

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**

**Isabela Delfino Moreira**

**Parâmetros Hematológicos Avançados  
como Medida de Adesão à Hidroxiureia  
em Pacientes com Anemia Falciforme**

**UFCSPA**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre**

**Porto Alegre  
2022**

**Isabela Delfino Moreira**

# **Parâmetros Hematológicos Avançados como Medida de Adesão a Hidroxiureia em Pacientes com Anemia Falciforme**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dra. Liane Nanci Rotta  
Coorientadora: Dra. Maria Cristina Werlang  
Coorientadora: Dra. Laura Maria Fogliatto

**Porto Alegre  
2022**

#### Catálogo na Publicação

Moreira, Isabela Delfino

Parâmetros Hematológicos Avançados como Medida de Adesão a Hidroxiureia em Pacientes com Anemia Falciforme / Isabela Delfino Moreira. -- 2022.

136 f. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Orientador(a): Dra. Liane Nanci Rotta ;  
coorientador(a): Dra. Maria Cristina Werlang, Dra. Laura Maria Fogliatto.

1. Anemia Falciforme. 2. Parâmetros Clínicos Avançados. 3. Adesão ao tratamento. 4. Hidroxiureia. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Dra. Liane Rotta, Dra. Maria Cristina Werlang e Dra. Laura Fogliatto pela oportunidade de desenvolver um trabalho tão bonito. A paciência e o apoio incansável de vocês foram essenciais nessa caminhada.

Agradeço também a UFCSPA por fazer parte de mais uma etapa de meu desenvolvimento profissional. Dentro dessas paredes encontrei grandes amigos e excelentes professores que me mostraram no dia-a-dia como ser uma profissional exemplar.

Também gostaria de deixar meu enorme agradecimento à bolsista de iniciação científica Laura Dewes Schmitz e aos colegas do grupo de pesquisa, Gueverson Rocha, Viviane Schmitt e Carem Lessa pelo excelente trabalho na construção e desenvolvimento desse projeto.

À minha família e amigos pelo incentivo nos momentos difíceis e pelo amor incondicional demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho. Muito obrigada por tudo!

*“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas e os resultados somente através das experiências.”*

*Carl Gustav*

## RESUMO

**Introdução:** A anemia falciforme (AF) caracteriza-se por fenômenos inflamatórios crônicos exacerbados por episódios agudos de falcização e vaso-oclusão. O uso correto da hidroxiureia (HU) leva à estabilização do paciente, reduzindo a frequência de crises e internações hospitalares. Diante das complicações associadas à patologia e baixa adesão ao HU, há necessidade de buscar parâmetros que identifiquem alterações recentes no *status* do paciente. Os Parâmetros Clínicos Avançados do hemograma (PCAs) permitem uma análise precoce da hematopoiese. O objetivo desse estudo foi traçar o perfil demográfico de pacientes com AF não aderentes ao tratamento e avaliar os PCAs (IG, NRBC, IRF, IPF, RET-He e PLT-F) como medida de adesão à HU. **Metodologia:** Em um estudo transversal, alocamos 83 indivíduos com AF nos seguintes estratos etários: Crianças (<12 anos) e Adolescentes/Adultos (≥12 anos). Os pacientes foram acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e tratados com HU, entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019. As variáveis analisadas foram obtidas por meio de consulta ao banco do equipamento Sysmex XN-9000, prontuários eletrônicos dos pacientes no sistema do HCPA e consulta ao sistema de registro de retirada de comprimidos da farmácia. **Resultados:** A amostra apresentou taxa de adesão geral de 84%. Os adolescentes foram menos aderentes ao tratamento e efeitos adversos aos medicamentos impactaram negativamente a adesão no grupo de Adolescentes/Adultos. Pacientes não aderentes desse grupo tiveram aumento significativo de leucócitos, na contagem absoluta de neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos, RBC, RET, RDW e PLT, e diminuição significativa do VCM e HCM. Indivíduos do grupo Adolescentes/Adultos com a contagem absoluta de IG  $\geq 0,035$  células/mm<sup>3</sup> tiveram o RR para baixa adesão aumentado em 4,6x (p=0,014). Nesses indivíduos, o índice de inflamação imune sistêmica (SII) também foi significativamente maior (p=0,042). **Conclusão:** A contagem absoluta de IGs mostrou utilidade clínica na identificação precoce da baixa adesão ao tratamento com HU, principalmente quando combinada com outros parâmetros. Sugerimos o uso dos PCAs, pois podem ser facilmente implementados na rotina laboratorial.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme. Parâmetros avançados do hemograma. Adesão ao tratamento.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sickle cell anemia (SCA) is characterized by chronic inflammatory phenomena exacerbated by acute episodes of sickling and vaso-occlusion. The correct use of hydroxyurea (HU) leads to patient stabilization, reducing the frequency of crises and hospital admissions. Given the complications associated with the pathology and low adherence to HU, there is a need to seek parameters that identify recent changes in the patient's status. The Advanced Clinical Parameters of the blood count (ACPs) allow an early analysis of hematopoiesis. **Objectives:** To draw the demographic profile of non-adherent patients with SCA and to verify the usefulness of ACPs as a measure of adherence to HU. **Methodology:** cross-sectional study comprising 83 individuals divided into Children (<12 years old) and Adolescents/Adults ( $\geq 12$  years old). The patients were followed at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) and treated with HU, between January 2018 and December 2019. The variables analyzed were obtained by consulting the Sysmex XN-9000 database, electronic medical charts in the HCPA system, and consults to the pharmacy's pill-taking registration system. **Results:** The sample had an overall adherence rate of 84%. Adolescents were less adherent to treatment and adverse effects to medication negatively impacted adherence in the Adolescents/Adults group. Patients  $\geq 12$  years old had significantly increased WBC, absolute counts of neutrophils, lymphocytes, monocytes, and basophils, RBC, RET, RDW, and PLT, and significantly decreased MCV and MCH. Subjects in the Adolescent/Adult group with an absolute IG count  $\geq 0.035$  cells/mm<sup>3</sup> had the RR for low adhesion increased by 4.6 times ( $p=0.014$ ). In these individuals, the systemic immune inflammation index (SII) was also significantly higher ( $p=0.042$ ). **Conclusion:** Absolute IG count has shown clinical utility in early identification of non-adherence, especially when combined with other parameters. We suggest the use of ACPs, as they can be easily implemented in laboratory routines.

**Keywords:** Sickle Cell Anemia. Advanced Clinical Parameters. Treatment adherence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura tetramérica de uma hemoglobina .....	14
Figura 2 - Alterações genéticas em HBB .....	16
Figura 3 – Hemácias em foice registradas por J. B. Herrick em 1910.....	18
Figura 4 - Mapa do número estimado de nascidos com anemia falciforme .....	19
Figura 5 - Complicações clínicas da doença falciforme .....	24
Figura 6 - Eletroforese de hemoglobina .....	30
Figura 7 - Inibição induzida por hidroxycarbamida da ribonucleotídeo difosfato redutase em células em proliferação para inibir a síntese de DNA .....	31
Figura 8 - Múltiplos mecanismos de ação da HU para AF .....	34
Figura 9 – Mudanças no esfregaço de sangue periférico a partir da terapia com HU. .....	35
Figura 10 – O princípio do funcionamento de um citômetro de fluxo. ....	41
Figura 11 – Scattergram mostrando a dispersão dos diferentes estágios de maturação reticulocitária. ....	43
Figura 12 – Scattergram do canal PLT-F com uma distribuição normal de células...50	
Figura 13 - Clusters formados pelas células sanguíneas, utilizando a metodologia SAFLAS.....	56
Figura 14 - Modelo conceitual do efeito de diferentes fatores na adesão a fármacos .....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos novos para doença falciforme (DF) registrados no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), 2014 a 2019, Brasil. ....	20
Tabela 2 - Estudos em andamento ou completos para DF .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

% Hypo-He	Porcentagem de Hemácias Hipocrômicas
%IPF	Porcentagem de IPF
% Micro-R	Porcentagem de Hemácias Microcíticas
A-IPF	IPF Absoluto
AEM	Agência Europeia de Medicamentos
AF	Anemia Falciforme
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	Methylnitramine (Hidroxiureia)
CHr	Conteúdo Médio de Hemoglobina Celular dos Reticulócitos
CRP	<i>C-reactive Protein</i> - Proteína C-reativa
CVO(s)	Crise(s) Vaso-oclusiva(s)
DF(s)	Doença(s) Falciforme(s)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT1	DNA Metiltransferase 1
EPO	Eritropoietina
EUA	Estados Unidos da América
EOS	Eosinófilos
Fe <sup>2+</sup>	Ferro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Administração de Alimentos e Medicamentos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA <sub>2</sub>	Hemoglobina A <sub>2</sub>
HbAS	Traço falciforme
HBB	Hemoglobina Beta S
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbE	Hemoglobina E
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S

HbSC	Hemoglobina SC
HbSS	Hemoglobina SS
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDAC	Histona Desacetilase
HFR	Reticulócitos de Alta Fluorescência
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSCT	Células-tronco hematopoéticas
HU	Hidroxiureia
IEF	Focalização Isoelétrica
IG	Granulócitos Imaturos
IPF	Fração de Plaquetas Imaturas
IRF	Fração de Reticulócitos Imaturos
IVIG	Imunoglobulina Intravenosa
K+	Potássio
LFR	Reticulócitos de Baixa Fluorescência
MFR	Reticulócitos de Fluorescência Média
MPR	<i>Medication Possession Ratio</i> - Taxa de Posse de Medicamentos
NHLBI	<i>National Heart, Lung, and Blood Institute</i> - Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue
NEUT	Neutrófilos
NO	Óxido Nítrico
NRBC	Eritrócitos Nucleados
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pancreatite Aguda
PCAs	Parâmetros Clínicos Avançados do Hemograma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDC	<i>Proportion of Days Covered</i> - Proporção de Dias Cobertos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PLT-F	Plaquetas por Fluorescência
PLT-I	Plaquetas por Impedância
PLT-O	Plaquetas por Ótica

PMN	Células Polimorfonucleares
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
RDW	Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
RetPLT	Plaquetas Reticuladas (parâmetro <i>Abbott Cell-Dyn Sapphire</i> )
RET-HE	Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos
RETIC	<i>Hematology System Reticulocyte Count</i> - Contagem de reticulócitos do sistema hematológico
RNA	Ácido Ribonucleico
Rrna	RNA Ribossomal
RP	Plaquetas Reticuladas
RS	Rio Grande do Sul
SAFLAS	<i>Sysmex Adaptive Flagging Algorithm based on Shape-recognition</i> - Algoritmo de sinalização adaptativa Sysmex baseado em reconhecimento de forma
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SRTN	Serviço de Referência em Triagem Neonatal
STA	Síndrome Torácica Aguda
STfR	Receptor de transferrina solúvel
SUS	Sistema Único de Saúde
TO	Laranja de Tiazol
UFC-E	Unidades Formadoras de Colônias de Eritrócitos
VPN	Valor Preditivo Negativo
WBC	Leucócitos
WDF	Fluorescência Diferencial do WBC

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\beta_S$	Beta S
$\delta$	Delta

## SUMÁRIO

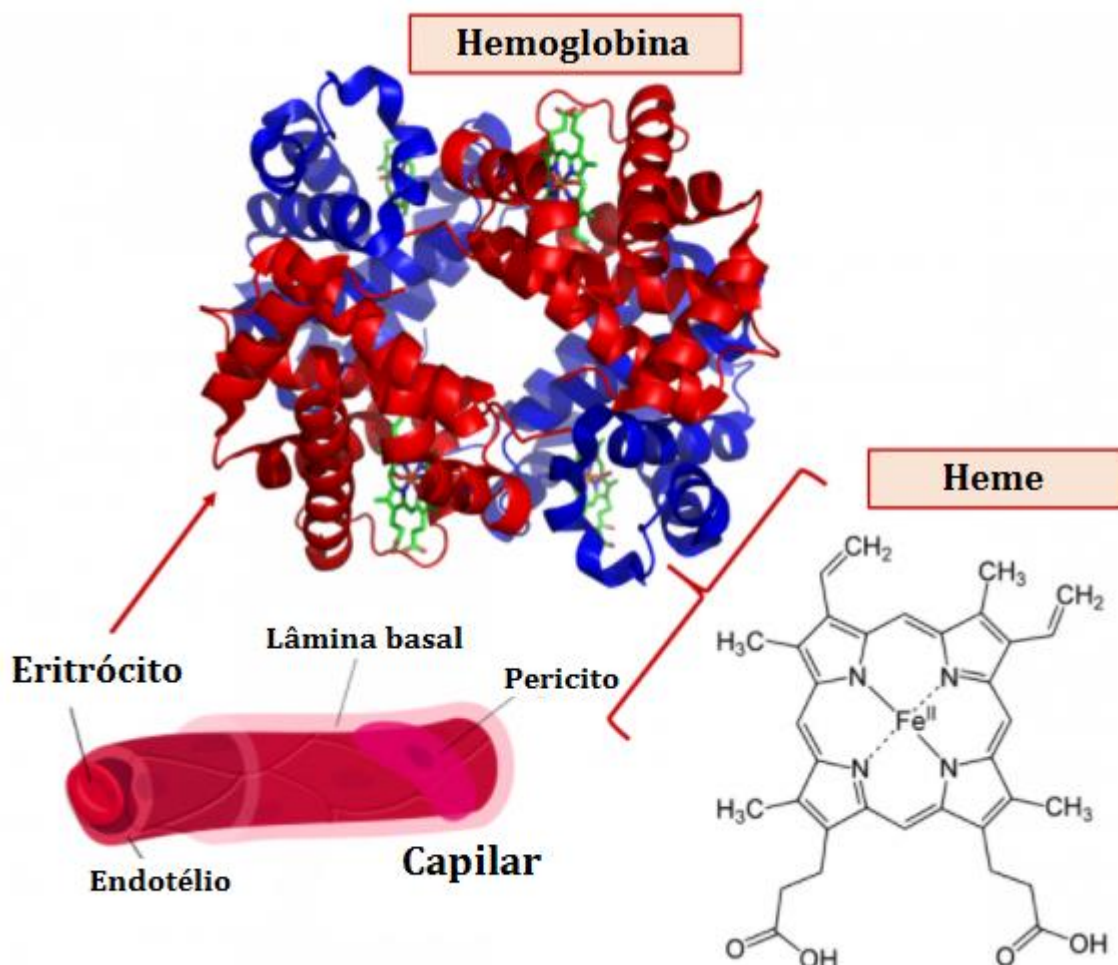
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. DESENVOLVIMENTO</b> .....	17
2.1 História natural e distribuição da doença.....	17
2.2 Fisiopatologia da doença.....	22
2.3 Variabilidade genética e impacto ambiental na sintomática.....	26
2.3.1 <i>Subfenótipo vaso-oclusivo</i> .....	26
2.3.2 <i>Subfenótipo hemolítico e de vasculopatia</i> .....	26
2.3.3 <i>Subfenótipo de HbF alto</i> .....	27
2.3.4 <i>Subfenótipo de dor</i> .....	27
2.4 Diagnóstico.....	28
2.5 Hidroxiureia no tratamento na AF.....	30
2.6 Acompanhamento Laboratorial.....	39
2.6.1 – <i>Fração de Reticulócitos Imaturos - IRF</i> .....	41
2.6.2 - <i>Fração de Plaquetas Imaturas - IPF</i> .....	44
2.6.3 - <i>Eritrócitos nucleados – NRBC</i> .....	46
2.6.4 - <i>Contagem de Plaquetas por Fluorescência – PLT-F</i> .....	49
2.6.5 - <i>Conteúdo de Hemoglobina no Reticulócito - RET-He</i> .....	51
2.6.6 - <i>Índice de Granulócitos Imaturos – IG</i> .....	54
2.7 Adesão ao Tratamento.....	57
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	86
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	87
5.1 Objetivo geral.....	87
5.2 – Objetivos específicos.....	87
<b>6. ARTIGO ORIGINAL</b> .....	88
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	115
<b>8. ANEXOS</b> .....	117
Anexo A – Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	117
Anexo B – Parecer de aprovação do comitê de ética do HCPA.....	119
Anexo C – Aprovação da Comissão de Pesquisa da UFCSPA (ComPesq).....	125
Anexo D – Aprovação do projeto pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA.....	126
Anexo E – <i>Author guidelines</i> do periódico <i>European Journal of Haematology</i> .....	127

