical Errors in a Hematology Laboratory: An Experience from a Tertiary Care Center. **Diagnostics (Basel)**, 13, n. 4, Feb 6 2023.

- IQBAL, Z.; LI, M.; MCKENDRY, R.; HORTON, M. *et al.* Investigation of sickle-cell haemoglobin polymerisation under electrochemical control. **Chemphyschem**, 14, n. 10, p. 2143-2148, Jul 22 2013.
- JACOB, G. F.; RAPER, A. B. Hereditary persistence of foetal haemoglobin production, and its interaction with the sickle-cell trait. **Br J Haematol**, 4, n. 2, p. 138-149, Apr 1958.
- JOINER, C. H. Gardos pathway to sickle cell therapies? **Blood**, 111, n. 8, p. 3918-3919, Apr 15 2008.
- K, J. L.; PARLANE, N. A.; RILEY, C. B.; GEE, E. K. *et al.* CellTrace Violet inhibits equine lymphocyte proliferation. **Vet Immunol Immunopathol**, 223, p. 110037, May 2020.
- KAI, K.; YODA, Y.; KAWAGUCHI, A.; MINESAKI, A. *et al.* Formalin fixation on HER-2 and PD-L1 expression in gastric cancer: A pilot analysis using the same surgical specimens with different fixation times. **World J Clin Cases**, 7, n. 4, p. 419-430, Feb 26 2019.
- KATO, G. J.; PIEL, F. B.; REID, C. D.; GASTON, M. H. *et al.* Sickle cell disease. **Nat Rev Dis Primers**, 4, p. 18010, Mar 15 2018.
- KAUL, D. K.; FINNEGAN, E.; BARABINO, G. A. Sickle red cell-endothelium interactions. **Microcirculation**, 16, n. 1, p. 97-111, Jan 2009.
- KEIKHAEI, B.; YOUSEFI, H.; BAHADORAM, M. Clinical and Haematological Effects of Hydroxyurea in beta-Thalassemia Intermedia Patients. **J Clin Diagn Res**, 9, n. 10, p. OM01-03, Oct 2015.
- KHANDROS, E.; BLOBEL, G. A. Heterogeneity of fetal hemoglobin production in adult red blood cells. **Curr Opin Hematol**, 28, n. 3, p. 164-170, May 1 2021.
- KHERA, R.; SINGH, T.; KHUANA, N.; GUPTA, N. *et al.* HPLC in characterization of hemoglobin profile in thalassemia syndromes and hemoglobinopathies: a clinicohematological correlation. **Indian J Hematol Blood Transfus**, 31, n. 1, p. 110-115, Mar 2015.
- KINGER, N. P.; MORENO, C. C.; MILLER, F. H.; MITTAL, P. K. Abdominal Manifestations of Sickle Cell Disease. **Curr Probl Diagn Radiol**, 50, n. 2, p. 241-251, Mar-Apr 2021.
- KLARL, B. A.; LANG, P. A.; KEMPE, D. S.; NIEMOELLER, O. M. *et al.* Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. **Am J Physiol Cell Physiol**, 290, n. 1, p. C244-253, Jan 2006.
- KOHNE, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Dtsch Arztebl Int**, 108, n. 31-32, p. 532-540, Aug 2011.
- KUCUKAL, E.; ILICH, A.; KEY, N. S.; LITTLE, J. A. *et al.* Red Blood Cell Adhesion to Heme-Activated Endothelial Cells Reflects Clinical Phenotype in Sickle Cell Disease. **Am J Hematol**, Jun 15 2018.
- KUCUKAL, E.; LITTLE, J. A.; GURKAN, U. A. Shear dependent red blood cell adhesion in microscale flow. **Integr Biol (Camb)**, 10, n. 4, p. 194-206, Apr 23 2018.
- KUCUKAL, E.; MAN, Y.; QUINN, E.; TEWARI, N. *et al.* Red blood cell adhesion to ICAM-1 is mediated by fibrinogen and is associated with right-to-left shunts in sickle cell disease. **Blood Adv**, 4, n. 15, p. 3688-3698, Aug 11 2020.

KUHN, V.; DIEDERICH, L.; KELLER, T. C. S. t.; KRAMER, C. M. *et al.* Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. **Antioxid Redox Signal**, 26, n. 13, p. 718-742, May 1 2017.

LANZKRON, S.; CARROLL, C. P.; HAYWOOD, C., Jr. Mortality rates and age at death from sickle cell disease: U.S., 1979-2005. **Public Health Rep**, 128, n. 2, p. 110-116, Mar-Apr 2013.

LASTOVICKA, J.; BUDINSKY, V.; SPISEK, R.; BARTUNKOVA, J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. **Cell Immunol**, 256, n. 1-2, p. 79-85, 2009.

LEE, J. W.; DEVANARAYAN, V.; BARRETT, Y. C.; WEINER, R. *et al.* Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. **Pharm Res**, 23, n. 2, p. 312-328, Feb 2006.

LENICEK KRLEZA, J.; HONOVIC, L.; VLASIC TANASKOVIC, J.; PODOLAR, S. *et al.* Post-analytical laboratory work: national recommendations from the Working Group for Post-analytics on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. **Biochem Med (Zagreb)**, 29, n. 2, p. 020502, Jun 15 2019.

LI, H.; KAZMI, J. S.; LEE, S.; ZHANG, D. *et al.* Dietary iron restriction protects against vaso-occlusion and organ damage in murine sickle cell disease. **Blood**, 141, n. 2, p. 194-199, Jan 12 2023.

LI, X.; TAO, Y.; LIU, J.; LU, W. *et al.* Optimized protocol of RBCs lysis for immunophenotypic analysis in the peripheral blood of tree shrew. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 50, n. 4, p. 428-431, Apr 1 2018.

LIPPI, G.; BLANCKAERT, N.; BONINI, P.; GREEN, S. *et al.* Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. **Clin Chem Lab Med**, 46, n. 6, p. 764-772, 2008.

LITOS, M.; SARRIS, I.; BEWLEY, S.; SEED, P. *et al.* White blood cell count as a predictor of the severity of sickle cell disease during pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 133, n. 2, p. 169-172, Aug 2007.

LOBO, C. L. C.; NASCIMENTO, E. M. D.; JESUS, L. J. C.; FREITAS, T. G. *et al.* Mortality in children, adolescents and adults with sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 40, n. 1, p. 37-42, Jan - Mar 2018.

LU, S. J.; FENG, Q.; PARK, J. S.; VIDA, L. *et al.* Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. **Blood**, 112, n. 12, p. 4475-4484, Dec 1 2008.

MABAERA, R.; WEST, R. J.; CONINE, S. J.; MACARI, E. R. *et al.* A cell stress signaling model of fetal hemoglobin induction: what doesn't kill red blood cells may make them stronger. **Exp Hematol**, 36, n. 9, p. 1057-1072, Sep 2008.

MAGRIN, E.; MICCIO, A.; CAVAZZANA, M. Lentiviral and genome-editing strategies for the treatment of beta-hemoglobinopathies. **Blood**, 134, n. 15, p. 1203-1213, Oct 10 2019.

MAIER-REDELSPERGER, M.; NOGUCHI, C. T.; DE MONTALEMBERT, M.; RODGERS, G. P. *et al.* Variation in fetal hemoglobin parameters and predicted hemoglobin S polymerization in sickle cell children in the first two years of life: Parisian Prospective Study on Sickle Cell Disease. **Blood**, 84, n. 9, p. 3182-3188, Nov 1 1994.

MANNING, J. M.; MANNING, L. R.; DUMOULIN, A.; PADOVAN, J. C. *et al.* Embryonic and Fetal Human Hemoglobins: Structures, Oxygen Binding, and Physiological Roles. **Subcell Biochem**, 94, p. 275-296, 2020.

MANNING, L. R.; MANNING, J. M. The acetylation state of human fetal hemoglobin modulates the strength of its subunit interactions: long-range effects and implications for histone interactions in the nucleosome. **Biochemistry**, 40, n. 6, p. 1635-1639, Feb 13 2001.

MARCUS, S. J.; KINNEY, T. R.; SCHULTZ, W. H.; O'BRANSKI, E. E. *et al.* Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. **Am J Hematol**, 54, n. 1, p. 40-46, Jan 1997.

MARENCO-ROWE, A. J. Structure-function relations of human hemoglobins. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**, 19, n. 3, p. 239-245, Jul 2006.

METTANANDA, S.; GIBBONS, R. J.; HIGGS, D. R. alpha-Globin as a molecular target in the treatment of beta-thalassemia. **Blood**, 125, n. 24, p. 3694-3701, Jun 11 2015.