## 1. INTRODUÇÃO

As globinas, em conjunto com suas combinações tetraméricas, geram diversos tipos de hemoglobinas (Hb) que são expressas em diferentes fases da vida embrionária, fetal e adulta (KATO et al., 2018). Apesar de algumas Hbs funcionarem como monômeros, aquelas presentes nos eritrócitos de mamíferos são montadas a partir de múltiplas subunidades (GELL, 2018).

Elas são formadas por uma estrutura quaternária (Fig. 1), contendo duas cadeias de globina do tipo  $\alpha$  ( $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ ) e duas do tipo  $\beta$  ( $\beta 1$  e  $\beta 2$ ) que são estruturalmente semelhantes e aproximadamente do mesmo tamanho (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020). Cada subunidade também contém um grupo prostético (heme) que está ligado a um átomo de Ferro ( $Fe^{2+}$ ), possibilitando a ligação do oxigênio ( $O_2$ ) às hemácias (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020; PERUTZ et al., 1960) (Fig. 1).

Figura 1 - Estrutura tetramérica de uma hemoglobina



Fonte: Adaptado de ABOZENADAH *et al.* (2017). Traduzido pelo autor.

A Hb é o principal transportador de O<sub>2</sub> no sangue, levando-o do pulmão aos tecidos de forma cooperativa (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020), contudo ela é uma molécula polifuncional. Portanto, além de transporte, ela desempenha funções catalíticas, reprogramação metabólica, regulação do pH e manutenção do equilíbrio redox (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020; KOSMACHEVSKAYA; TOPUNOV, 2018).

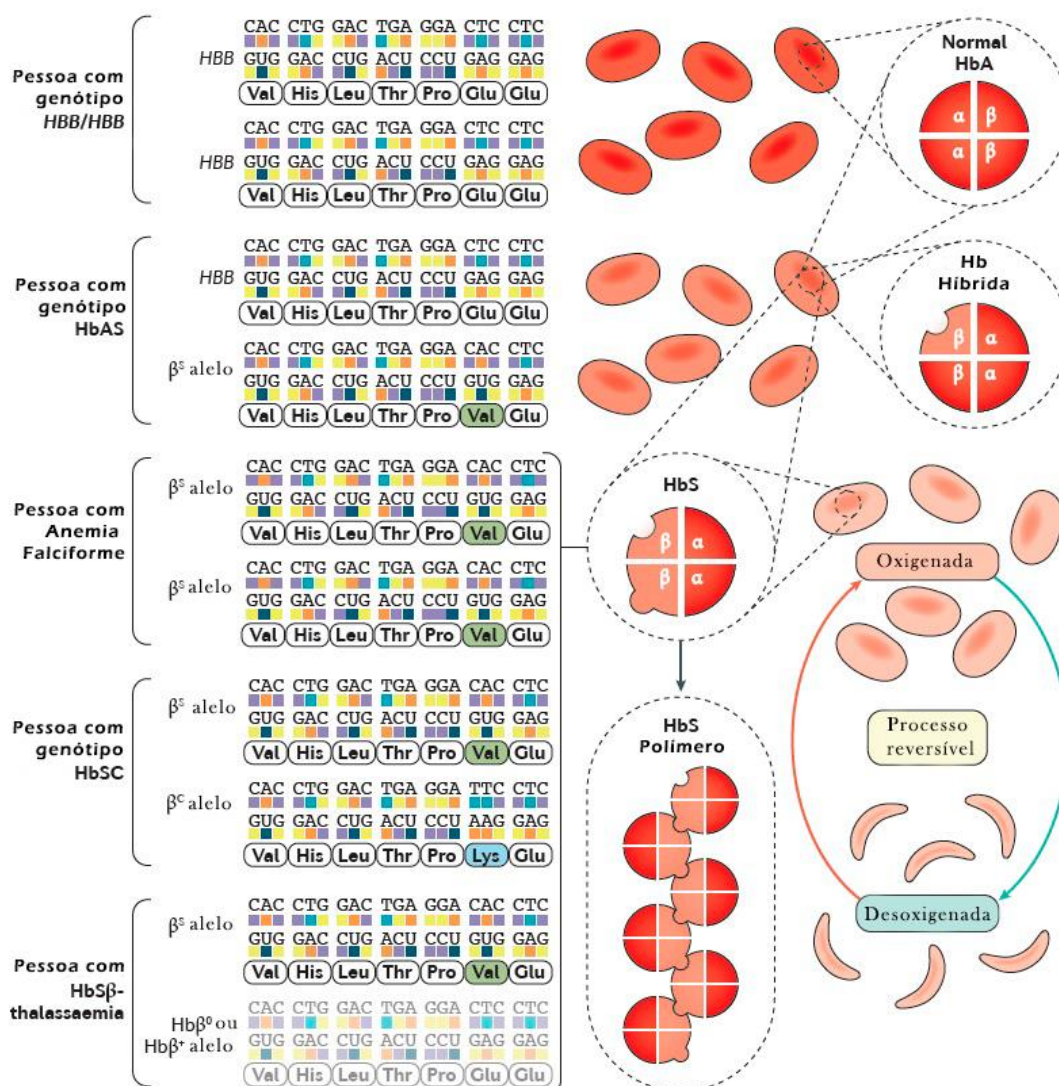
As hemoglobinopatias são amplamente subdivididas naquelas que prejudicam a produção das subunidades de globina (talassemias) e nas que produzem globinas estruturalmente anormais (variantes de Hb) (DULÍN IÑÍGUEZA et al., 2003; KATO et al., 2018; THOM et al., 2013). Embora mais de 700 variantes estruturais da hemoglobina tenham sido identificadas, apenas três (Hb S, Hb C e Hb E) atingem altas frequências (WEATHERALL; CLEGG, 2001). A hemoglobina A (HbA) é a forma normal mais abundante (>90%) de Hb na fase adulta (KATO et al., 2018). Uma substituição pontual de timina para adenina no 17º nucleotídeo do gene que codifica a β globina da HbA (HBB) resulta no alelo falciforme βS e na produção de uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS) (KATO et al., 2018) (Fig. 2).

A doença falciforme (DF) é causada pela herança desses alelos anormais e a forma mais comum e grave é a anemia falciforme (AF). Ela é representada pelo estado homocigótico (HbSS) devido à herança de βS de ambos os pais, com a formação do tetrâmero patológico da hemoglobina falciforme (α<sub>2</sub>βS<sub>2</sub>, HbS) (WARE et al., 2017). O traço falciforme (HbAS) é determinado pela presença de heterozigose para a HbS e é assintomático (BRAGA et al., 2016; WEATHERALL et al., 2006).

Sob condições de desoxigenação, as moléculas de HbS podem polimerizar e resultar na falcização dos eritrócitos, identificados como “drepanócitos” (KATO et al., 2018). As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes falcêmicos devem-se principalmente ao fenômeno da oclusão vascular seguida de infarto tecidual, e à hemólise crônica e seus mecanismos de compensação (BRAGA, 2007).

O tratamento com hidroxiureia (HU) impacta positivamente na qualidade de vida dos pacientes com AF ao reduzir o número de hospitalizações, tempo de internação, ocorrência de Síndrome Torácica Aguda (STA) e, possivelmente, de eventos neurológicos agudos (CANÇADO; JESUS, 2007). Em decorrência das diversas complicações associadas ao desenvolvimento da patologia e do monitoramento da adesão à terapia medicamentosa com HU, exprime-se a necessidade do acompanhamento regular dos pacientes com o apoio de equipes multidisciplinares (LUNYERA et al., 2017).

Figura 2 - Alterações genéticas em HBB



Fonte: Adaptado de KATO *et al.* (2018). Traduzido pelo autor.

O hemograma é amplamente utilizado na rotina clínica para o acompanhamento hematológico destes indivíduos. Contudo, o hemograma tradicional não oferece informações em tempo real acerca de parâmetros importantes em doenças hemolíticas, tais como a AF (DAHMANI *et al.*, 2016). Portanto, este estudo procura analisar os resultados dos parâmetros clínicos avançados do hemograma (PCAs) que sinalizem, em tempo real, as condições medulares e sanguíneas de pacientes portadores de AF e verificar sua possível utilidade clínica na avaliação da adesão à HU. Assim, novos parâmetros poderão ser inseridos no acompanhamento dos pacientes, colaborando no monitoramento da adesão, a fim de indicar a necessidade de intervenções para fidelização ao tratamento.

## 2. DESENVOLVIMENTO

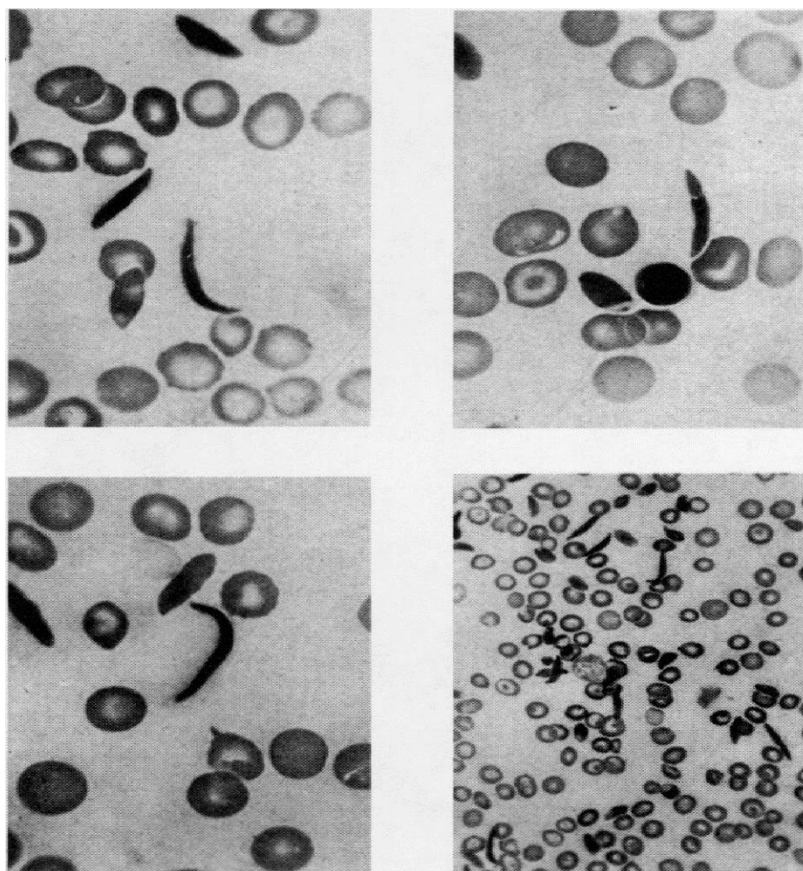
### 2.1 História natural e distribuição da doença

Não existem muitas informações sobre a história natural das DFs, especialmente em áreas de alta prevalência (KATO et al., 2018). Sabe-se que estiveram presentes na África por pelo menos cinco mil anos e são conhecidas por diversos nomes em muitas línguas tribais (WARE et al., 2017).

A primeira observação de falcização eritrocitária ocorreu no ano de 1904 (SAVITT; GOLDBERG, 1989), contudo, a descrição da patologia foi realizada pela primeira vez em 1910 por James B. Herrick (HERRICK, 1910) (Fig. 3). No Brasil, o primeiro registro de um paciente com AF foi feito por Castro em 1933 (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013). Em 1949, foi inaugurado o capítulo da medicina conhecido como “Moléstias Moleculares”, a partir da identificação de uma hemoglobina anormal em indivíduos que possuíam AF, pela ausência de duas cargas negativas na hemoglobina (PAULING et al., 1949).

A distribuição geográfica do alelo  $\beta^S$  pode ser atribuível aos efeitos da seleção natural e é impulsionada principalmente por dois fatores: a endemicidade da malária e os movimentos populacionais (KATO et al., 2018; WEATHERALL et al., 2006; WEATHERALL; CLEGG, 2001). O comércio de escravos foi um grande contribuinte dessa disseminação, particularmente na América do Norte e Europa Ocidental (PIEL et al., 2013a). Há ainda fortes evidências de que portadores do traço falciforme (HbAS) possuem uma proteção contra casos graves de malária causada pelo *P. falciparum*, o que elucidada a alta frequência do alelo  $\beta^S$  em regiões endêmicas (PIEL et al., 2010). Nesses locais, como a África, a malária causa cerca de 450.000 mortes/ano, promovendo de certa forma uma “seleção natural” do alelo  $\beta^S$ , de modo a garantir a continuidade da doença (ARIEY; GAY; MÉNARD, 2013).

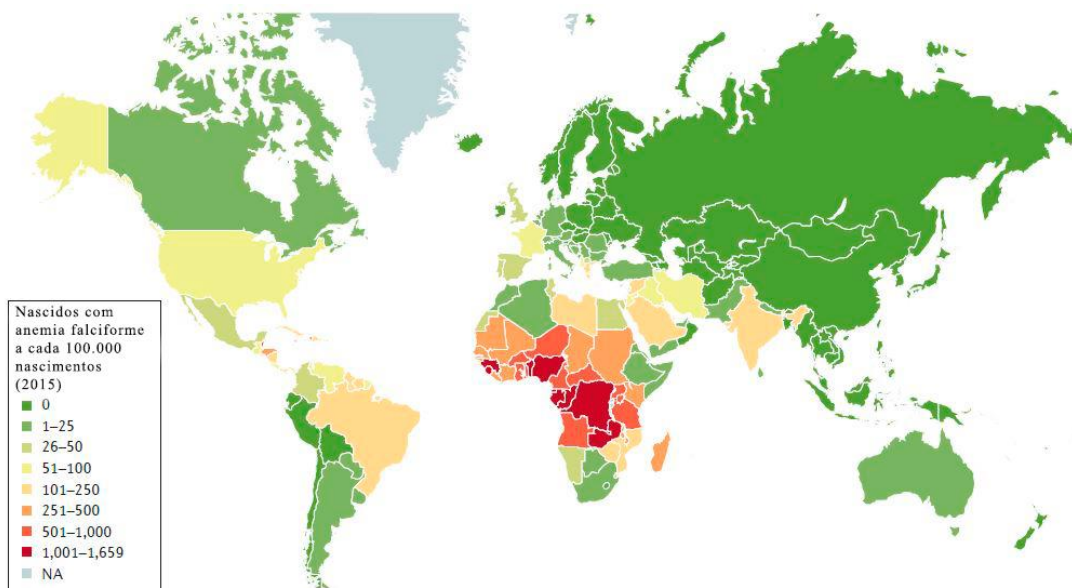
Figura 3 – Hemácias em foice registradas por J. B. Herrick em 1910.



Fonte: HERRICK (1910).

Essas doenças apresentam um alto grau de morbimortalidade (DULÍN IÑÍGUEZA et al., 2003) e constituem o erro congênito mais comum em populações da África, região do Mediterrâneo, Ásia, Caribe, América Central e América do Sul (NEWBORN SCREENING FOR SICKLE CELL DISEASE AND OTHER HEMOGLOBINOPATHIES, 1987; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Apesar de não existirem dados oficiais mundiais, estimativas de recém-nascidos sugerem consistentemente que cerca de 300.000 bebês nascem com AF ao ano, sendo 75% na África Subsaariana (PIEL et al., 2013a) (Fig. 4). Segundo Kwaku Ohene-Frempong (presidente da *Sickle Cell Foundation of Ghana* e coordenador nacional da *American Society of Hematology's Consortium on Newborn Screening in Africa - CONSA*), poucos países africanos possuem programas de triagem neonatal e somente uma pequena porcentagem de bebês é testada para DFs (MAKONI, 2021).

Figura 4 - Mapa do número estimado de nascidos com anemia falciforme



Fonte: Adaptado de KATO *et al.* (2018). Traduzido pelo autor.

No Brasil, a distribuição das DFs é dependente da composição afrodescendente e caucasiana da população, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste (CANÇADO; JESUS, 2007; FEUCHTBAUM *et al.*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; OJODU *et al.*, 2014; PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Admite-se que as DFs chegaram ao Brasil devido ao massivo número de africanos desenraizados de suas origens pelo tráfico escravo, provocando a miscigenação de raças e a chegada dos diversos haplótipos (sítios polimórficos de endonucleases de restrição, localizados no interior e ao redor do gene da cadeia  $\beta$  mutante do gene da AF) ao país: Banto, Benin, Asiático, Cameroon, sendo a Banto de maior prevalência no país (ANVISA, 2001). Portanto as DFs foram incluídas nas ações da Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da População Negra e nos artigos 187/188 da Portaria MS/GM nº 2.048, de 3 de setembro de 2009 que regulamenta o SUS (BRASIL, 2014).

Estima-se que haja cerca de 30.000 indivíduos com DFs em todo o país (KATO *et al.*, 2018), com a prevalência do alelo  $\beta^S$  no Brasil variando de 1,2% a 10,9%, dependendo da região (BRAGA, 2007; BRASIL, 2014; LERVOLINO *et al.*, 2011; LOBO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016) (Tabela 1). Em 2014, a incidência de DFs foi de cerca de 1 em 650 recém-nascidos no estado da Bahia, 1 em 1.300 no estado do Rio de Janeiro e 1 em 11.000 no estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2014).

Tabela 1 - Número de casos novos para doença falciforme (DF) registrados no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), 2014 a 2019, Brasil.

UF	Casos Novos DF - 2014	Casos Novos DF - 2015	Casos Novos DF - 2016	Casos Novos DF - 2017	Casos Novos DF - 2018	Casos Novos DF - 2019
AC	4	5	5	5	5	9
AL	12	10	17	13	16	25
AM	4	5	3	5	0	6
AP	NR	NR	3	NR	NR	NR
BA	185	184	219	203	161	202
CE	20	21	21	13	19	23
DF	42	44	22	39	38	29
ES	17	29	29	30	37	32
GO	38	29	44	40	37	33
MA	84	54	22	29	37	59
MG	166	185	152	161	143	238
MS	8	8	7	8	5	9
MT	17	14	12	19	31	23
PA	27	10	4	13	6	NR
PB	1	11	7	9	1	7
PE	21	47	39	35	57	63
PI	24	34	58	21	23	35
PR	10	10	12	8	10	11
RJ	127	112	85	44	120	103
RN	14	7	5	5	7	3
RO	7	10	13	7	15	9
RR	4	2	0	0	18	6
RS	13	21	32	33	28	22
SC	3	6	4	11	4	13
SE	28	12	18	11	12	21
SP	281	258	231	190	249	223
TO	9	21	7	7	4	10
<b>Brasil</b>	<b>1.166</b>	<b>1.149</b>	<b>1.071</b>	<b>959</b>	<b>1.083</b>	<b>1.214</b>

Fonte: PNTN-CGSH/DAET/SAES/MS, Relatório Anual de Dados do PNTN, 2014-2019.

Nota: NR = Relatório não encaminhado pelo estado ao Ministério de Saúde. Fenótipos englobados no grupo de doença falciforme – Hb FS, Hb FSC, Hb FSD e Hb FS/Beta talassemia.

No Rio Grande do Sul (RS), entre 2004 e 2014, o Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) realizou 1.165.818 Testes do Pezinho em recém-nascidos, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e encontrou 17.562 perfis hemoglobínicos alterados, dentre eles 14.220 portadores de Hb AS e 95 portadores de AF (CARDOSO et al., 2017).

Existem poucos estudos acerca da mortalidade por DF no Brasil. ARDUINI; RODRIGUES & MARQUI (2016) constataram que as mortes ocorreram majoritariamente em pacientes com AF, que é o genótipo mais comum e causa a manifestação clínica mais grave da doença. Os dados apontaram altos índices de mortalidade decorrentes de complicações secundárias à DF, como pneumonia e septicemia. O estudo também mostrou que a triagem neonatal para DF não foi suficiente para reduzir significativamente os índices de mortalidade nos estados abrangidos (Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul), enfatizando a necessidade de mais estudos publicados para que se possa traçar o perfil dos portadores e desenvolver estratégias de atendimento mais efetivo a esses indivíduos.

Devido a dados limitados nas áreas de alta prevalência de DF, é difícil avaliar com precisão os impactos futuros na saúde e economia (KATO et al., 2018). No Brasil, o orçamento disponibilizado para o aperfeiçoamento do SUS visando a implantação e manutenção de políticas e programas de atenção hematológica, hemoterápica e de triagem neonatal biológica, passou de R\$234.334.520 em 2004, para 1.378.538.497 em 2019. Esses dados demonstram o avanço em relação à importância do diagnóstico, tratamento e acompanhamento destes pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Com o advento da globalização, as migrações internacionais contribuirão fortemente para a distribuição do alelo  $\beta^S$  (WEATHERALL, 2010) e as projeções demográficas estimam que o número de recém-nascidos, ao ano, com AF globalmente excederá 400.000 até 2050 (PIEL et al., 2013b).

Em países desenvolvidos, este crescimento reflete o aumento da expectativa de vida dos indivíduos afetados resultante de intervenções como triagem neonatal e tratamento com HU (QUINN et al., 2010). Atualmente, as taxas de mortalidade infantil são próximas daquelas verificadas para população em geral (LÊ et al., 2015) e a sobrevida média é superior a 60 anos (GARDNER et al., 2016).

Apesar disso, a expectativa de vida dos pacientes com DF é reduzida em cerca de 30 anos, mesmo com os melhores cuidados médicos, quando comparada à de indivíduos sem a doença (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Em países em desenvolvimento este problema é agravado, pois um número maior de bebês e crianças afetadas agora sobrevivem até a idade adulta, exigindo diagnóstico e tratamento. Contudo, a falta de infraestrutura básica de saúde em muitas regiões torna

a prevenção e o manejo da DF extremamente difíceis (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

## 2.2 Fisiopatologia da doença

As DFs são multissistêmicas e quase todos os órgãos do corpo podem ser afetados (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). As moléculas de Hb são complexas, sofrem mudanças conformacionais em resposta ao oxigênio e são afetadas por mudanças ambientais, efetores alostéricos e mutações. Sob condições de desoxigenação, as moléculas de HbS podem se alinhar por ligações não covalentes e polimerizar, resultando na falcização dos eritrócitos, identificados como “drepanócitos” (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013; KATO et al., 2018).

Os polímeros são compostos por 14 moléculas de HbS cada. Eles primeiramente agrupam-se em fibras e, em seguida, formam hastes paralelas capazes de modificar a aparência e funcionalidade da célula (HARRINGTON; ADACHI; ROYER, 1997; KUYPERS, 2014; STEINBERG, 1998). Esse fenômeno depende de numerosas variáveis, tais como concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013).

A mutação ocorre na superfície da molécula de hemoglobina, não provocando alterações significativas em sua conformação global, de forma que a HbS, quando oxigenada, é isomorfa à HbA (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013). Todavia, em soluções concentradas de desoxi-HbS e desoxi-HbA, elas diferem grandemente (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013). A HbS possui afinidade reduzida pelo oxigênio, em comparação com HbA, o que exacerba sua polimerização, que por sua vez reduz ainda mais a afinidade oxigênio/HbS (SEAKINS et al., 1973). A reoxigenação eritrocitária quebra o polímero HbS e restaura a forma celular normal (WARE et al., 2017). No entanto, a repetição frequente desse processo provoca lesões de membrana até que ela não seja mais flexível, de modo que a célula mantém a rigidez e a configuração de foice após a reoxigenação (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013; WARE et al., 2017).

A polimerização de HbS se correlaciona diretamente com a concentração de HbS dentro do eritrócito e também com a composição de outras hemoglobinas que podem participar na formação dos polímeros (NOGUCHI; SCHECHTER, 1985). Ela altera direta ou indiretamente a bicamada lipídica típica e as proteínas da membrana

eritrocitária, levando à redução da hidratação celular, aumento da hemólise e interações anormais com outras células sanguíneas (KUYPERS, 2014). Adicionalmente, a polimerização de HbS também pode ocorrer em reticulócitos, que representam cerca de 20% dos glóbulos vermelhos em indivíduos com AF (KATO et al., 2018).

A deformação estrutural da célula também faz com que ela apresente anormalidades na homeostase catiônica, resultando em desidratação celular. Há diminuição das concentrações de potássio ( $K^+$ ) devido à ativação do canal de  $K^+$  e do canal co-transportador de cloro/ $K^+$  (BRUGNARA, 2018).

Esses glóbulos vermelhos alterados são mais instáveis e possuem menor sobrevida na circulação (ALAYASH, 2018; QUINN et al., 2016). Esse tópico está sob constante discussão, com estudos identificando o tempo de sobrevida dos drepanócitos como sendo de 12 dias (SOLANKI et al., 1988), 15 dias (MCCURDY, 1969; MCCURDY; SHERMAN, 1978), 36 dias (QUINN et al., 2016) ou 42 dias (LONDON et al., 1949).

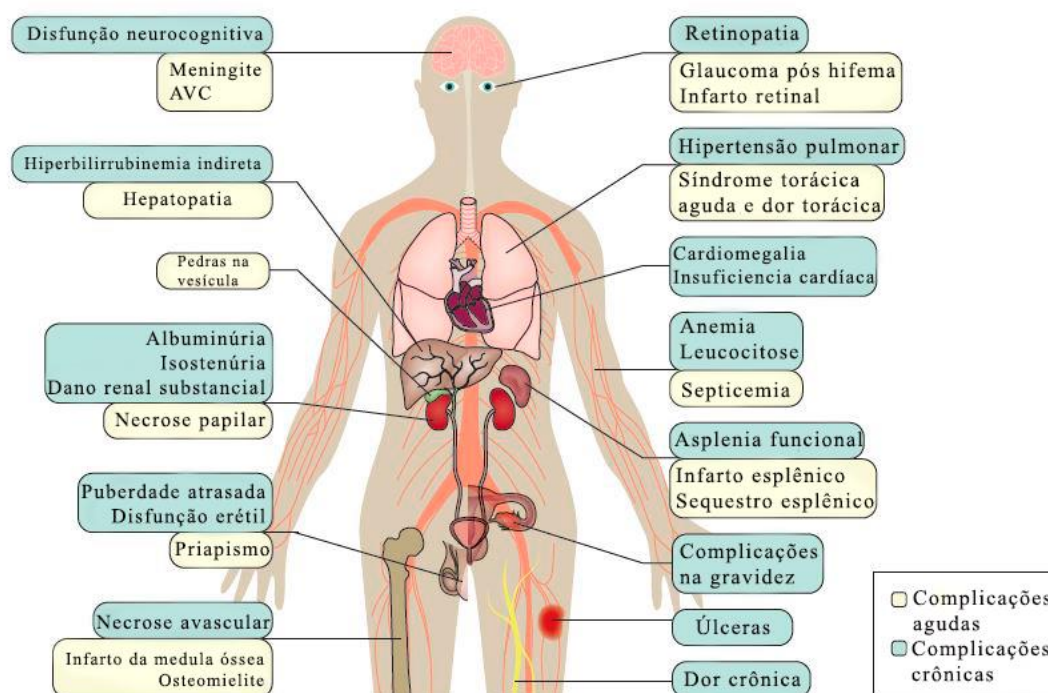
Apesar da hemólise acontecer principalmente por meio de fagocitose extravascular por macrófagos, aproximadamente um terço ocorre intravascularmente (CROSBY, 1955; KATO et al., 2018; WARE et al., 2017). Ela é simultaneamente a causa e efeito do elevado estresse oxidativo nesses pacientes (KATO et al., 2018) ao contribuir para o dano da membrana celular, envelhecimento prematuro dos eritrócitos e o aumento de hemólise (ALAYASH, 2018). O estresse mecânico na membrana e o dano induzido pela oxidação afetam a interação do eritrócito com o microambiente, incluindo células endoteliais, leucócitos e plaquetas (KUYPERS, 2014).