MITRANI, R.; GOLLOMP, K.; LAMBERT, M. P.; OBSTFELD, A. The Immature Reticulocyte Fraction As an Aid in the Diagnosis and Prognosis of Parvovirus B19 Infection in Sickle Cell Disease. **Blood**, 132, n. Supplement 1, p. 3678-3678, 2018.

MITTAG, A.; TARNOK, A. Basics of standardization and calibration in cytometry--a review. **J Biophotonics**, 2, n. 8-9, p. 470-481, Sep 2009.

MIZRAHI, O.; ISH SHALOM, E.; BANİYASH, M.; KLIEGER, Y. Quantitative Flow Cytometry: Concerns and Recommendations in Clinic and Research. **Cytometry B Clin Cytom**, 94, n. 2, p. 211-218, Mar 2018.

MOSCA, A.; PALEARI, R.; LEONE, D.; IVALDI, G. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies. **Clin Biochem**, 42, n. 18, p. 1797-1801, Dec 2009.

MUNDEE, Y.; BIGELOW, N. C.; DAVIS, B. H.; PORTER, J. B. Simplified flow cytometric method for fetal hemoglobin containing red blood cells. **Cytometry**, 42, n. 6, p. 389-393, Dec 15 2000.

NADER, E.; ROMANA, M.; CONNES, P. The Red Blood Cell-Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. **Front Immunol**, 11, p. 454, 2020.

NAGYOVA, M.; SLOVINSKA, L.; BLASKO, J.; GRULOVA, I. *et al.* A comparative study of PKH67, DiI, and BrdU labeling techniques for tracing rat mesenchymal stem cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, 50, n. 7, p. 656-663, Aug 2014.

NASCIMENTO, M. I. D.; PRZIBILSKI, A. L. F.; COELHO, C. S. G.; LEITE, K. F. A. *et al.* Mortality attributed to sickle cell disease in children and adolescents in Brazil, 2000-2019. **Rev Saude Publica**, 56, p. 65, 2022.

NAVENOT, J. M.; MERGHOUB, T.; DUCROCQ, R.; MULLER, J. Y. *et al.* New method for quantitative determination of fetal hemoglobin-containing red blood cells by flow cytometry: application to sickle-cell disease. **Cytometry**, 32, n. 3, p. 186-190, Jul 1 1998.

NGO, S.; BARTOLUCCI, P.; LOBO, D.; MEKONTSO-DESSAP, A. *et al.* Causes of Death in Sickle Cell Disease Adult Patients: Old and New Trends. **Blood**, 124, n. 21, p. 2715-2715, 2014.

- NSIRI, B.; GRITLI, N.; BAYOUDH, F.; MESSAOUD, T. *et al.* Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in homozygous sickle cell disease. **Hematol Cell Ther**, 38, n. 3, p. 279-284, Jul 1996.
- ODIEVRE, M. H.; VERGER, E.; SILVA-PINTO, A. C.; ELION, J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res**, 134, p. 532-537, Oct 2011.
- OGAWA, C.; TSUCHIYA, K.; MAEDA, K. Reticulocyte hemoglobin content. **Clin Chim Acta**, 504, p. 138-145, May 2020.
- ONEAL, P. A.; GANTT, N. M.; SCHWARTZ, J. D.; BHANU, N. V. *et al.* Fetal hemoglobin silencing in humans. **Blood**, 108, n. 6, p. 2081-2086, Sep 15 2006.
- PARROW, N. L.; VIOLET, P. C.; GEORGE, N. A.; ALI, F. *et al.* Dietary iron restriction improves markers of disease severity in murine sickle cell anemia. **Blood**, 137, n. 11, p. 1553-1555, Mar 18 2021.
- PENG, Z.; XIANG, W.; ZHOU, J.; CAO, J. *et al.* Hemolytic specimens in complete blood cell count: Red cell parameters could be revised by plasma free hemoglobin. **J Clin Lab Anal**, 34, n. 6, p. e23218, Jun 2020.
- PIEL, F. B.; HAY, S. I.; GUPTA, S.; WEATHERALL, D. J. *et al.* Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. **PLoS Med**, 10, n. 7, p. e1001484, 2013.
- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **N Engl J Med**, 376, n. 16, p. 1561-1573, Apr 20 2017.
- PINTO, A. C. S.; ARAUJO, A. S.; GUALANDRO, S. F. M.; BUENO, C. T. *et al.* VASO-OCCLUSIVE CRISIS IN A 12-MONTH PERIOD: PREVALENCE AMONG BRAZILIAN PATIENTS WITH DIAGNOSIS OF SICKLE CELL DISEASE. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 42, p. 59-60, 2020. 10.1016/j.htct.2020.10.098.
- PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N Engl J Med**, 358, n. 13, p. 1362-1369, Mar 27 2008.
- PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F. *et al.* Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med**, 330, n. 23, p. 1639-1644, Jun 9 1994.
- PUSHPARAJ, P. N. Revisiting the Micropipetting Techniques in Biomedical Sciences: A Fundamental Prerequisite in Good Laboratory Practice. **Bioinformation**, 16, n. 1, p. 8-12, 2020.
- QUAH, B. J.; PARISH, C. R. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. **J Immunol Methods**, 379, n. 1-2, p. 1-14, May 31 2012.
- QUINN, C. T.; NISS, O.; DONG, M.; PFEIFFER, A. *et al.* Early initiation of hydroxyurea (hydroxycarbamide) using individualised, pharmacokinetics-guided dosing can produce sustained and nearly pan-cellular expression of fetal haemoglobin in children with sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, 194, n. 3, p. 617-625, Aug 2021.
- RAPETTI-MAUSS, R.; LACOSTE, C.; PICARD, V.; GUITTON, C. *et al.* A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary xerocytosis. **Blood**, 126, n. 11, p. 1273-1280, Sep 10 2015.

READ, E. J.; CARDINE, L. L.; YU, M. Y. Flow cytometric detection of human red cells labeled with a fluorescent membrane label: potential application to in vivo survival studies. **Transfusion**, 31, n. 6, p. 502-508, Jul-Aug 1991.

RISSO, A.; FABBRO, D.; DAMANTE, G.; ANTONUTTO, G. Expression of fetal hemoglobin in adult humans exposed to high altitude hypoxia. **Blood Cells Mol Dis**, 48, n. 3, p. 147-153, Mar 15 2012.

ROEDERER, M. Compensation in flow cytometry. **Curr Protoc Cytom**, Chapter 1, p. Unit 1 14, Dec 2002.

ROGERS, S. C.; DOSIER, L. B.; MCMAHON, T. J.; ZHU, H. *et al.* Red blood cell phenotype fidelity following glycerol cryopreservation optimized for research purposes. **PLoS One**, 13, n. 12, p. e0209201, 2018.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 3, n. 1, p. a011643, Jan 1 2013.

SANTO, A. H. Sickle cell disease related mortality in Brazil, 2000-2018. **Hematol Transfus Cell Ther**, 44, n. 2, p. 177-185, Apr-Jun 2022.

SCHROEDER, W. A.; CUA, J. T.; MATSUDA, G.; FENNINGER, W. D. Hemoglobin F1, an acetyl-containing hemoglobin. **Biochim Biophys Acta**, 63, p. 532-534, Oct 8 1962.

SEBASTIANI, P.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin per erythrocyte (HbF/F-cell) after gene therapy for sickle cell anemia. **Am J Hematol**, 98, n. 2, p. E32-E34, Feb 2023.

SEDEK, L.; FLORES-MONTERO, J.; VAN DER SLUIJS, A.; KULIS, J. *et al.* Impact of Pre-Analytical and Analytical Variables Associated with Sample Preparation on Flow Cytometric Stainings Obtained with EuroFlow Panels. **Cancers (Basel)**, 14, n. 3, Jan 18 2022.

SHANG, X.; PENG, Z.; YE, Y.; ASAN *et al.* Rapid Targeted Next-Generation Sequencing Platform for Molecular Screening and Clinical Genotyping in Subjects with Hemoglobinopathies. **EBioMedicine**, 23, p. 150-159, Sep 2017.

SHEPHERD, T. M.; THELWALL, P. E.; STANISZ, G. J.; BLACKBAND, S. J. Aldehyde fixative solutions alter the water relaxation and diffusion properties of nervous tissue. **Magn Reson Med**, 62, n. 1, p. 26-34, Jul 2009.

SHET, A. S.; ARAS, O.; GUPTA, K.; HASS, M. J. *et al.* Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. **Blood**, 102, n. 7, p. 2678-2683, Oct 1 2003.

SHOME, D. K.; JARADAT, A.; MAHOZI, A. I.; SINAN, A. S. *et al.* The Platelet Count and its Implications in Sickle Cell Disease Patients Admitted for Intensive Care. **Indian J Crit Care Med**, 22, n. 8, p. 585-590, Aug 2018.