Os eritrócitos falcizados têm uma tendência a bloquear pequenos vasos sanguíneos e o estresse oxidativo vascular (estimulado pela Hb extracelular e o heme livres no plasma) auxilia na promoção da vasoconstrição (ALAYASH, 2018). A auto-oxidação contínua da Hb extracelular produz o íon superóxido, que se transforma em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (uma fonte de espécies oxidativas potentes, dentre elas o íon ferrila, que promove vasoconstrição) (ALAYASH, 2018; KATO et al., 2018). Além disso, a Hb extracelular diminui a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO – potente vasodilatador), eliminando-o cerca de 1.000 vezes mais rapidamente do que a Hb citoplasmática (REITER et al., 2002).

As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes falcêmicos devem-se principalmente ao fenômeno da oclusão vascular seguida de infarto tecidual, e à

hemólise crônica e seus mecanismos de compensação (BRAGA, 2007) (Fig. 5). Esses processos promovem uma cascata de eventos patológicos, que, por sua vez, levam a uma ampla gama de complicações (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

Figura 5 - Complicações clínicas da doença falciforme



Fonte: Adaptado de KATO *et al.* (2018, p. 12). Traduzido pelo autor.

Os episódios dolorosos representam as manifestações agudas características das DF. A frequência e a gravidade das crises variam consideravelmente entre pacientes, ou até no mesmo paciente, sofrendo modificações durante diferentes períodos da vida (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013). Geralmente afetam as extremidades, tórax e costas, e são a causa mais comum de hospitalização para indivíduos com AF (KATO *et al.*, 2018). Os fatores desencadeantes são multivariados e incluem infecção, desidratação e tensão emocional (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013).

O tratamento é geralmente orientado pela intensidade da dor (geralmente autorreferida por meio de escalas de intensidade) e a maioria desses eventos são gerenciados em casa com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ou analgésicos opioides orais sem prescrição e sem o envolvimento do profissional de saúde (KATO *et al.*, 2018).

A STA é a segunda causa mais comum de hospitalização em pacientes com DF nos Estados Unidos e uma das principais causas de morte (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013; KATO et al., 2018). Muitas vezes está associada/segue-se após um evento de dor aguda e sua gravidade aumenta com a idade (KATO et al., 2018; NOVELLI; GLADWIN, 2016). Tanto a STA quanto o Acidente Vascular Cerebral (AVC) são potencialmente fatais e requerem uma ação estruturada e rápida, de modo a fornecer atendimento emergencial e especializado (WARE et al., 2017). Crianças com AF têm um risco 300 vezes maior de sofrer um AVC e, aos 45 anos de idade, um em cada quatro adultos com AF já teve ao menos um AVC (OHENE-FREMPONG et al., 1998). Eles podem ocorrer de maneira independente ou como uma complicação da STA (KATO et al., 2018).

Complicações agudas são raramente letais para crianças em países desenvolvidos (COUQUE et al., 2016). Todavia, as complicações crônicas decorrentes de lesões progressivas dos tecidos e órgãos podem ser fatais em adultos (ELMARIAH et al., 2014; KATO et al., 2018). Geralmente na terceira década, grande parte dos pacientes com AF atinge um estágio no qual elas se tornam a principal causa de morbimortalidade (WARE et al., 2017). Dentre elas, encontram-se úlceras de perna, retinopatia, necrose avascular, declínio neurológico, asplenia funcional progressiva e priapismo recorrente (COVAS et al., 2004; WEATHERALL; CLEGG, 2001); todavia, a disfunção renal e a doença cardiopulmonar são as mais letais (DRAWZ et al., 2016; HAMIDEH; ALVAREZ, 2013).

Esses indivíduos também são altamente propensos a infecções, principalmente durante a primeira infância. Estima-se que 50–90% das crianças com AF que vivem na África Subsaariana morrem até os 5 anos de idade, majoritariamente devido a infecções (GROSSE et al., 2011; MCAULEY et al., 2010; WILLIAMS et al., 2009). Até a década de 1990, cerca de 30% das crianças estadunidenses com AF morriam de infecções, predominantemente devido a bactérias encapsuladas (GASTON et al., 1986). Isso deve-se a danos no baço durante a infância, consequente de constantes falcizações intraparenquimatosas (GASTON et al., 1986; WARE et al., 2017). A introdução da penicilina de forma profilática diminuiu a incidência de bacteremia pneumocócica em 85% (GASTON et al., 1986) e o auxílio dos programas de vacinação reduziu ainda mais a mortalidade por doenças infecciosas (KATO et al., 2018). Apesar da profilaxia levantar preocupações sobre o desenvolvimento de

resistência à penicilina (COBER; PHELPS; OHIO, 2010), ela ainda é considerada segura e benéfica em pacientes de até 5 anos de idade (KATO et al., 2018).

### **2.3 Variabilidade genética e impacto ambiental na sintomática**

A grande diversidade fenotípica apresentada pelos portadores de AF é parcialmente explicada por fatores ambientais e variantes genéticas (PIEL.; STEINBERG.; REES., 2017; WILLIAMS; THEIN, 2018). Certos fenótipos apresentam distribuição geográfica específica e estão associados a variantes conhecidas (SERJEANT, 2013) e alguns subfenótipos se agrupam epidemiologicamente unidos por um biomarcador comum que pode sugerir algum mecanismo específico (KATO et al., 2018). Todavia, esses fenótipos existem como um espectro, não sendo mutuamente exclusivos e podendo mudar de acordo com a idade do indivíduo (KATO et al., 2018).

**2.3.1 Subfenótipo vaso-oclusivo:** se caracteriza por um hematócrito mais elevado (quando comparado à outros portadores de AF) e baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF), que promove maior viscosidade do sangue (BALLAS; GUPTA; ADAMS-GRAVES, 2012; KATO et al., 2018). Indivíduos com esse fenótipo estão mais predispostos a crises vaso-oclusivas (CVO), STA e osteonecrose. A coherança de  $\alpha$ -talassemia auxilia na redução da concentração intracelular de HbS, que retarda a polimerização da HbS e a hemólise (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Esse traço existe em até 30% dos pacientes de origem africana com DF (HIGGS et al., 1982).

**2.3.2 Subfenótipo hemolítico e de vasculopatia:** é caracterizado por um hematócrito mais baixo do que o encontrado em indivíduos com o subfenótipo vaso-oclusivo, e possui níveis mais elevados de lactato desidrogenase e bilirrubina sérica, que indicam anemia hemolítica mais grave (KATO et al., 2018; LANDBURG et al., 2010). Os indivíduos desse grupo apresentam risco maior de AVC isquêmico, hipertensão pulmonar, úlceras na perna, cálculos biliares, priapismo e nefropatia (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). As complicações vasculopáticas estão fortemente associadas à diminuição da biodisponibilidade do NO e à exposição do heme (KATO et al., 2018; LANDBURG et al., 2010). Além disso, a anemia grave

decorrente da hemólise também promove alto débito cardíaco como um mecanismo compensatório, e é possível que esse fluxo sanguíneo excessivo estimule vasculopatia no rim e em outros órgãos (KATO et al., 2018).

**2.3.3 Subfenótipo de HbF alto:** o nível de HbF é provavelmente o modulador fenotípico mais importante da AF (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013). A primeira variante genética associada ao seu aumento na AF foi um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (rs7482144) na região promotora *HBG2* (NAGEL et al., 1985). O determinante crítico do efeito da HbF no fenótipo da doença é a sua concentração em cada eritrócito (AKINSHEYE et al., 2011). A HbF interrompe a polimerização da HbS desoxigenada, uma vez que não faz parte do polímero de HbS (AKINSHEYE et al., 2011). A expressão consistente dessa hemoglobina na faixa de 10% a 25% da Hb total reduz a gravidade do quadro de AF (LETTRE; BAUER, 2016; PLATT et al., 1994). Se os níveis chegarem a 25-50% por eritrócito, pode haver uma grande melhora na sintomatologia da doença (STEINBERG et al., 2014), o que justifica o interesse no desenvolvimento de fármacos que induzam sua produção.

**2.3.4 Subfenótipo de dor:** Testes sensoriais quantitativos para sensibilidade à dor são usados para caracterizar funcionalmente os subfenótipos de dor em AF (BRANDOW et al., 2013). Indivíduos com esses fenótipos experienciam as dores de maneira diferente, o que pode ser devido a mudanças neurofisiológicas em suas vias de percepção da dor (KATO et al., 2018). Um exemplo de um modificador de dor herdado é o gene *GCH1* (GTP ciclo-hidrolase 1), que está associado à sensibilidade à dor em indivíduos saudáveis, enquanto as variantes do *GCH1* estão associadas à frequência de dor intensa na AF (BELFER et al., 2014).

Outros possíveis influenciadores da variação fenotípica da AF são os polimorfismos do gene da  $\beta$ -globina que definem os haplótipos da AF. Os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano estão associados com níveis elevados de HbF, enquanto os haplótipos Benin e Bantu, com níveis menores de HbF. No Brasil, existe certa heterogeneidade na frequência dos diversos haplótipos entre as diferentes regiões geográficas, mas predominam os haplótipos Bantu e Benin (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013).

Apesar dos fatores ambientais serem mal caracterizados, eles podem dar origem a uma grande quantidade de variabilidade fenotípica (REES; WILLIAMS;

GLADWIN, 2010). Associações entre clima frio e complicações agudas das DFs foram descritas pela primeira vez nos Estados Unidos em 1924 (GRAHAM, 1924). Em países com o clima temperado, o frio e a chuva podem ter impacto na vasoconstrição, mas seus efeitos não são bem documentados (JONES et al., 2005). Climas ventosos já foram associados a um aumento da ocorrência de dor e estudos sugerem que altas concentrações de ozônio podem estar associadas a CVOs (MITTAL et al., 2009; YALLOP et al., 2007). No entanto, a importância das concentrações atmosféricas de NO e monóxido de carbono é desconhecida (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Estudos em Paris e Londres mostraram que níveis atmosféricos mais elevados de monóxido de carbono foram associados à diminuição das internações hospitalares por CVO (YALLOP et al., 2007), embora o efeito oposto tenha sido encontrado em São Paulo (BARBOSA et al., 2015). Além disso, a altitude elevada tem sido associada a várias complicações na DF, provavelmente devido aos níveis mais baixos de oxigênio nessas regiões (PIEL; STEINBERG; REES, 2017), sendo que CVOs também parecem ser mais comuns em pacientes que vivem em grandes altitudes (MAHONY; GITHENS, 1979).

É também provável que o ambiente doméstico seja um dos determinantes majoritários na saúde dos pacientes com DF (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Entretanto, esse fator permanece vastamente inexplorado, exceto por poucos estudos que sugerem a influência da exposição à fumaça de tabaco nos resultados clínicos e complicações da doença (SADREAMELI et al., 2016).

## **2.4 Diagnóstico**

No Brasil, a portaria no 822/01 do Ministério da Saúde incluiu as hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), permitindo assim o diagnóstico já ao nascimento (BRASIL, 2001). Adicionalmente, a rotina para a promoção e manutenção da saúde dos indivíduos com AF deve ser iniciada já nos primeiros meses de vida (BRAGA, 2007).

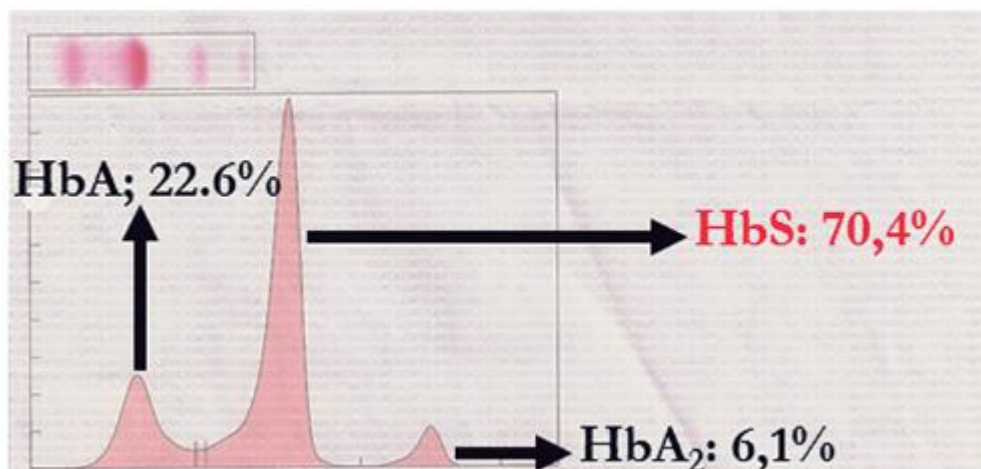
As abordagens de diagnóstico da AF comumente utilizadas em países desenvolvidos incluem eletroforese capilar ou baseada em gel, cromatografia líquida de alto desempenho e focalização isoelétrica (WILLIAMS; THEIN, 2018). A maioria dos programas de triagem neonatal envolve testes realizados durante a primeira

semana de vida, quando a expressão de HbS ainda é baixa, o que pode levar a problemas com sensibilidade reduzida (WILLIAMS; THEIN, 2018). Portanto, novas técnicas estão sendo aperfeiçoadas, incluindo análise de sequenciamento de próxima geração, espectrometria de massa *in tandem* e diagnóstico de DNA (incluindo *Taqman* PCR e análise de sequência de genes *HBB* amplificados) (MOAT et al., 2017; SHOOTER et al., 2015; TRAEGER-SYNODINOS; HARTEVELD, 2014). Contudo, esses métodos cada vez mais sofisticados não estão prontamente disponíveis para a maioria dos pacientes em regiões de baixa renda.

O diagnóstico precoce, programas de conscientização e educação, profissionais de saúde experientes nesta área, profilaxia com penicilina, prevenção primária de AVC e tratamento com HU é refletido no aumento da expectativa de vida desses indivíduos (KATO et al., 2018; PIEL.; STEINBERG.; REES., 2017). Dados do Reino Unido mostram uma sobrevida mediana de 67 anos em pessoas com HbSS e superior naqueles com HbSC (GARDNER et al., 2016). Na Jamaica, números identificaram sobrevida mediana de 53 anos para homens e 58,5 anos para mulheres com HbSS (WIERENGA; HAMBLETON; LEWIS, 2001).

Quando não diagnosticada durante a triagem neonatal (teste do pezinho), a AF pode se manifestar em hemogramas não característicos da doença, com ou sem reticulócitos elevados e com anemia normocítica normocrômica (ZÚÑIGA C. et al., 2018). Ao suspeitar da AF, o clínico geralmente encaminha o paciente a um hematologista e, muitas vezes, devido à ausência de drepanócitos no esfregaço sanguíneo, é necessário realizar o teste de falcização. Para isso, utiliza-se uma substância redutora (metabissulfito), capaz de reduzir a quantidade de O<sub>2</sub>, induzindo à falcização eritrocitária (SEHOP, 2010). A análise da hemoglobina por meio de eletroforese em pH alcalino (Fig. 6), em conjunto com os demais achados, corrobora para o diagnóstico completo.

Figura 6 - Eletroforese de hemoglobina



Fonte: Adaptado de ZÚÑIGA C. *et al.* (2018, p. 04).

Alguns padrões eletroforéticos de AF podem se assimilar ao de associações entre a HbS e outras hemoglobinas anormais, tais como: Hb S/ $\beta$ tal., Hb S/ $\delta\beta$  tal. e Hb S/PHHF (Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal). Nestes casos, é necessária a realização de exames laboratoriais específicos (ALAPAN *et al.*, 2016), sendo que, para o auxílio na distinção destas alterações, pode-se utilizar quantificações de HbA<sub>2</sub> e HbF. Quando há suspeita de associação com PHHF, sugere-se a realização da pesquisa de distribuição intraeritrocitária de Hb Fetal nos pais do paciente.

Em geral, em casos de associações com  $\beta^0$  tal., a HbA<sub>2</sub> aparece aumentada (>3,5%) e diminuída em pacientes com Hb S/ $\delta\beta$ . Cerca da 20% das DF estão associadas com alfa-talassemia e, de fato, o diagnóstico só é possível através da utilização de técnicas de genética molecular como reação em cadeia pela polimerase (PCR) e *southern blotting*. O Volume Corpuscular Médio (VCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) podem estar reduzidos nestes casos. Também há possibilidade de análise de espectrometria de massa e análise de DNA (WARE *et al.*, 2017).

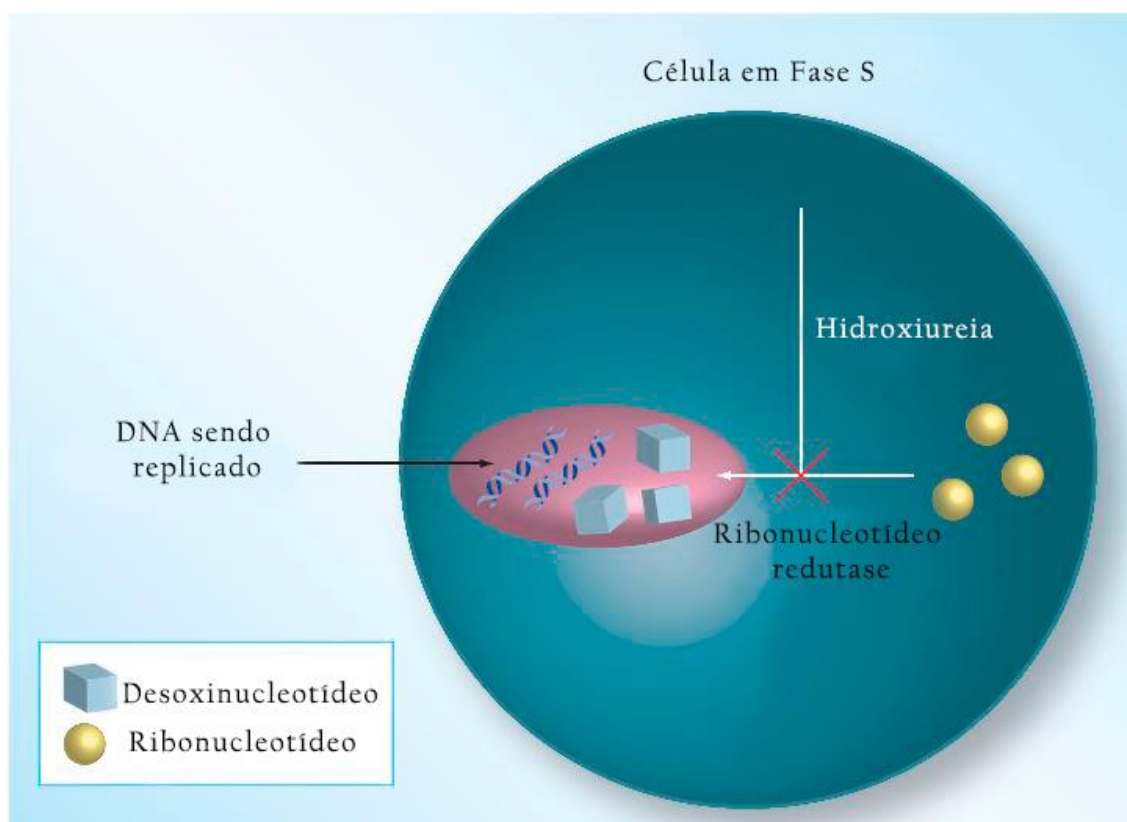
## 2.5 Hidroxiureia no tratamento na AF

A melhora do prognóstico pediátrico na AF está relacionada à introdução da triagem neonatal, cuidados pediátricos abrangentes e precoces, profilaxia com penicilina, vacinação para reduzir infecções potencialmente fatais e prevenção primária de AVC por meio de triagem Doppler transcraniana (COSTA; CONRAN;

FERTRIN, 2013; KATO et al., 2018; NEVITT; JONES; HOWARD, 2017). Em adultos, a base do tratamento é a prevenção de fatores que causam CVO (incluindo desidratação, infecções e resfriados) e tratamento sintomático desses episódios (NEVITT; JONES; HOWARD, 2017).

A HU também é conhecida como hidroxycarbamida, e é uma substância química de composição  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ . Foi sintetizada primeiramente na Alemanha em 1869 (DRESLER; STEIN, 1869), porém somente cerca de 60 anos depois, em 1928, os efeitos biológicos deste composto foram relatados nas células do sangue de coelhos (ROSENTHAL; WISLICKI; KOLLEK, 1928). Ela se apresenta como um pó essencialmente insípido, de coloração branca a cristalina e bloqueia reversivelmente a síntese de DNA ao inibir a ribonucleotídeo redutase, mantendo as células em fase S (síntese) (ALVINO et al., 2007; BALLAS; DOVER; CHARACHE, 1989; KATO et al., 2018) (Fig. 7).

Figura 7 - Inibição induzida por hidroxycarbamida da ribonucleotídeo difosfato redutase em células em proliferação para inibir a síntese de DNA



Fonte: Adaptado de SPIVAK & HASSELBALCH (2011, p. 03). Traduzido pelo autor.

Até a década de 1980, a única terapia disponível para AF eram transfusões intermitentes de eritrócitos, que, por seu alto risco, eram comumente reservadas

somente para complicações agudas em que os pacientes corriam risco de vida (MCGANN; WARE, 2015). Apesar do uso de HU em protocolos de tratamento ter início nessa mesma década (SCOTT et al., 1996), sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) ocorreu somente em 1998 e pela Agência Europeia de Medicamentos (AEM) em 2007 (KATO et al., 2018). No Brasil, normatização da sua dispensação em centros de referência para tratamento das DF ocorreu em 2002 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Na década de 1960, realizou-se uma triagem de fármacos em grande escala que mostrou as ações antitumorais da HU, revelando seu potencial antineoplásico (STEARNS; LOSEE; BERNSTEIN, 1963). Até hoje ela é utilizada rotineiramente no tratamento de neoplasias, em particular as que afetam as células sanguíneas, incluindo leucemia mielóide crônica e policitemia vera (BALLAS; DOVER; CHARACHE, 1989; SPIVAK; HASSELBALCH, 2011). Seu espectro terapêutico também foi expandido para doenças infecciosas, incluindo a supressão de vírus e bactérias (NOZAKI et al., 2010; ROSENKRANZ; GUTTER; BECKER, 1973).

É uma substância solúvel em água, propriedade importante que possibilita sua diluição para administração em crianças (MARAHATTA; WARE, 2017). Apesar de seus mecanismos de ação não serem integralmente compreendidos (COKIC et al., 2003; COVAS et al., 2004; KATO et al., 2018), o aumento na concentração de HbF e na porcentagem de células vermelhas que contenham HbF (células F) são aceitos como majoritariamente responsáveis pelos efeitos benéficos deste medicamento (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013; COVAS et al., 2004; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

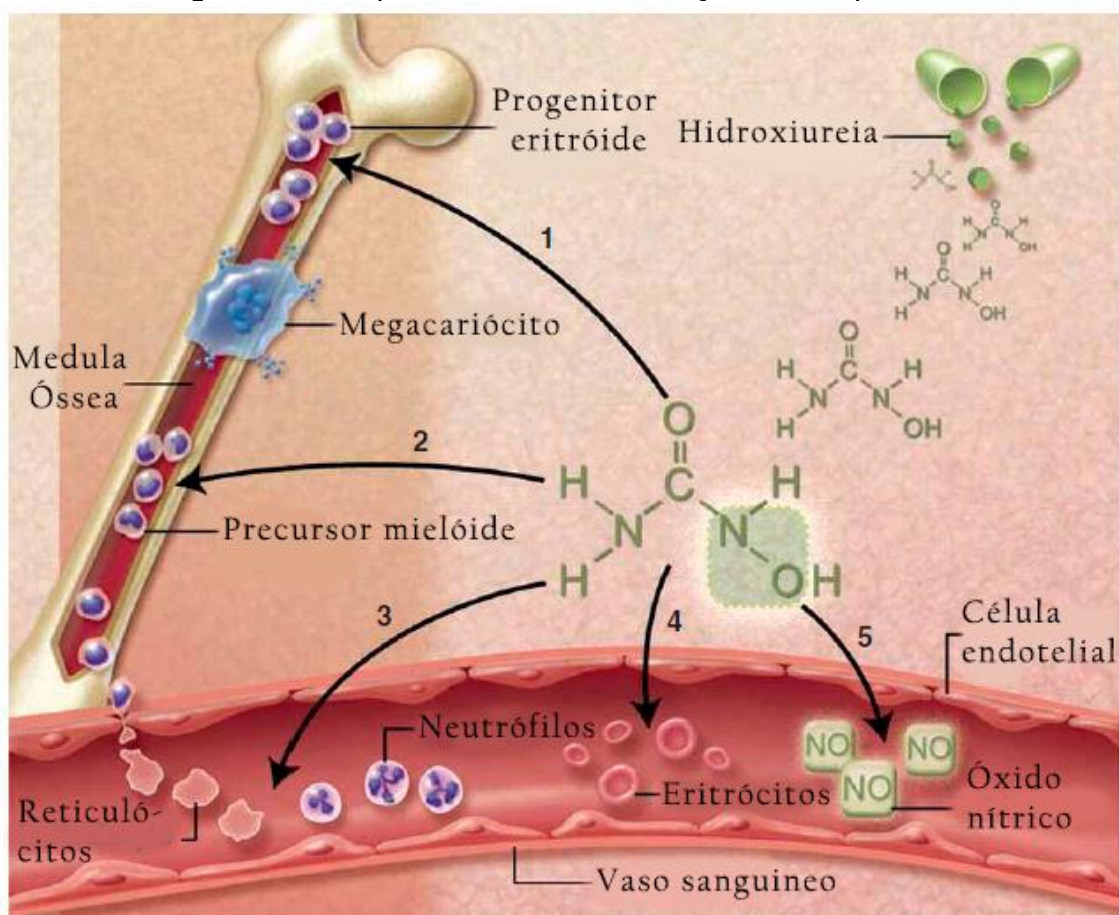
A HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) é a principal hemoglobina antes do nascimento e é responsável por 60–80% da hemoglobina total nos recém-nascidos (SOTOUDEH; SOTOUDEH, 2020). A partir dos 3-6 meses após o nascimento, o percentual de HbF diminui, sendo substituída gradativamente pela HbA (devido à mudança da expressão do gene  $\gamma$  para  $\beta$  - globina) e representando menos de 1% da Hb em adultos saudáveis (DANGANA et al., 2018; SOTOUDEH; SOTOUDEH, 2020; STEINBERG et al., 2018; ZAGO et al., 1979). Em portadores de DF, as manifestações clínicas costumam aparecer de acordo com o decréscimo desses níveis (NEVITT; JONES; HOWARD, 2017).