SILVA-PINTO, A. C.; ALENCAR DE QUEIROZ, M. C.; ANTONIAZZO ZAMARO, P. J.; ARRUDA, M. *et al.* The Neonatal Screening Program in Brazil, Focus on Sickle Cell Disease (SCD). **Int J Neonatal Screen**, 5, n. 1, p. 11, Mar 2019.

SONMEZ, C.; YILDIZ, U.; AKKAYA, N.; TANELI, F. Preanalytical Phase Errors: Experience of a Central Laboratory. **Cureus**, 12, n. 3, p. e7335, Mar 20 2020.

ST JOHN, P. A. Toxicity of "DiI" for embryonic rat motoneurons and sensory neurons in vitro. **Life Sci**, 49, n. 26, p. 2013-2021, 1991.

STEINBERG, M. H. Fetal Hemoglobin in Sickle Hemoglobinopathies: High HbF Genotypes and Phenotypes. **J Clin Med**, 9, n. 11, Nov 23 2020.

STEINBERG, M. H.; CHUI, D. H.; DOVER, G. J.; SEBASTIANI, P. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? **Blood**, 123, n. 4, p. 481-485, Jan 23 2014.

SUN, K.; ZHANG, Y.; BOGDANOV, M. V.; WU, H. *et al.* Elevated adenosine signaling via adenosine A2B receptor induces normal and sickle erythrocyte sphingosine kinase 1 activity. **Blood**, 125, n. 10, p. 1643-1652, Mar 05 2015.

SZUBERSKI, J.; OLIVEIRA, J. L.; HOYER, J. D. A comprehensive analysis of hemoglobin variants by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Int J Lab Hematol**, 34, n. 6, p. 594-604, Dec 2012.

THAME, M.; GRANDISON, Y.; MASON, K.; THOMPSON, M. *et al.* The red cell distribution width in sickle cell disease--is it of clinical value? **Clin Lab Haematol**, 13, n. 3, p. 229-237, 1991.

THOMAS, C.; LUMB, A. B. Physiology of haemoglobin. **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, 12, n. 5, p. 251-256, 2012.

UENO, H.; BENJAMIN, L. J.; MANNING, J. M. Effects of methyl acetyl phosphate on hemoglobin S: a novel acetylating agent directed towards the DPG binding site. **Prog Clin Biol Res**, 240, p. 105-110, 1987.

UENO, H.; MANNING, J. M. Methyl acetyl phosphate, a new type of antisickling agent: site-specific acetylating agent toward the 2,3-DPG binding site in hemoglobin S. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, 10, n. 4, p. 348-350, Winter 1988.

UENO, H.; YATCO, E.; BENJAMIN, L. J.; MANNING, J. M. Effects of methyl acetyl phosphate, a covalent antisickling agent, on the density profiles of sickle erythrocytes. **J Lab Clin Med**, 120, n. 1, p. 152-158, Jul 1992.

UYOGA, S.; MACHARIA, A. W.; MOCHAMAH, G.; NDILA, C. M. *et al.* The epidemiology of sickle cell disease in children recruited in infancy in Kilifi, Kenya: a prospective cohort study. **Lancet Glob Health**, 7, n. 10, p. e1458-e1466, Oct 2019.

VASSAR, P. S.; HARDS, J. M.; BROOKS, D. E.; HAGENBERGER, B. *et al.* Physicochemical effects of aldehydes on the human erythrocyte. **J Cell Biol**, 53, n. 3, p. 809-818, Jun 1972.

VEKILOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **Br J Haematol**, 139, n. 2, p. 173-184, Oct 2007.

VOON, H. P.; VADOLAS, J. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. **Haematologica**, 93, n. 12, p. 1868-1876, Dec 2008.

WAN AZMAN, W. N.; OMAR, J.; KOON, T. S.; TUAN ISMAIL, T. S. Hemolyzed Specimens: Major Challenge for Identifying and Rejecting Specimens in Clinical Laboratories. **Oman Med J**, 34, n. 2, p. 94-98, Mar 2019.

WANG, J.; HERTZ, L.; RUPPENTHAL, S.; EL NEMER, W. *et al.* Lysophosphatidic Acid-Activated Calcium Signaling Is Elevated in Red Cells from Sickle Cell Disease Patients. **Cells**, 10, n. 2, Feb 20 2021.

WANG, L.; HOFFMAN, R. A. Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. **Curr Protoc Cytom**, 79, p. 1 3 1-1 3 27, Jan 5 2017.

WANG, Q.; ZENNADI, R. The Role of RBC Oxidative Stress in Sickle Cell Disease: From the Molecular Basis to Pathologic Implications. **Antioxidants (Basel)**, 10, n. 10, Oct 13 2021.

WANG, X.; THEIN, S. L. Switching from fetal to adult hemoglobin. **Nat Genet**, 50, n. 4, p. 478-480, Apr 2018.

WARE, R. E. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**, 115, n. 26, p. 5300-5311, Jul 1 2010.

WARE, R. E. Hydroxycarbamide: clinical aspects. **C R Biol**, 336, n. 3, p. 177-182, Mar 2013.

WATSON, J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. **Am J Med Sci**, 215, n. 4, p. 419-423, Apr 1948.

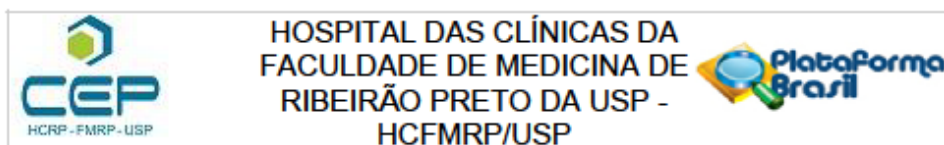
WEST, M. S.; WETHERS, D.; SMITH, J.; STEINBERG, M. Laboratory profile of sickle cell disease: a cross-sectional analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **J Clin Epidemiol**, 45, n. 8, p. 893-909, Aug 1992.

WU, L. C.; SUN, C. W.; RYAN, T. M.; PAWLIK, K. M. *et al.* Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. **Blood**, 108, n. 4, p. 1183-1188, Aug 15 2006.

YASARA, N.; PREMAWARDHENA, A.; METTANANDA, S. A comprehensive review of hydroxyurea for beta-haemoglobinopathies: the role revisited during COVID-19 pandemic. **Orphanet J Rare Dis**, 16, n. 1, p. 114, Mar 1 2021.

ZENG, F.; YANG, W.; HUANG, J.; CHEN, Y. *et al.* Determination of the lowest concentrations of aldehyde fixatives for completely fixing various cellular structures by real-time imaging and quantification. **Histochem Cell Biol**, 139, n. 5, p. 735-749, May 2013.

ZHANG, Y.; DAI, Y.; WEN, J.; ZHANG, W. *et al.* Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease. **Nat Med**, 17, n. 1, p. 79-86, Jan 2011.

Anexo 1. Aprovação e Parecer Consubstanciado do comitê de Ética e Pesquisa**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: ESTUDO DE MARCADORES E MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DOENÇA FALCIFORME

Pesquisador: Maria Luiza Arrojo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52163521.5.0000.5440

Instituição Proponente: Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.044.454

Apresentação do Projeto:

A anemia falciforme (AF) é um distúrbio monogênico causado por uma mutação pontual no gene HBB, que resulta em uma variante estrutural da hemoglobina falciforme (HbS). Quando os eritrócitos são expostos a uma baixa tensão de oxigênio, a hemoglobina S se polimeriza causando alterações na morfologia eritrocitária, promovendo assim fenômenos vaso-oclusivos que resultam em altas taxas de mortalidade e morbidade. Dada a gravidade da doença, ainda o único fator protetor contra a polimerização é a hemoglobina do tipo Fetal (HbF), assim embora a AF seja uma patologia com diagnóstico bem estabelecido, há uma carência de metodologias laboratoriais para prever o desfecho clínico e ocorrências vasooclusivas. Em linha, adenosina (ADO) é um nucleosídeo purínico, sintetizado a partir do catabolismo de mononucleotídeos de adenina (ATP, NAD⁺, AMP e ADP) que atuam como importantes mediadores intracelular e extracelular, capazes de interceder múltiplos processos fisiológicos e patológicos. Da mesma maneira, os eritrócitos normais e falciformes expressam diversos componentes envolvidos na síntese, degradação, transporte e sinalização da adenosina, especialmente o CD38, CD73, CD203a e transportadores de nucleosídeos bidirecionais (ENT1). No entanto, a relação dos papéis protetores ou pró-falcização destas moléculas, ainda permanecem poucos explorados na AF. O objetivo deste trabalho é avaliar utilizando microscopia de fluorescência automatizada, o papel da adenosina em eritrócitos provenientes de AF, bem como analisar o efeito protetor de HbF, ENT1 e CD38, comparando a

Endereço: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/Campus Universitário, Prédio Central-
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



**COMISSÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER
DE RIBEIRÃO PRETO - MATER**

Ref.: Projeto de Pesquisa: Estudo de marcadores e mecanismos moleculares envolvidos na doença falciforme.