A HbF residual normalmente não é distribuída uniformemente entre os eritrócitos. Ela é concentrada em um subconjunto de células conhecido como células F, nos quais cerca de 20% do conteúdo total de hemoglobina é a HbF (LETTRE;

BAUER, 2016). E, embora a HU aumente os níveis de HbF na maioria dos pacientes, sua distribuição nos eritrócitos falciformes continua sendo heterogênea (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Adicionalmente, a melhora causada por seu aumento não é igual para todos os subfenótipos da doença. Em heterozigotos para HbS e persistência hereditária de HbF, onde o *HBB* é deletado, a HbF constitui aproximadamente 30% da hemoglobina total e é homogeneamente distribuída na população de glóbulos vermelhos, com cada célula contendo cerca de 10 pg - o que é suficiente para uma melhora considerável dos sintomas (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

A indução de HbF pela HU diminui a falcização eritrocítica e reduz significativamente o percentual de hemólise e VOC (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Um menor percentual de hemólise pode reduzir o consumo de NO intravascular que normalmente é sequestrado pelas Hb expostas, facilitando a dilatação vascular e aumentando a produção de HbF (COKIC et al., 2003; COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013; COVAS et al., 2004; GLADWIN et al., 2002) (Fig. 8). Os eritrócitos com conteúdo de HbF mais alto são maiores (maior VCM) e mais deformáveis (melhor reologia) (MCGANN; WARE, 2015). A Fig. 9 mostra as diferenças marcantes entre um esfregaço de sangue periférico de uma criança com AF antes e após a terapia com HU. A HU também causa redução benéfica na contagem de leucócitos, já que eles participam de forma significativa na inflamação e na oclusão física dos vasos (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013; KATO et al., 2018). O estado inflamatório crônico inerente da doença exerce um papel fundamental na ativação de células endoteliais e sanguíneas, em especial, dos leucócitos (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013). Plaquetas e eritrócitos falciformes se ligam a neutrófilos já aderidos ao endotélio, reduzindo assim o fluxo sanguíneo e promovendo a vaso-occlusão (ELMARIAH et al., 2014; KATO et al., 2018).

Figura 8 - Múltiplos mecanismos de ação da HU para AF



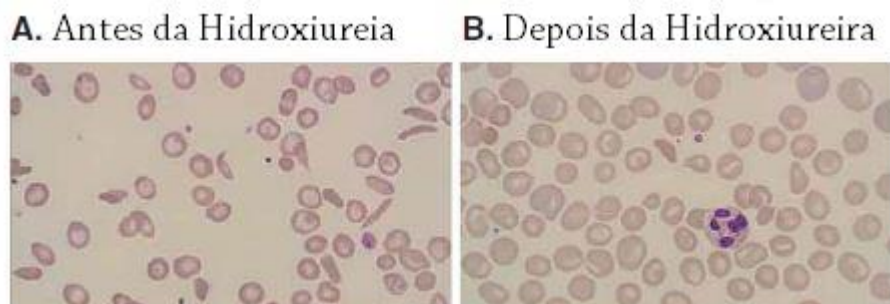
Legenda: (1) Indução de hemoglobina fetal por meio da ativação da guanilil ciclase solúvel e cinética eritróide alterada; (2) menor contagem de neutrófilos e reticulócitos pela inibição da ribonucleotídeo redutase e citotoxicidade da medula óssea; (3) adesividade diminuída e reologia melhorada de neutrófilos e reticulócitos circulantes; (4) redução da hemólise por meio de hidratação eritrocitária melhorada, macrocitose e redução da falcização intracelular; e (5) liberação de óxido nítrico (NO) com potencial vasodilatação local e resposta vascular melhorada

Fonte: Adaptado de MCGANN & WARE (2018, p. 04). Traduzido pelo autor.

O tratamento causa diminuição de reticulócitos e elevação na concentração de hemoglobina, na porcentagem de células F e no VCM (BRIDGES et al., 1996; COVAS et al., 2004; MCGANN; WARE, 2015). O aumento do VCM pode resultar da hidratação celular promovida pelo medicamento (BRIDGES et al., 1996; ORRINGER et al., 1991). Adicionalmente, a terapia com HU está indiretamente associada a uma diminuição na expressão das moléculas de adesão na superfície de eritrócitos e leucócitos (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013). A expressão de fosfatidilserina na superfície de eritrócitos e plaquetas, assim como a expressão de moléculas de CD36, CD49d e CD71 nos eritrócitos é reduzida e o sistema imune inato acaba sofrendo menos

ativações (COVAS et al., 2004; GLADWIN et al., 2002; KATO et al., 2018; STEINBERG et al., 2003).

Figura 9 – Mudanças no esfregaço de sangue periférico a partir da terapia com HU.



Fonte: Adaptado de MCGANN & WARE (2018, p. 05). Traduzido pelo autor.

A HU possui eficácia oral e é bem tolerada (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010), impactando positivamente na qualidade de vida desses pacientes ao reduzir o número de hospitalizações, tempo de internação, ocorrência de STA e, possivelmente, de eventos neurológicos agudos (CANÇADO; JESUS, 2007). Entretanto, exige-se o monitoramento frequente do hemograma do indivíduo para controle de toxicidade (NEVITT; JONES; HOWARD, 2017). A toxicidade mais comumente encontrada inclui citopenia leve e reversível, que é um resultado esperado e utilizado para determinar a dose máxima a ser ingerida (MCGANN; WARE, 2015).

Dentre outros efeitos adversos do fármaco a curto prazo, destacam-se a anemia, erupção cutânea, cefaléia e ocasionalmente náusea (DAVIES; GILMORE, 2003), que são facilmente reversíveis com manejo de dose ou suspensão do uso (NEVITT; JONES; HOWARD, 2017). Sugere-se também a possibilidade de a HU predispor carcinogenicidade, teratogenicidade e fertilidade reduzida, contudo existem poucas evidências que apoiem essas concepções (KATO et al., 2018; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A HU é subutilizada por causa das deficiências da infraestrutura ou burocracia dos serviços de saúde até mesmo em países desenvolvidos (KATO et al., 2018; MCGANN; WARE, 2015). Ainda hoje, a FDA dos Estados Unidos da América (EUA) é altamente restritiva, indicando HU apenas para pacientes adultos com AF, que tenham CVOs recorrentes de moderadas a graves (ao menos três episódios nos últimos 12 meses) (MCGANN; WARE, 2015). Apesar disso, com o avanço dos

estudos, o uso do medicamento está em crescimento. Estudos de coorte ao longo dos anos mostram que em clínicas especializadas em DF, localizadas em países desenvolvidos, até 63% dos pacientes com AF fazem o uso de HU (ATAGA et al., 2017). Em 2014, o Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue (*National Heart, Lung, and Blood Institute – NHLBI*) lançou novas diretrizes clínicas para o manejo de pacientes com AF e passou a recomendar que todas as crianças afetadas devem receber terapia com HU, começando aos 9 meses de idade (incluindo casos assintomáticos) (YAWN et al., 2014).

Em contraste, na maioria dos países africanos, a porcentagem em uso do medicamento é muito próxima de zero (MCGANN et al., 2016). Um importante fator limitante é a falta de acessibilidade. Hoje, em uma farmácia na Tanzânia, o preço médio de uma dose diária de HU é de aproximadamente US\$ 1,20, que se torna caro por se tratar de um medicamento de uso crônico (LUZZATTO; MAKANI, 2019). Devido à disponibilidade limitada, vários tratamentos e procedimentos fitoterápicos, principalmente provenientes de tradições culturais e de segurança não comprovada são comumente usados para tratar a AF em toda a África (MCGANN et al., 2016). Ainda assim, à medida que os Ministérios da Saúde na África Subsaariana começam a lidar com o crescente impacto da AF em seus países, estima-se que o uso de HU e seu monitoramento sejam compensados por economias em hospitalizações e tratamento de complicações clínicas (MCGANN et al., 2016). Nos EUA, cerca de 230 mil internações/ano são relacionadas à AF, tendo um custo de \$2.4 bilhões de dólares (LANZKRON; PATRICK CARROLL; HAYWOOD, 2013).

Além da HU, novos tratamentos estão sendo desenvolvidos em diversas frentes da doença (Tabela 2). O transplante de células-tronco hematopoéticas (HSCT) tornou-se uma importante opção terapêutica. Atualmente, existem cerca de 35 ensaios clínicos no ClinicalTrials.gov estudando o transplante alogênico em pacientes com DF (CISNEROS; THEIN, 2020). Quando realizado a tempo, ele promove eritropoiese doador-derivada e é capaz de estabilizar ou até mesmo restaurar a função em órgãos afetados pela doença (WALTERS et al., 2010).

Adicionalmente, existem outras opções farmacológicas que visam a polimerização da HbS e ainda estão em fase experimental. Estudos moleculares sobre a  $\gamma$ -globina identificaram elementos regulatórios na expressão gênica e subsequente produção de HbF. As moléculas: histona desacetilase (HDAC), DNA metiltransferase

1 (DNMT1), BCL11A e SOX6 têm sido exploradas como possíveis opções terapêuticas (CISNEROS; THEIN, 2020).

A forma farmacológica da L-glutamina (Endari), que tem como alvo os eventos de vaso-oclusão, foi aprovada pelo FDA para uso em pacientes com DF acima de 5 anos de idade (NIIHARA et al., 2018). A expectativa é que ela possa ser utilizada em uma terapia de combinação com HU no futuro (MINNITI, 2018). Outro fármaco é o Crizanlizumab, um anticorpo monoclonal contra a P-selectina, e seu mecanismo de ação é o de bloquear a adesão de eritrócitos ativados, neutrófilos e plaquetas (CISNEROS; THEIN, 2020). Em um estudo de fase 2, multicêntrico, randomizado, duplo-cego controlado por placebo, o Crizanlizumab (com ou sem combinação com HU) mostrou que os pacientes no grupo de tratamento tiveram uma taxa significativamente menor de crises de dor relacionada à falcização, em comparação ao grupo placebo, e possuíram uma menor incidência de eventos adversos (ATAGA et al., 2017).

Finalmente, a imunoglobulina intravenosa (IVIG) e as estatinas foram estudadas por seus efeitos anti-inflamatórios em neutrófilos e adesão de monócitos (CISNEROS; THEIN, 2020). A Sinvastatina, por exemplo, reduz a adesão dos glóbulos brancos e, em combinação com a HU, diminui o número de crises de dor e marcadores de inflamação (HOPPE et al., 2017).

Tabela 2 - Estudos em andamento ou completos para DF

Alvo	Fármaco	Mecanismos de ação	Identificador ClinicalTrials.gov	Status (fase)
Injúria oxidativa	Glutamina	Aumento de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)	NCT01179217	Completo (3)
	NAC	Aumento de glutatona	NCT01849016	Completo (3)
	Omega-3 FA	Antioxidante	NCT02947100	Em andamento (1 e 2)
	Ácido Alfaipóico	Aumento de glutatona	NCT02604368	Em andamento (3)
	Acetil L-Carnitina	Diminuição de peroxidação lipídica	NCT01054768	Completo (2)
Adesão	Crizanlizumab	Anticorpo monoclonal contra P-selectina	NCT01895361	Completo (2)
	Rivapansel	Inibidor de P-selectina	NCT02187003	Em andamento (3)
	IVIG	Inibidor de ativação/adesão leucocitária	NCT01757418	Em andamento (1 e 2)
	Heparina	Inibidor de P-selectina	NCT02098993	Em andamento (2)
	Propranolol	Inibidor de adesão de eritrócitos no endotélio	NCT02012777 NCT01077921	Terminado (1) Em andamento (2)
Indutores de HbF	Decitabina	Desmetilação/ativação do gene da $\alpha$ -globina	NCT01685515	Em andamento (1)
	Pomalidomida	Inibição da histona desacetilase	NCT01522547	Completo (1)
	Metilbutirato	Inibição da histona desacetilase	NCT01322269	Completo (2)
Outros agentes antifalczantes	Aes-103	Mudar Oxi-Hb	NCT01597401	Completo (1)
	GBT440	Curva de dissociação para esquerda	NCT03036813	Em andamento (3)
	INCB059872	Agente hipometilante, aumenta HbF	NCT03132324	Em andamento (1)
	Panobinostat	Inibição da histona desacetilase, aumenta HbF	NCT01245179	Em andamento (1)
	Senicapoc	Inibidor de desidratação celular	NCT00040677 NCT00102791	Terminado (2) Completo (3)
		Sanguinate	Agente de liberação de monóxido de carbono/transferência de oxigênio	NCT02411708
	SCD-101	Agente antifalczante, mecanismo desconhecido	NCT02380079	Em andamento (1b)
Terapia antiplaquetária	Prasugrel		NCT01794000	Terminado (3)
	Ticagrelor	Inibidor de ativação plaquetária	NCT02482298	Completo (2)
	Eptifibatide		NCT00834899	Terminado (1 e 2)
Agentes antiinflamatórios	Sinvastatina	Ativa a síntese endotelial de ON	NCT01702246	Completo (1)
	Zileuton	Inibidor de leucotrienos	NCT01136941	Completo (1)
	Regadenoson	Antagonista de receptores de adenosina	NCT01788631	Em andamento (2)
Tônus vascular	Magnésio	Aumenta o tônus vascular	NCT01197417	Completo (2 e 3)
	L-arginina	Substrato para ON	NCT02447874	Em andamento (1 e 2)
Mecanismos anticoagulantes	Rivaroxiban	Inibidor da cascata de coagulação	NCT02072668	Em andamento (2)
	Apixaban	Inibidor da cascata de coagulação	NCT02179177	Em andamento (2)

Fonte: Adaptado de KAPOOR; LITTLE; PECKER (2018).

## 2.6 Acompanhamento Laboratorial

A portaria conjunta nº05, de 19 de fevereiro de 2018 aprovou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da DF (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), especificam os exames e os parâmetros clínicos convencionais para monitoramento dos pacientes com AF, como o hemograma com contagem de plaquetas e percentual de reticulócitos. O hemograma representa entre 45-62,3% de todos os pedidos médicos que dão entrada em laboratórios de análises clínicas (FAILACE; FERNANDES, 2015) e é considerada a primeira avaliação realizada em portadores de AF (SAVAGE et al., 2015). Ele possibilita inferir as anormalidades que indicam potenciais patologias instaladas, tais como processos infecciosos (aos quais esses pacientes possuem alta susceptibilidade) e a mielossupressão, que pode ser desencadeada pelo tratamento com HU (COVAS et al., 2004; DAVIES; GILMORE, 2003).

Nos últimos 20 anos, com o avanço de novas tecnologias, a automatização laboratorial excluiu quase completamente os métodos clássicos (CELKAN, 2020) e, portanto, surgiram novas possibilidades diagnósticas. Tais ferramentas vêm auxiliando na confecção de resultados cada vez mais rápidos e confiáveis, promovendo agilidade, padronização, alta sensibilidade, precisão e menos chances de erros humanos e riscos de contaminação amostral (FAILACE; FERNANDES, 2015; SUMITA et al., 2017).

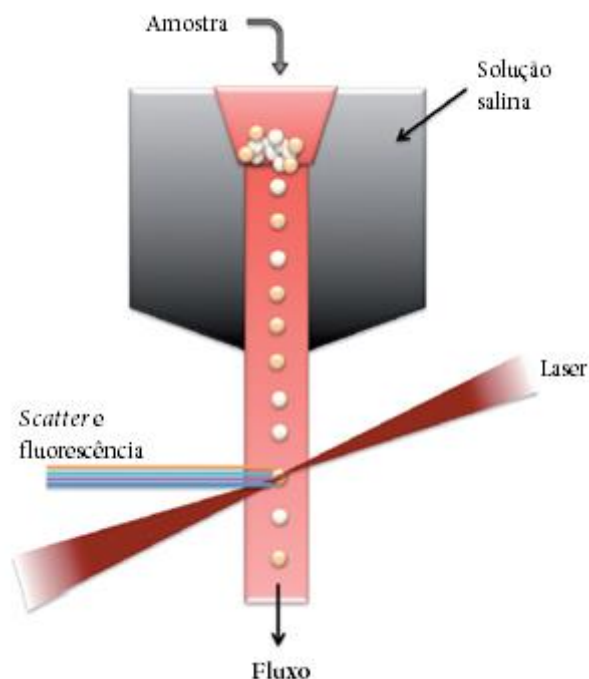
Os Parâmetros Clínicos Avançados (PCAs) configuram uma modernização na automação do hemograma ao conceder informações detalhadas sobre certos aspectos clínicos, auxiliando em diagnósticos diferenciais e na otimização da requisição de testes adicionais, impactando na redução dos custos hospitalares e laboratoriais (SUMITA et al., 2017). Entre os benefícios dos PCAs, destaca-se a análise do grau de maturidade celular, que permite uma avaliação precoce de alterações na hematopoiese.

Os PCAs incluem os seguintes parâmetros: Fração de Reticulócitos Imaturos (*Immature Reticulocytes Fraction* - IRF), Fração de plaquetas imaturas (*Immature Platelet Fraction* - IPF), Eritrócitos Nucleados (*Nucleated Red Blood Cells* - NRBC), Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos (RET-HE), Plaquetas Fluorescentes (PLT-F) e Granulócitos Imaturos (*Immature Granulocytes* - IG) (SUMITA et al., 2017).

O IRF auxilia na avaliação do grau de maturidade dos reticulócitos, enquanto o IPF auxilia na avaliação da maturidade das plaquetas. Esses parâmetros são importantes marcadores de alterações na eritropoiese e trombocitopoiese, respectivamente. O funcionamento e atividade medular pode ser avaliado pelo NRBC por meio da mensuração do número de eritroblastos presentes no sangue periférico. Já a PLT-F permite a realização de contagens exatas em amostras com apenas  $20.000 \times 10^3/\mu\text{L}$  plaquetas (de comum utilização em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática) (PAGE et al., 2017; SCHOORL et al., 2013). O RET-He é um importante indicador da qualidade dos reticulócitos produzidos em níveis de medula óssea, pois pode identificar quadros de anemia antes mesmo das manifestações clínicas (UÇAR et al., 2019). O IG é capaz de quantificar a presença de leucócitos imaturos, indicando a presença de um desvio à esquerda. Além disso, ele é um importante marcador de sepse, que é uma complicação recorrente em pacientes com AF (KARON et al., 2017; NAVALKELE et al., 2017; PAYNE et al., 2013).

A citometria de fluxo é o padrão ouro para contagem de células sanguíneas e o principal método usado para medir os PCAs. Esta tecnologia permite leituras individuais de vários parâmetros para cada célula em um meio líquido salino tamponado. O princípio envolvido na técnica está relacionado à dispersão de luz e emissão de fluorescência que ocorre a partir da luz da fonte de excitação (comumente um feixe de laser) incidindo em diferentes ângulos na célula (Fig. 10) (ADAN et al., 2017). Assim, fornece-se informações sobre a complexidade, tamanho e granularidade celular e, adicionalmente, leitura do pulso por um detector de fosfodióxido e fotomultiplicadores que os interprete como gráficos (ScatterGraph) (BUTTARELLO et al., 2020; CORBERAND, 1996; PIVA et al., 2015; TANAKA et al., 2014; TANTANATE; KHOWAWISETSUT; PATTANAPANYASAT, 2017; WANG et al., 2003).

Figura 10 – O princípio do funcionamento de um citômetro de fluxo.



Fonte: Adaptado de ADAN *et al.* (2017, p. 03). Traduzido pelo autor.

### 2.6.1 – Fração de Reticulócitos Imaturos - IRF

A medula óssea é estimulada pela eritropoietina (EPO), um hormônio secretado pelos rins. Ela atua principalmente nas células progenitoras dos eritrócitos e precursores da eritropoiese, e é responsável por estimular as unidades formadoras de colônias de eritrócitos (UFC-E) (NANDAKUMAR; ULIRSCH; SANKARAN, 2016), aumentando a produção de reticulócitos. Os níveis de EPO normalmente se encontram elevados por três a quatro dias antes de ocorrer um aumento na contagem de reticulócitos (RILEY *et al.*, 2001).

Os reticulócitos representam uma etapa evolutiva no processo eritropoiético. Eles são eritrócitos imaturos produzidos na MO, onde se desenvolvem por um período de um a três dias (RAI; WILSON; MOOSAVI, 2020). Ao serem liberados na corrente sanguínea, possuem uma vida útil de um a dois dias, onde passam por diversas mudanças estruturais antes de se tornarem hemácias maduras (MAST; BLINDER; DIETZEN, 2008). Quando comparados a elas, os reticulócitos possuem maior volume,

maior conteúdo de Hb e menor concentração de Hb (RAI; WILSON; MOOSAVI, 2020). Ao entrar no sangue periférico, eles têm o conteúdo máximo de Hb possível, pois só podem sintetizá-la enquanto se encontram na medula óssea (PIVA et al., 2015).

Reticulócitos são um indicador clínico útil de resposta da medula óssea a anemias. Portanto, um aumento ou diminuição na sua contagem pode assinalar atividade ou falha da eritropoiese, especialmente em relação à disfunção da medula óssea (BUTTARELLO, 2016; PIVA et al., 2015; RILEY et al., 2001; SCHAPKAITZ, 2018).

A partir de 1940, o método tradicional para avaliação do número de reticulócitos passou a ser a contagem manual por microscopia, utilizando-se corantes supra-vitais (UPPAL et al., 2020). A coloração permite que as células sejam reconhecidas pelo precipitado intracitoplasmático azul, variando da aparência de grânulos à uma rede de material reticular (PIVA et al., 2015). Entretanto, a contagem de reticulócitos por esse meio não é mais comumente utilizada devido à sua baixa reprodutibilidade e não confiabilidade com um coeficiente de variação de 25% a 48% (PRELOZNIK-ZUPAN; CERNELC; ZONTAR, 2000). A implantação da citometria de fluxo e dos corantes fluorescentes iniciou-se na década de 1990 e levou à automação da contagem reticulocitária.

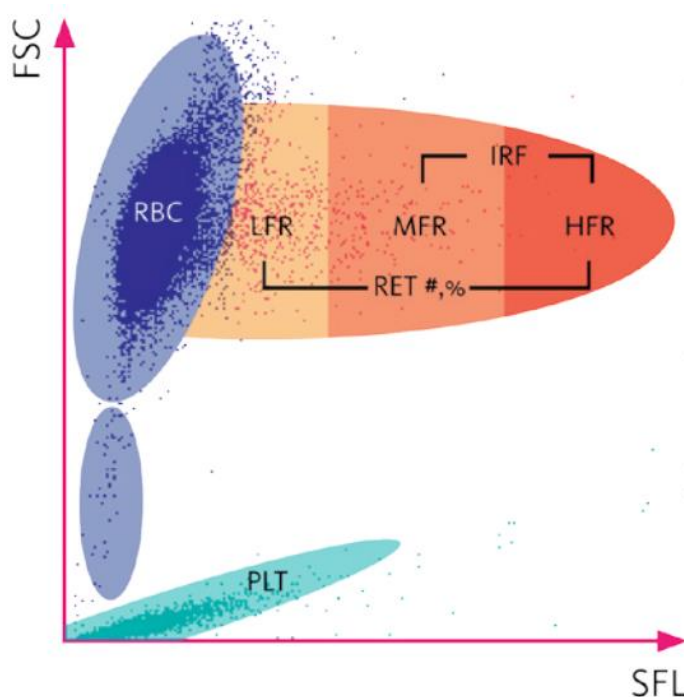
Analisadores hematológicos automatizados equipados com parâmetros para contagem de reticulócitos e citômetros de fluxo podem ser utilizados para a avaliação deste parâmetro (UPPAL et al., 2020). Os analisadores hematológicos automatizados utilizam corantes fluorescentes ou não-fluorescentes que se ligam ao ácido ribonucleico (RNA) dos reticulócitos e, subsequentemente, os enumera com base em diversos princípios como impedância, dispersão ou fluorescência (UPPAL et al., 2020). O citômetro de fluxo utiliza-se somente de corantes fluorescentes e analisa um maior número de eventos, minimizando o viés estatístico inerente ao método tradicional (CORBERAND, 1996; UPPAL et al., 2020).

A citometria de fluxo é o método mais comumente utilizado para a contagem de reticulócitos (RAI; WILSON; MOOSAVI, 2020). A primeira etapa do processo é a coloração dos reticulócitos pela mistura da solução de laranja de tiazol (TO) com sangue total. Essa solução é mantida no escuro, incubada em temperatura ambiente e, em seguida, exposta ao feixe de laser. A coloração adere ao RNA ribossomal (rRNA), que permite a diferenciação quanto ao estadiamento dos reticulócitos (RAI; WILSON; MOOSAVI, 2020). O grau de imaturidade está diretamente relacionado ao

grau de fluorescência emitido por estas células; quanto mais RNA intracelular houver, mais imaturo será o reticulócito e maior será a fluorescência (JOÃO; PINTO; COSTA, 2008). A contagem será determinada pela porcentagem dos reticulócitos na quantidade total de hemácias.

Existem três categorias que representam seus diferentes estágios de maturidade: LFR (reticulócitos de baixa fluorescência - reticulócitos "maduros"), MFR (reticulócitos de fluorescência média - reticulócitos "semi-maduros") e HFR (reticulócitos de alta fluorescência - reticulócitos "imaturos"). O IRF é definido como a soma das regiões de média e alta fluorescência (HFR e MFR) e é também referido como o "índice de maturação de reticulócitos" (Fig. 11).

Figura 11 – *Scattergram* mostrando a dispersão dos diferentes estágios de maturação reticulocitária.



Fonte: PÉREZ-ÉCIJA & GARCÍA (2021, p. 03).

O IRF possui grande utilidade em pacientes com leucemia em quimioterapia ou após transplante de MO, determinando a atividade regenerativa da medula óssea durante e depois do tratamento (MORKIS et al., 2015). Um dos efeitos da HU é diminuição na produção reticulocitária, causando uma diminuição na contagem dessas células.

Portanto, é necessário o monitoramento frequente de reticulócitos durante o uso deste medicamento.

### **2.6.2 - Fração de Plaquetas Imaturas - IPF**

Plaquetas imaturas são plaquetas recém-liberadas da medula óssea por megacariócitos (IMPERIALI et al., 2018) e têm uma vida útil de menos de 24 horas (HOFFMANN, 2014). Em comparação com as plaquetas maduras, essas plaquetas são maiores, mais reativas e contêm mais RNA (BUTTARELLO et al., 2020; IMPERIALI et al., 2018).

Inicialmente, as plaquetas imaturas (anteriormente também conhecidas como “reticuladas”) eram mensuradas por meio do uso de citômetros de fluxo e corantes fluorescentes que se ligam ao RNA (BUTTARELLO et al., 2020). Entretanto, os intervalos de referência especificados por diferentes autores eram inconstantes, variando de 2% a 17% da contagem total de plaquetas (MATIC et al., 1998; RINDER et al., 1993). Esse fenômeno pode ser explicado pela falta de padronização metodológica, principalmente devido a: (i) diferentes fontes comerciais e concentrações de corantes fluorescentes, (ii) absorção inespecífica de corantes de RNA pelos grânulos presentes no citoplasma plaquetário, (iii) tempo e temperatura de incubação e (iv) análise dos dados (BUTTARELLO et al., 2020).

Para a determinação das plaquetas imaturas, os laboratórios de pesquisa adotaram majoritariamente técnicas com uso de corante TO e citometria de fluxo, aprimoradas após a introdução do *gating* (MATIC et al., 1998). *Gating* em citometria de fluxo é identificação sequencial e refinamento de uma população celular de interesse usando um painel de marcadores (REYNOLDS, 2020). O corante TO é extensivamente para a coloração e detecção de plaquetas imaturas, pois é excitável a 488 nm, pode ser usado com a maioria dos citômetros de fluxo e trespassa prontamente a membrana celular (BUTTARELLO et al., 2020).

Nos últimos anos, novos parâmetros relacionados à função plaquetária foram desenvolvidos, como a Fração de Plaquetas Imaturas (IPF) (KO et al., 2015; LI et al., 2020) como um método inovador de aferir a atividade medular quanto a produção de novos trombócitos (DUSSE; FREITAS, 2014). Assim como os reticulócitos, as plaquetas imaturas podem ser relatadas como porcentagem ou um número absoluto ( $\times 10^9/L$ ) (BUTTARELLO et al., 2020).

Atualmente a análise da IPF é totalmente automatizada ao ser integrada aos analisadores hematológicos de rotina. Em analisadores hematológicos Sysmex, incluindo sistemas XE-2100 e XE-5000 (Sysmex, Kobe, Japão), a IPF é medida no canal de plaquetas ópticas usando um corante fluorescente e um sistema de passagem cuidadosamente projetado (JUNG et al., 2010; KO et al., 2015; MEINTKER et al., 2013). Um feixe de diodo semiconductor passa através das células coradas e mede-se a dispersão direta resultante (volume da célula) e intensidade de fluorescência (principalmente devido ao conteúdo de RNA) (BUTTARELLO et al., 2020). A partir disso, um algoritmo de computador discrimina entre as plaquetas maduras e a IPF. Esse índice pode ser relatado como porcentagem de IPF (%IPF) e IPF absoluto (A-IPF) (IMPERIALI et al., 2018).