Nº 008/2021

Maria Luiza Arrojo

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clínica do CRSM-Mater no dia 19/07/2021 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

- 1- Apresentação do parecer do CEP antes do início da abordagem de potenciais sujeitos para o estudo
- 2- Apresentação de relatórios parciais (Anexo 3), semestralmente, indicando o andamento da pesquisa.
- 3- Apresentação de relatório final de pesquisa (Anexo 3) que deverá ser acompanhado de um resumo estruturado da mesma (uma lauda, contendo introdução, métodos, resultados e conclusões) para a documentação do projeto de pesquisa junto ao CRSM-Mater
- 4- Todos os procedimentos relacionados ao projeto de pesquisa que não estejam dentro da rotina do serviço deverão ser realizados pela equipe do projeto, não se utilizando de funcionários da instituição.

Atenciosamente,

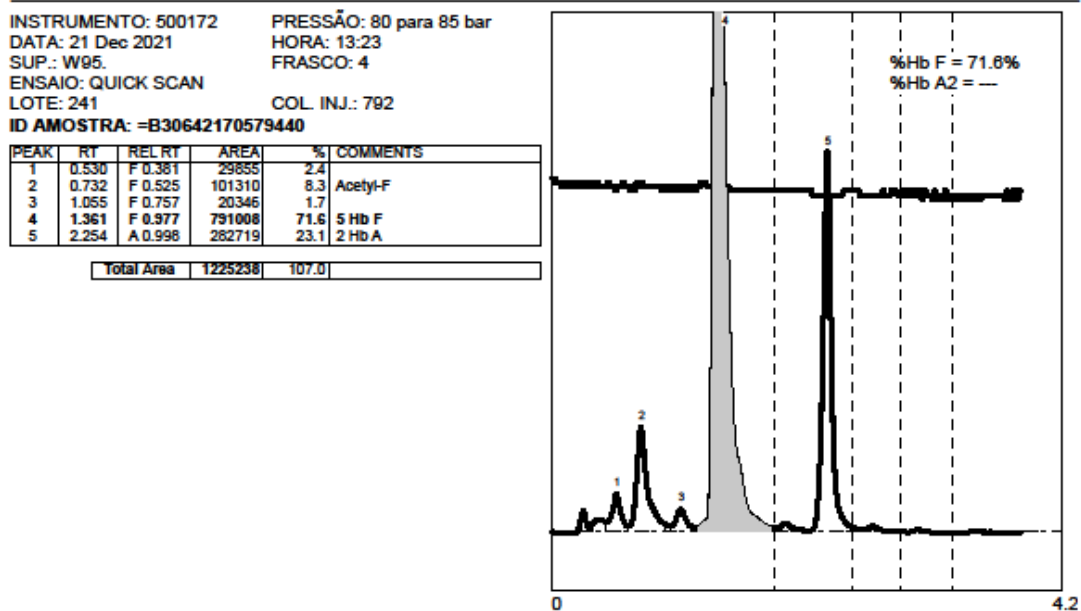
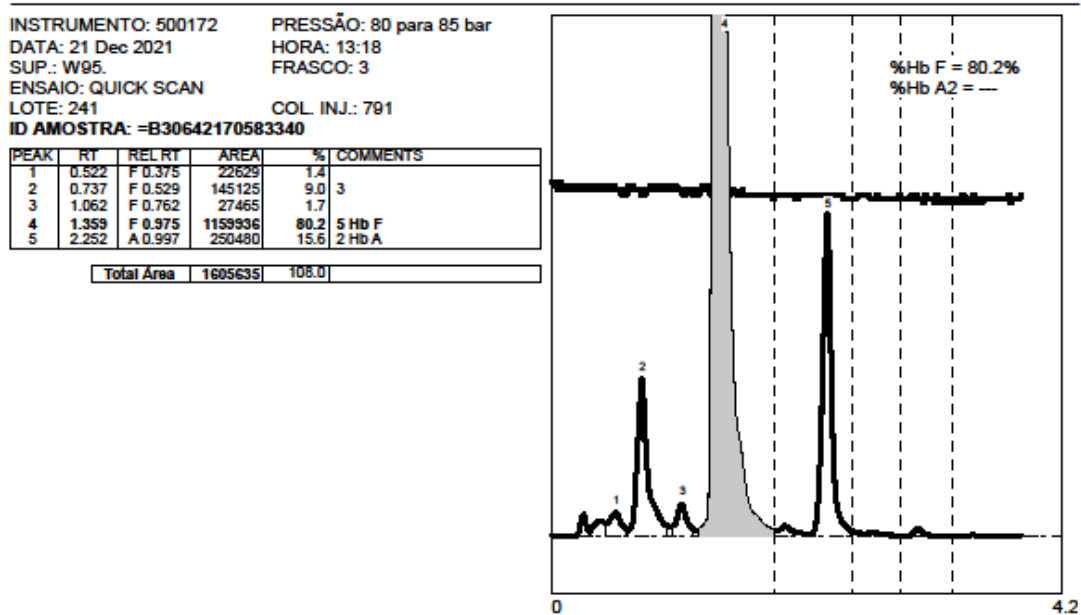
PROFª. DRª. CAROLINA SALES VIERA MACEDO
Presidente da Comissão de Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher de
Ribeirão Preto - MATER

Av. Wanderley Taffo, nº 330 – Quintino Facci II - CEP 14070-250 – Ribeirão Preto – SP
Fone: (16) 3962-8200 - Fax: (16) 3962-8213

Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa referente ao Centro de Referência da Saúde da Mulher (MATER).

Anexo 3. Gráficos derivados de HPLC obtidos das amostras de cordão umbilical.

Trinity Biotech Premier Resolution, 2.0.4.5 SN: 500172 - Pág. 3 -

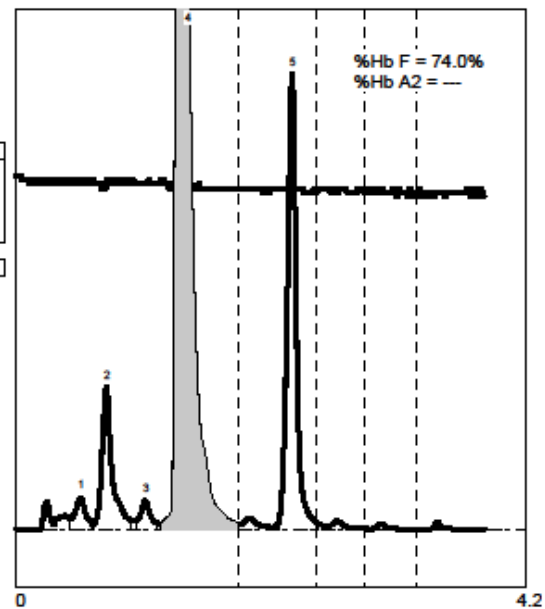


Trinity Biotech Premier Resolution, 2.0.4.5 SN: 500172 - Pág. 2 -

INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 80 para 85 bar
 DATA: 21 Dec 2021 HORA: 13:10
 SUP.: W95. FRASCO: 1
 ENSAIO: QUICK SCAN
 LOTE: 241 COL. INJ.: 789
 ID AMOSTRA: =B30642170581640

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	0.530	F 0.380	28906	1.8	
2	0.740	F 0.532	128646	7.9	3
3	1.060	F 0.761	24584	1.5	
4	1.353	F 0.971	1089697	74.0	5 Hb F
5	2.259	A 1.000	360569	22.1	2 Hb A

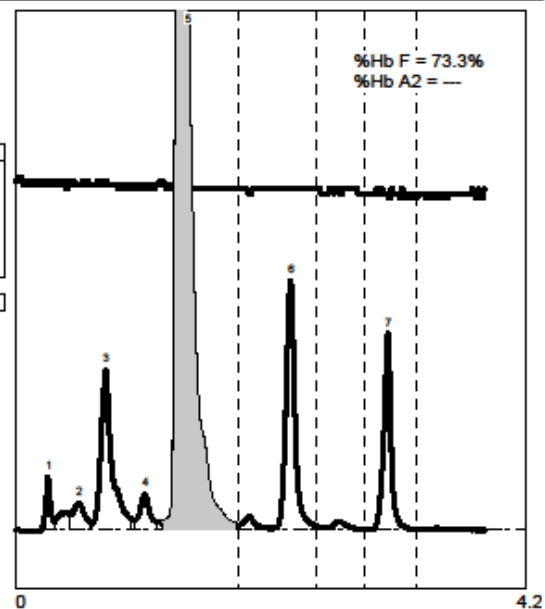
Total Area	1632402	107.3
------------	---------	-------



INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 80 para 85 bar
 DATA: 21 Dec 2021 HORA: 13:14
 SUP.: W95. FRASCO: 2
 ENSAIO: QUICK SCAN
 LOTE: 241 COL. INJ.: 790
 ID AMOSTRA: =B30642170582540

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	0.266	F 0.191	21220	1.3	
2	0.514	F 0.369	28279	1.7	
3	0.735	F 0.527	159234	9.6	3
4	1.054	F 0.757	31960	1.9	
5	1.353	F 0.971	1096307	73.3	5 Hb F
6	2.246	A 0.994	195124	11.8	2 Hb A
7	3.040	S 0.995	126108	7.6	9 Consistent with Hb S

Total Area	1658232	107.2
------------	---------	-------



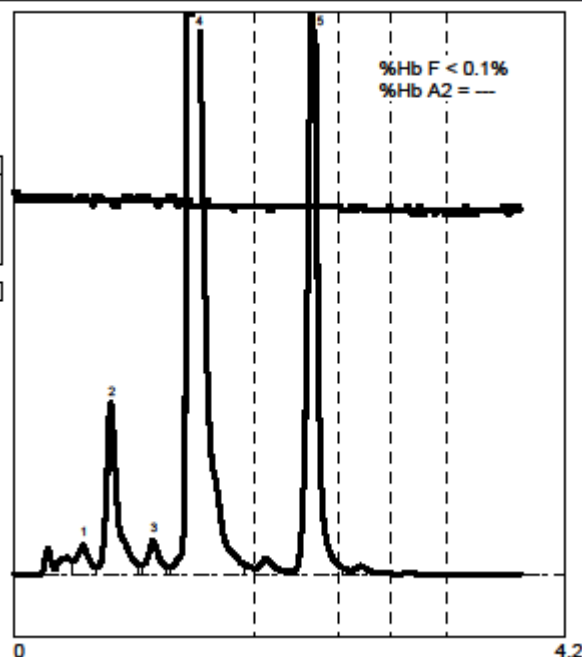
Trinity Biotech 21-Dec-2021

Trinity Biotech Premier Resolution, 2.0.4.5 SN: 500172 - Pág. 4 -

INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 80 para 85 bar
 DATA: 21 Dec 2021 HORA: 13:27
 SUP.: W95. FRASCO: 5
 ENSAIO: QUICK SCAN
 LOTE: 241 COL. INJ.: 793
 ID AMOSTRA: =B30642170584940

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	0.523	F 0.375	25631	1.3	
2	0.736	F 0.529	141844	7.5	3
3	1.056	F 0.758	27991	1.5	
4	1.349	F 0.968	1234361	64.9	3
5	2.263	A 1.002	472524	24.8	2 Hb A

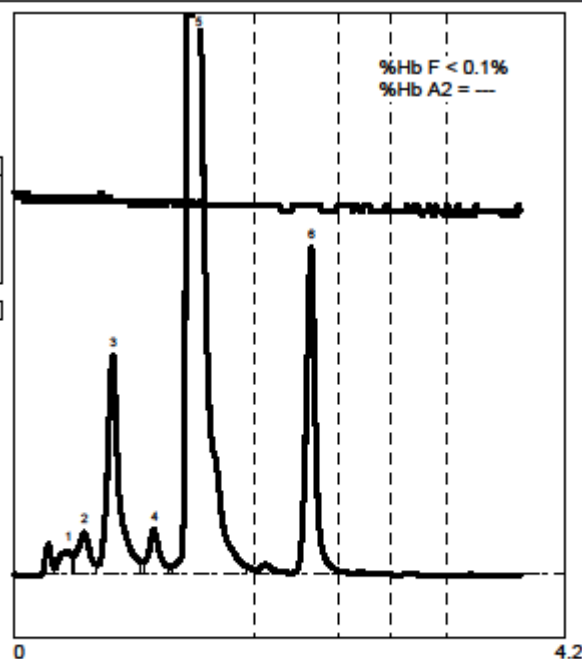
Total Area	1902351	100.0
------------	---------	-------



INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 80 para 85 bar
 DATA: 21 Dec 2021 HORA: 13:31
 SUP.: W95. FRASCO: 6
 ENSAIO: QUICK SCAN
 LOTE: 241 COL. INJ.: 794
 ID AMOSTRA: =B30642170581740

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	0.408	F 0.292	20403	1.0	
2	0.532	F 0.382	37953	1.9	
3	0.748	F 0.536	192440	9.7	3
4	1.061	F 0.761	36778	1.8	
5	1.344	F 0.964	1475737	74.2	3
6	2.248	A 0.995	225377	11.3	2 Hb A

Total Area	1988688	100.0
------------	---------	-------



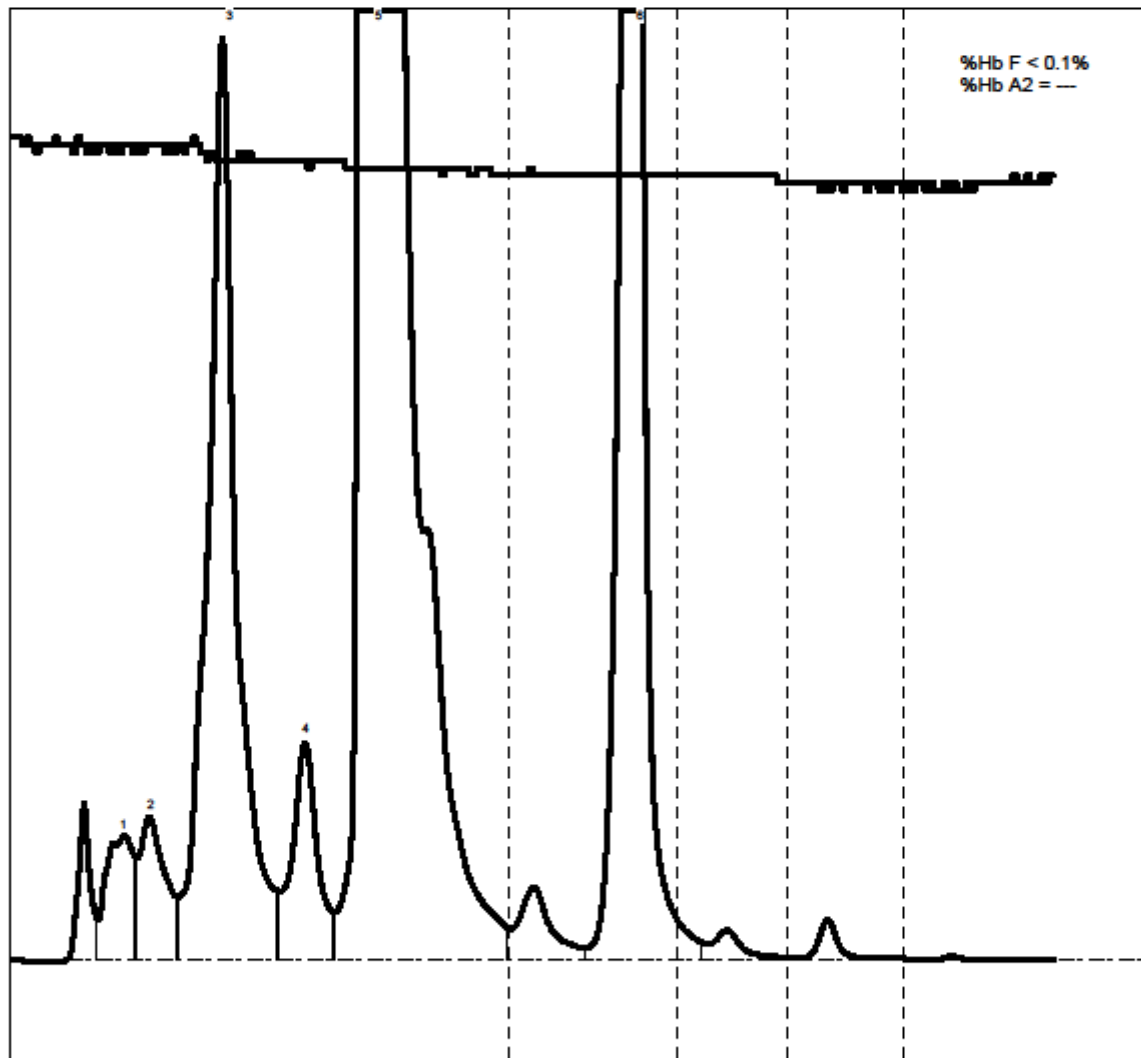
Trinity Biotech 21-Dec-2021

Trinity Biotech Premier Resolution, 2.0.4.5 SN: 500172 - Pág. 12 -

INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 101 para 108 bar
 DATA: 17 Sep 2021 HORA: 14:37
 SUP.: H3%r FRASCO: 1
 ENSAIO: QUICK SCAN
 LOTE: 138 COL. INJ.: 899
 ID AMOSTRA: *NoID*

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	0.417	F 0.296	70743	1.3	
2	0.516	F 0.366	79353	1.5	
3	0.782	F 0.555	568614	10.5	3
4	1.085	F 0.771	116968	2.2	
5	1.325	F 0.941	3603752	66.7	3
6	2.286	A 1.013	959704	17.8	2 Hb A

Total Area	5399134	100.0
------------	---------	-------



0

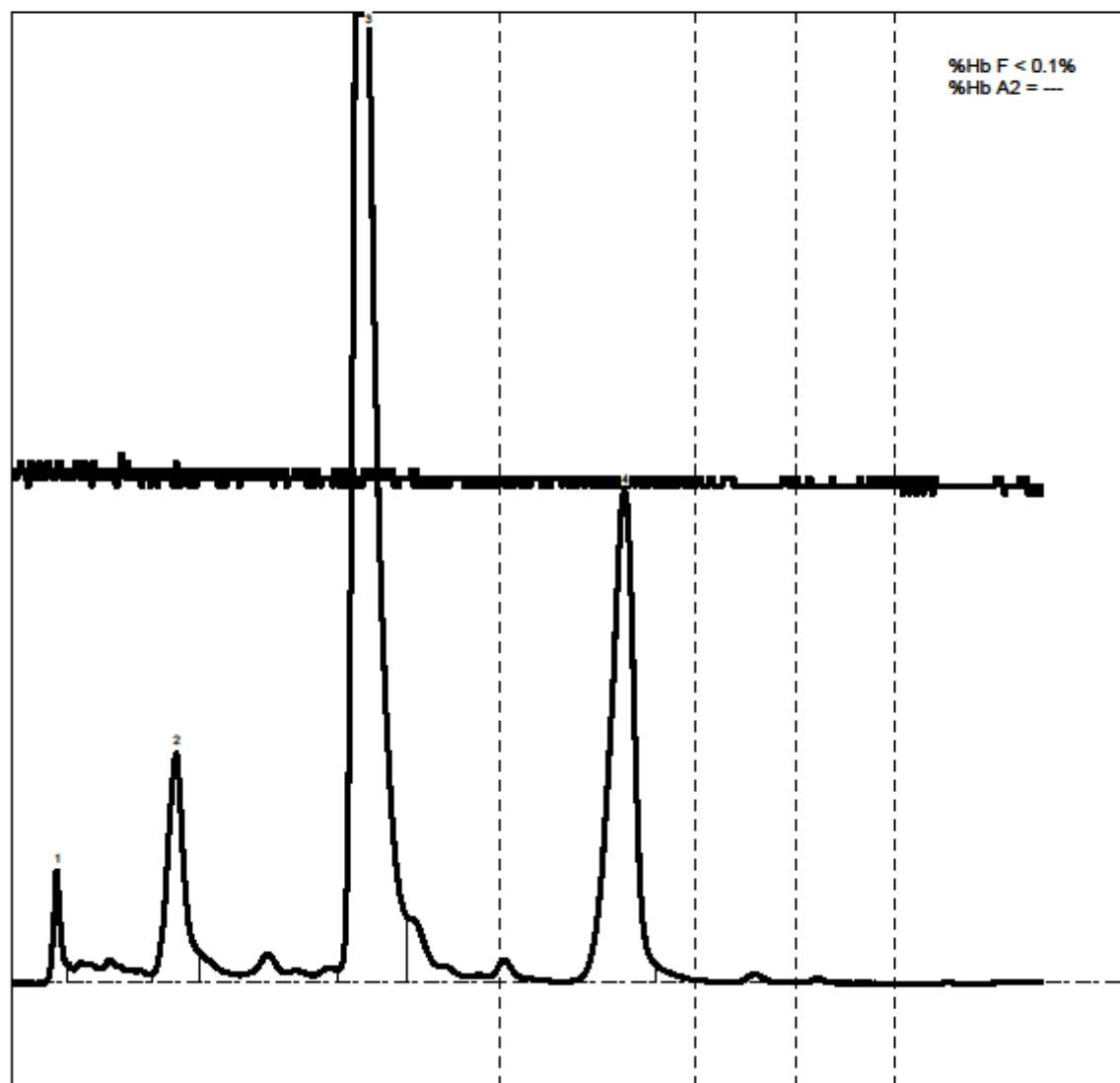
4.2

Trinity Biotech 09-Dec-2021

INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 63 para 68 bar
 DATA: 24 Jun 2022 HORA: 15:18
 SUP.: H3%P FRASCO: 1
 ENSAIO: HIGH RESOLUTION
 LOTE: 458 COL. INJ.: 851
 ID AMOSTRA: *NoID*

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	0.342	F 0.128	33448	1.7	
2	1.226	F 0.458	165528	8.6	Variant
3	2.604	F 0.972	1237501	64.0	Variant
4	4.564	A 0.996	496695	25.7	2 Hb A

Total Area	1933172	100.0
------------	---------	-------



0

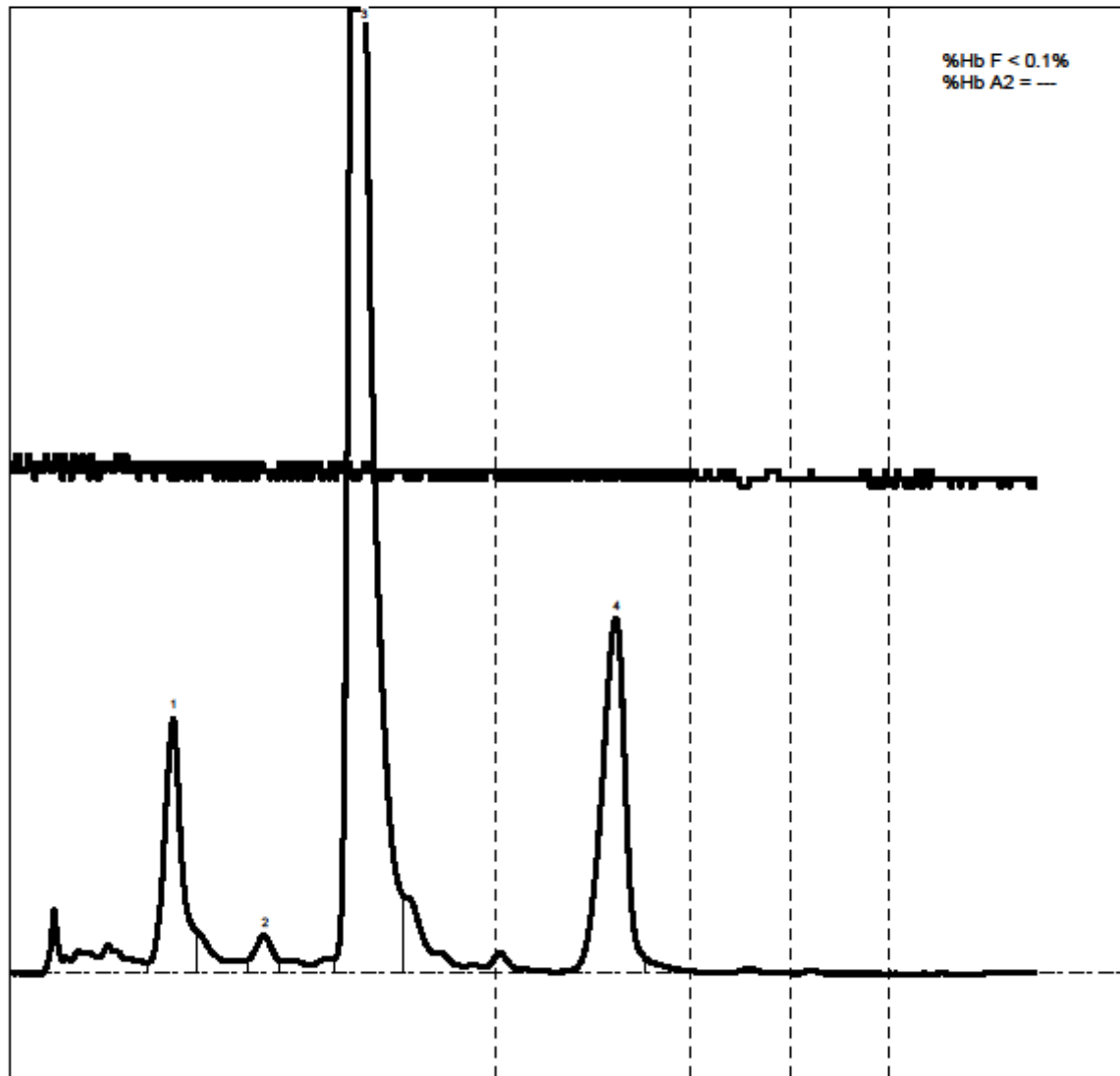
8.3

Trinity Biotech Premier Resolution, 2.0.4.5 SN: 500172 - Pág. 40 -

INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 63 para 67 bar
 DATA: 24 Jun 2022 HORA: 15:24
 SUP.: H3%P FRASCO: 2
 ENSAIO: HIGH RESOLUTION
 LOTE: 458 COL. INJ.: 852
 ID AMOSTRA: *NoID*

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	1.226	F 0.458	189752	9.6	Variant
2	1.909	F 0.713	28620	1.5	
3	2.602	F 0.971	1395119	70.8	Variant
4	4.534	A 0.989	356521	18.1	2 Hb A

Total Area	1970212	100.0
------------	---------	-------



0

8.3

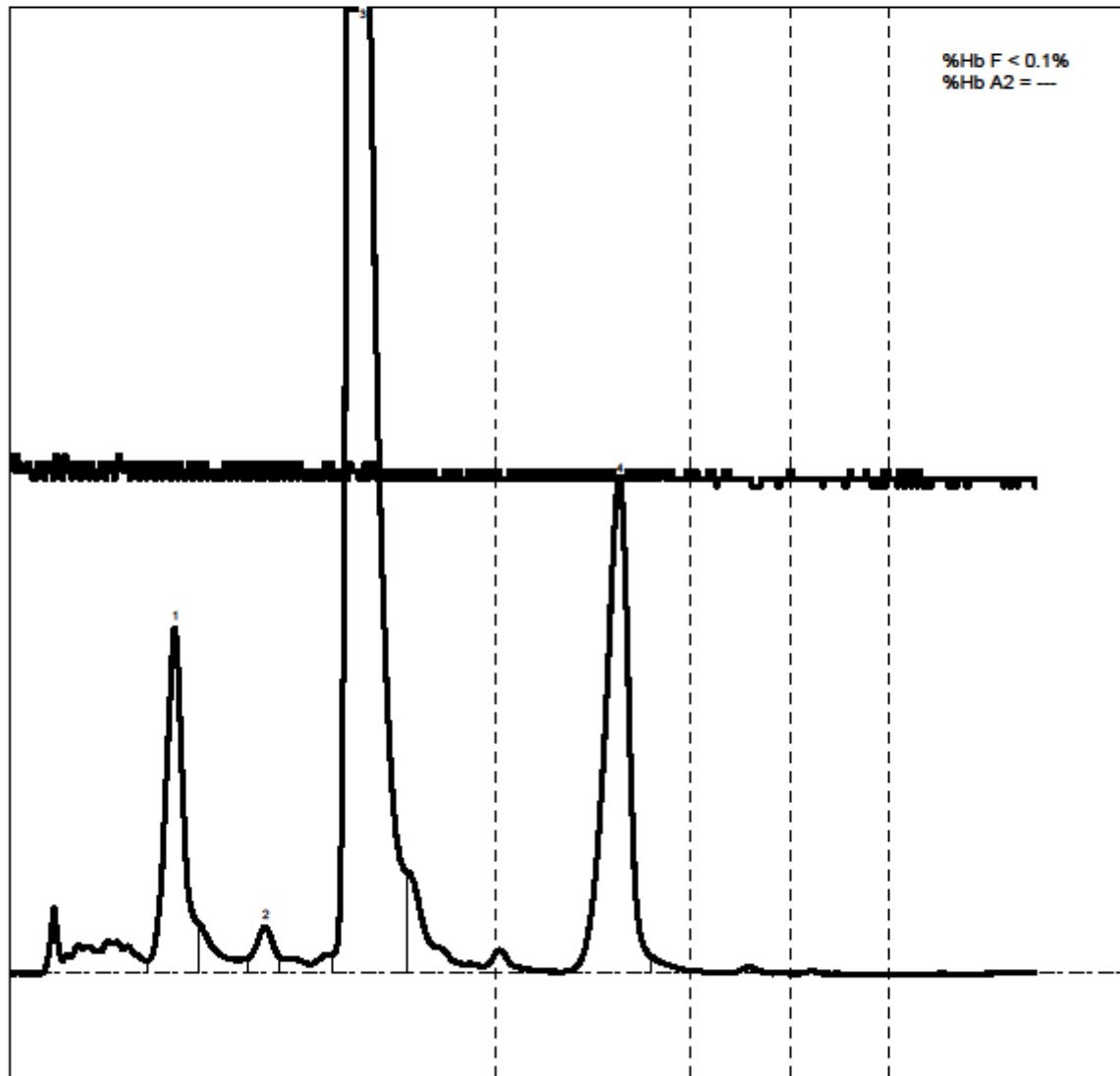
Trinity Biotech 24-Jun-2022

Trinity Biotech Premier Resolution, 2.0.4.5 SN: 500172 - Pág. 41 -

INSTRUMENTO: 500172 PRESSÃO: 63 para 67 bar
 DATA: 24 Jun 2022 HORA: 15:33
 SUP.: H3%P FRASCO: 3
 ENSAIO: HIGH RESOLUTION
 LOTE: 458 COL. INJ.: 853
 ID AMOSTRA: *NoID*

PEAK	RT	REL RT	AREA	%	COMMENTS
1	1.238	F 0.462	261685	8.8	Variant
2	1.918	F 0.716	35912	1.2	
3	2.591	F 0.967	2169501	73.2	Variant
4	4.560	A 0.995	498337	16.8	2 Hb A

Total Area	2965435	100.0
------------	---------	-------

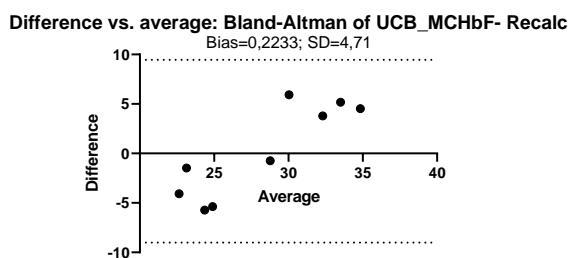
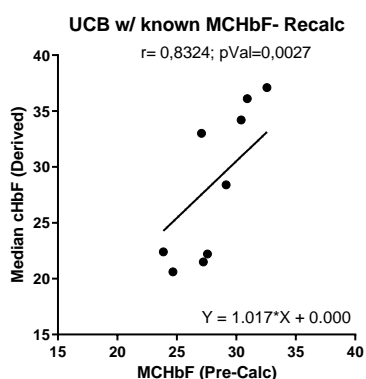
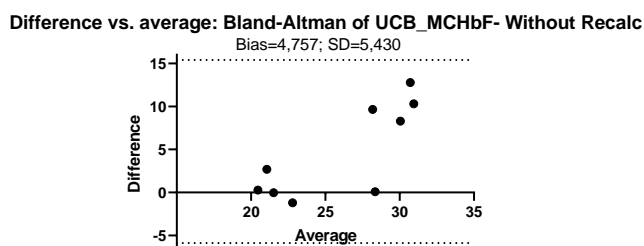
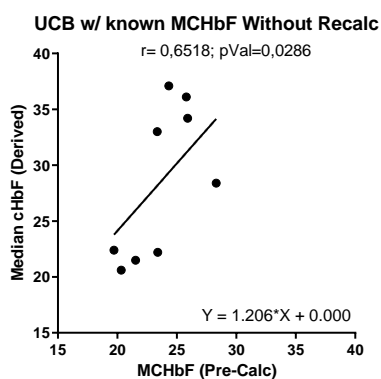


0

8.3

Trinity Biotech 24-Jun-2022

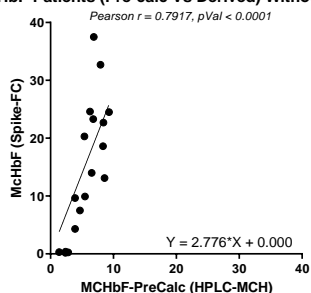
Anexo 4. Gráficos de correlação e de comparação obtidos das amostras de Cordão umbilical recalculadas com base no percentual de Hemoglobina Fetal acetilada ou não.



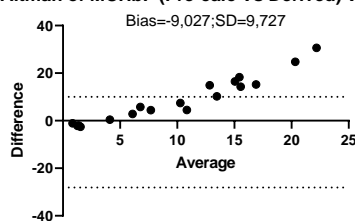
Os gráficos superiores demonstram a correlação derivada do MCHbF estimado com base nos dados de HPLC (%HbF) e de um contador automatizado (MCH) ou derivadas do método de citometria de fluxo quantitativo utilizando o controle Spike-In, estas amostras de cordão umbilical não tiveram suas porcentagens recalculadas levando em conta a área percentual de HbF acetilada. O gráfico inferior demonstra a mesma medida correlação descrita acima com as mesmas amostras de cordão umbilical corrigidas levando em conta os valores de HbF acetilada. Os gráficos de Bland-Altman derivados das duas condições representam a diferença média (Viés "Bias") entre os métodos, juntamente com o desvio padrão obtido nas diferentes condições, as linhas tracejadas representam o limite de concordância equivalentes a 95%.

Anexo 5. Gráficos de correlação e de comparação obtidos das amostras de pacientes que tiveram o MCHbF estimado por HPLC

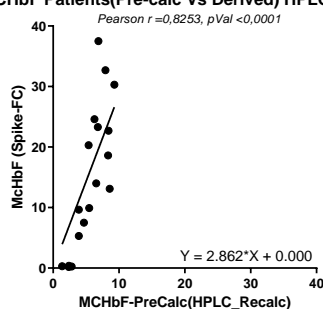
MCHbF Patients (Pre-calc Vs Derived) Without Recalc



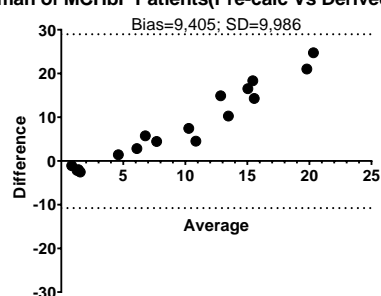
Bland-Altman of MCHbF (Pre-calc Vs Derived) Without recal



MCHbF Patients(Pre-calc Vs Derived) HPLC Recalc

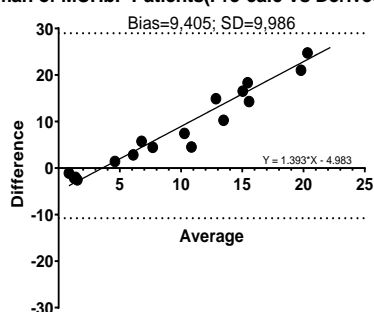


Bland-Altman of MCHbF Patients(Pre-calc Vs Derived) HPLC Recalc

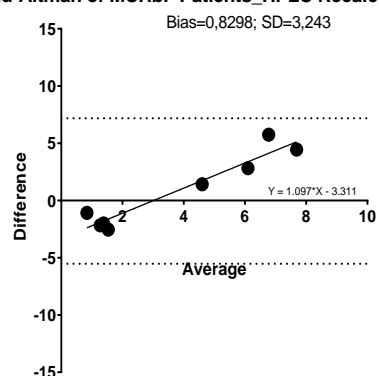


Os gráficos superiores demonstram a correlação derivada do MCHbF estimado com base nos dados de HPLC (%HbF) e de um contador automatizado (MCH) ou derivadas do método de citometria de fluxo quantitativo utilizando o controle Spike-In em amostras de pacientes antes e após a correção levando em conta os valores de HbF acetilada. Os gráficos de Bland-Altman derivados das duas condições representam a diferença média (Viés "Bias") entre os métodos, juntamente com o desvio padrão obtido nas diferentes condições, as linhas tracejadas representam o limite de concordância equivalentes a 95%.

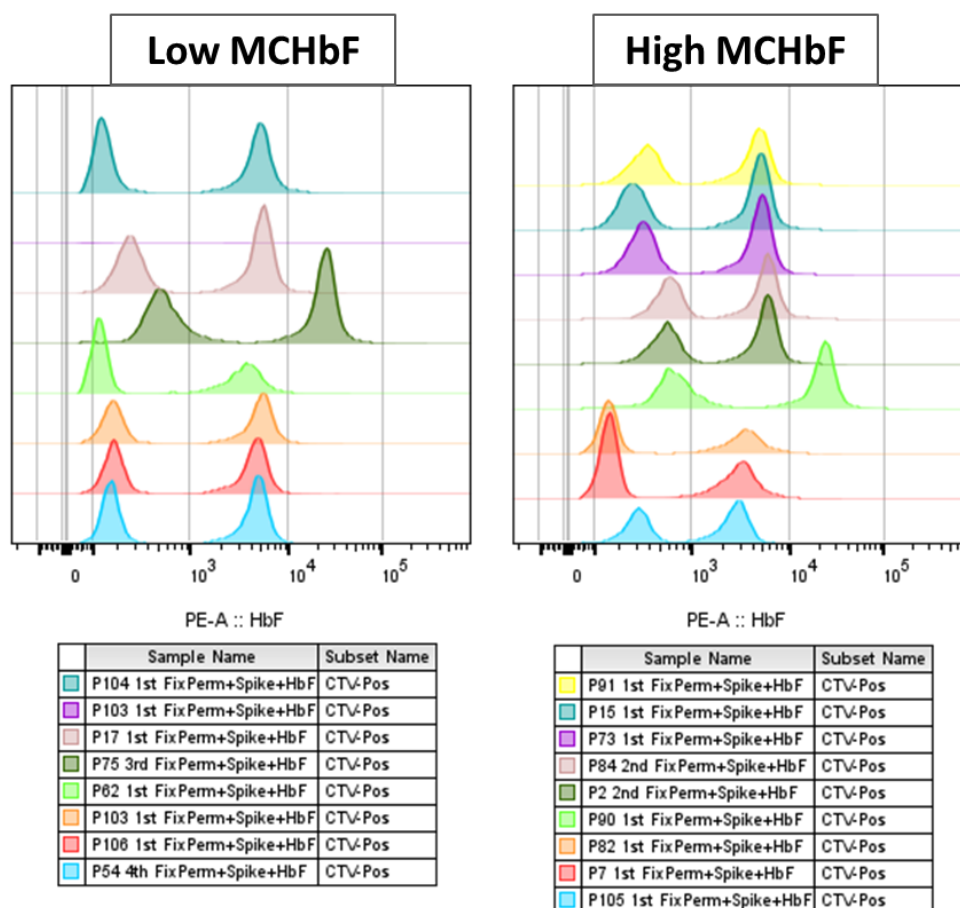
Bland-Altman of MCHbF Patients(Pre-calc Vs Derived) HPLC Recalc



Bland-Altman of MCHbF Patients_HPLC Recalc-Limitation



Anexo 6. Padrão de distribuição da marcação com anti-HbF nas amostras de Spike contidas em pacientes com alto MCHbF e baixo MCHbF



Anexo 7. Comparação entre a média da intensidade de fluorescência do Spike-In considerando a marcação com anti-HbF contidos nas amostras com baixo MCHbF e alto MCHbF

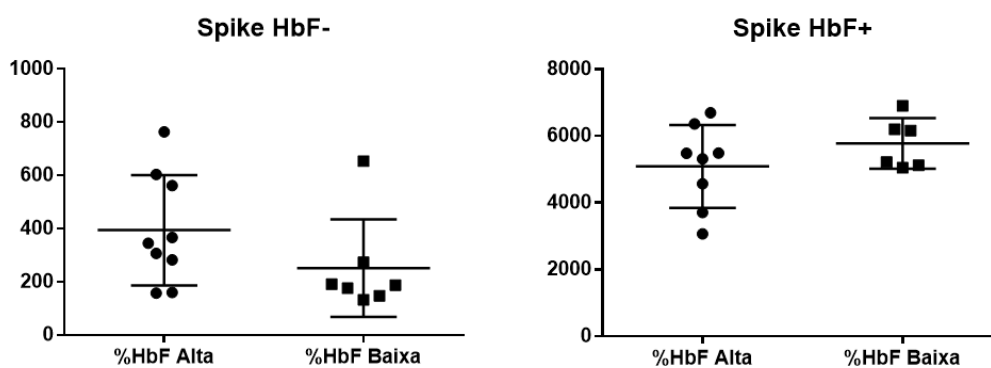


Gráfico demonstrando as diferenças obtidas na média da intensidade de fluorescência do PE-HbF nO Spike-In HbF+ e HbF- contido nas amostras de pacientes com alto MCHbF e baixo MCHbF. Teste T-não paramétrico. Os testes não obtiveram significância estatística.