Outros analisadores como o *Abbott Cell-Dyn Sapphire (Abbott)* se referem à IPF como “plaquetas reticuladas” (retPLT/RP) e a medem como parte da análise reticulocitária, utilizando o corante fluorescente CD4K530. O analisador realiza o registro da luz dispersa (em um ângulo de 7°) e da fluorescência, e um algoritmo separa as plaquetas das hemácias. Por fim, o *gating* de retPLT é definido com correção para fluorescência de fundo *size-dependent* (BUTTARELLO et al., 2020; HOFFMANN; VAN DEN BROEK; CURVERS, 2013).

Similarmente, o analisador Mindray BC-6800 (Mindray) realiza a detecção de %IPF junto com os reticulócitos por meio de um corante à base de cianina para coloração de RNA. A IPF é derivada de dispersão direta *versus* gráfico de dispersão de fluorescência lateral e os resultados são expressos em porcentagem (BUTTARELLO et al., 2020).

As comparações entre o RP obtido com métodos de citometria de fluxo usando TO e IPF obtido com o XE-2100/5000 mostram certa correlação entre os parâmetros e que, tanto nos controles quanto nas diferentes categorias de doenças (doença coronariana crônica, *bypass* pós-coronariano, trombocitopenia periférica, doença renal), os valores encontrados foram maiores para RP (BUTTARELLO et al., 2020; IBRAHIM et al., 2016; SAKURAGI et al., 2015). Algumas explicações para essas diferenças nos resultados podem estar relacionadas às estratégias de *gating* ou às variações dos corantes disponíveis comercialmente (ou ainda se a preparação ocorre no próprio laboratório) (BUTTARELLO et al., 2020).

Dentre as limitações deste parâmetro está a falta de definição de valores normais em indivíduos saudáveis (JOERGENSEN; BATHUM, 2016; JUNG et al.,

2010; KO et al., 2013). KO et al. (2013) encontraram um intervalo de confiança geral de 0.5–3.3% utilizando o analisador hematológico Sysmex XE-2100. Já JOERGENSEN & BATHUM (2016) estabeleceram um intervalo de 1.3–9.0% por meio do analisador Sysmex XE-5000.

Adicionalmente, nos analisadores Sysmex XE-2100/5000, certos fragmentos de leucócitos contendo maiores quantidades de RNA podem interferir na medição da IPF. Além disso, ligações não específicas entre os corantes e fragmentos eritrocitários são possíveis interferentes (SAKURAGI et al., 2015). Analisadores Sysmex XN de nova geração estão demonstrando maior sensibilidade e especificidade para medição de IPF% (BRIGGS et al., 2012); entretanto, a maioria dos estudos ainda é realizada em hemocitômetros Sysmex XE (VAN DE WYNGAERT et al., 2020).

Em pacientes com AF, por serem maiores, mais densas e mais ativas no processo de formação do trombo hemostático, as plaquetas imaturas contribuem para a instalação e manutenção de processos vaso-oclusivos (MCCABE et al., 2004; NORONHA et al., 2007). A asplenia funcional presente na doença compromete o sequestro esplênico das células senescentes ou danificadas, alargando o tempo de permanência das plaquetas circulantes (WUN et al., 1997). O IPF demonstra um aumento mais precoce quando comparado com a contagem clássica de plaquetas no transplante de medula óssea (MORKIS et al., 2015; SAXON et al., 1998). O estudo deste parâmetro pode verificar se ele apresenta essa mesma característica em outras doenças, como a AF.

### **2.6.3 - Eritrócitos nucleados – NRBC**

Os “*nucleated red blood cells*” (NRBC) são precursores eritrocitários e são fisiologicamente confinados à medula óssea (BUORO et al., 2015). Recém-nascidos saudáveis têm NRBCs circulantes que desaparecem rapidamente algumas semanas após o nascimento (MAY et al., 2019; WANG et al., 2003). No entanto, essas células podem retornar à circulação em diversas situações patológicas (BUORO et al., 2015; DANISE et al., 2012).

Perdas sanguíneas agudas ou hemólise acelerada podem causar a liberação de NRBCs na corrente sanguínea, conforme ocorre o aumento da eritropoiese, em uma tentativa de compensar a anemia aguda (MAY et al., 2019). Danos ou estresse na medula óssea também fazem com que os NRBCs estejam presentes no sangue

periférico, como costuma ser o caso em doenças hematológicas (BUORO et al., 2015; DANISE et al., 2012; MAY et al., 2019).

Por muito tempo a contagem de NRBCs era realizada utilizando a análise manual de esfregaços sanguíneos, pois os analisadores hematológicos não eram capazes de corretamente diferenciar NRBCs de pequenos linfócitos (HWANG et al., 2016). Contudo, falhas de reprodutibilidade intra e interobservador, aliadas ao pequeno número de células contadas (100 células), culminaram na restrição da exatidão e precisão do método (DANISE et al., 2012; HWANG et al., 2016). Além disso, essas contagens eram trabalhosas e caras (DANISE et al., 2012).

A série de hemocitômetros Sysmex XE (2100 e 5000; Sysmex Co., Kobe, Japão) analisa as NRBCs (absoluto e porcentagem) em um canal específico por meio de uma combinação de um sistema óptico de fluorescência, associado a um agente lisante (BUORO et al., 2015; HWANG et al., 2016). Como resultado do processo de lise seletiva dos eritrócitos, os núcleos das NRBCs e leucócitos permanecem intactos e seus ácidos nucleicos (DNA e RNA) são corados com o corante fluorescente de polimetina (BUORO et al., 2015). As diferentes intensidades de coloração entre os núcleos das NRBCs e dos leucócitos, em conjunto com seus diferentes volumes, são detectadas por um laser semiconductor usando luz dispersa direta e fluorescência (BRIGGS et al., 2011; HWANG et al., 2016; URRECHAGA; BORQUE; ESCANERO, 2009). As organelas intracitoplasmáticas e o núcleo de leucócitos são corados com bastante força, enquanto a coloração de NRBCs é fraca, permitindo uma diferenciação clara entre as contagens (BRIGGS et al., 2012).

Nos analisadores Sysmex, a maioria dos hemocitômetros da série XE-5000 reporta automaticamente a contagem NRBC para todas as amostras. Contudo, alguns modelos somente realizam a contagem dessas células quando recebem um *flag*, de modo a economizar corante (BRIGGS et al., 2011). Quando um *flag* para NRBC é acionado, as amostras são executadas novamente no modo NRBC para enumerá-los e corrigir a contagem de leucócitos e o diferencial (BRIGGS et al., 2011).

O analisador XN Modular (Sysmex) foi lançado em 2011. Ao avaliar as características de desempenho dos novos métodos e compará-los com a série XE-2100, BRIGGS et al. (2012) verificaram que dentre as novas atualizações, a contagem de NRBC é realizada em todas as amostras; não há mais necessidade de repetir a contagem no canal NRBC como antes. Dentre as limitações dos analisadores mais antigos, também está a sensibilidade e precisão limitadas para a contagem de NRBC

em amostras com valores baixos e em condições em que os eritrócitos possuem sensibilidade alterada ao processo de lise (BUORO et al., 2015; GULATI et al., 2007; PIPITONE et al., 2012).

Apesar de saber-se que a presença de NRBCs no sangue periférico está associada a distúrbios hematológicos, a primeira aplicação clínica derivada de sua contagem foi publicada apenas em 1969 (DANISE et al., 2012; PIOMELLI; DANOFF; BECKER, 1969). Atualmente, sabe-se que esse parâmetro possui um valor prognóstico significativo (BUORO et al., 2015), podendo otimizar transfusões em pacientes com beta talassemia *major* (DANISE et al., 2009; KARAKUKCU et al., 2015).

Esse parâmetro é considerado um importante preditor de aumento da morbidade e mortalidade entre adultos hospitalizados (BALLANTINE; KWON; LIEM, 2019). NARCI *et al.* (2020) investigaram a predição de NRBCs em 204 pacientes que morreram de causas não traumáticas e, durante a análise de regressão logística multivariada, ele foi associado a todas as causas de mortalidade em pacientes admitidos na emergência. Já PURTLE *et al.* (2017) levantaram a hipótese de que a presença de NRBC em pacientes que sobreviveram a cuidados intensivos estaria associada a resultados adversos após a alta hospitalar. Eles encontraram que o risco absoluto de mortalidade em 90 dias pós-alta foi de 5,9%, 11,7%, 15,8% e 21,9% em pacientes com 0/ $\mu$ l, 1–100/ $\mu$ l, 101–200/ $\mu$ l e mais de 200/ $\mu$ l de NRBC, respectivamente.

ATAGA & ORRINGER (2000) descreveram três casos de pacientes com DF e necrose de medula óssea e o curso clínico em todos foi caracterizado por altos números de NRBC. Adicionalmente, o seu aumento em pacientes com DF pode refletir o aumento da eritropoiese. BALLANTINE; KWON & LIEM (2019) encontraram uma associação entre o aumento nas contagens de NRBC e o desenvolvimento de STA/necessidade de transfusão em crianças com DF hospitalizadas por CVO, sugerindo que NRBCs podem representar um biomarcador útil para prever complicações nesses pacientes. Entretanto, seu significado prognóstico em adultos ou crianças com DF ainda não é bem compreendido e há a necessidade de estudos mais profundos (BALLANTINE; KWON; LIEM, 2019).

#### **2.6.4 - Contagem de Plaquetas por Fluorescência – PLT-F**

Alta exatidão e precisão na avaliação plaquetária são essenciais para decisões clínicas apropriadas, especialmente em amostras com baixa contagem de plaquetas (SCHOORL et al., 2013). A primeira geração de contadores de plaquetas automatizados foi desenvolvida há quase meio século para substituir a contagem manual de rotina (RAPPAPORT et al., 1988).

Sistemas de primeira geração aprimorados, como Plaquetas por impedância (PLT-I) (Sysmex, Kobe, Japão), LH-750 (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e CDS-I (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, EUA), ainda são utilizados em laboratórios clínicos por estarem instalados em modernos analisadores hematológicos (WADA et al., 2015). Contudo, vários fatores influenciam a precisão das contagens. Partículas não plaquetárias, como eritrócitos e leucócitos fragmentados, não são corretamente distinguidos, pois esses sistemas diferem apenas os tamanhos das partículas, que são medidos usando impedância elétrica (TANAKA et al., 2014; WADA et al., 2015). Isso resulta em resultados de análise falsamente elevados (TANAKA et al., 2014).

Como solução, desenvolveu-se um método preciso de contagem utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-CD61 (DICKERHOFF; VON RUECKER, 1995; HARRISON et al., 2001; TANAKA et al., 2014). Apesar de ter se tornado referência em contagem de plaquetas, devido a um custo operacional elevado e volume amostral de  $\geq 1$ ml, o método imunológico não se tornou padrão em laboratórios clínicos gerais (TANAKA et al., 2014; WADA et al., 2015).

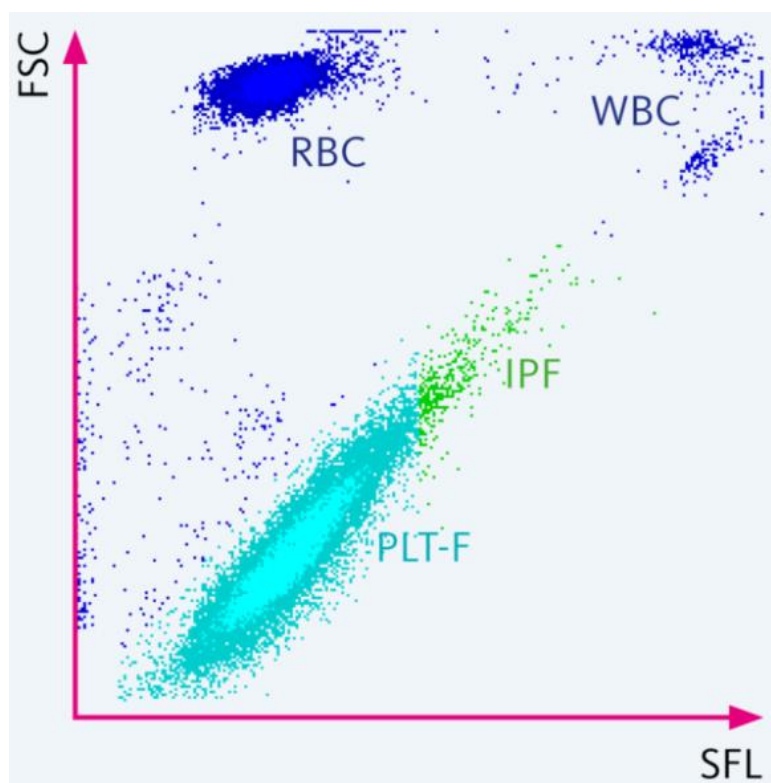
Os analisadores hematológicos de segunda geração foram desenvolvidos embasados na citometria de fluxo. Esses sistemas, como as plaquetas ópticas (PLT-O - Sysmex), CDS-O (*AlinIQ Clinical Decision Support* - Abbott) e método de contagem óptica ADVIA (Siemens), são instalados em analisadores hematológicos automatizados (WADA et al., 2015). A contagem plaquetária é fidedigna na maioria das amostras, com exceção para aquelas com baixa concentração de plaquetas ou aquelas contendo células anormais, como megatrombócitos (DIQUATTRO et al., 2009; HONG et al., 2009; TVEDTEN, 2010).

A Contagem de Plaquetas por Fluorescência (PLT-F) representa a última geração em métodos de contagem automática plaquetária. Ele se baseia em marcação fluorescente e citometria de fluxo. Os analisadores hematológicos automatizados da série XN (Sysmex) são equipados com um canal PLT-F onde a

quantificação plaquetária é realizada com o uso do corante Fluorocell fluorescente (oxazina), com tempo e volume de contagem prolongados com o intuito de diminuir o número de interferências durante a contagem (WADA et al., 2015).

Durante o processo de lise, as membranas plaquetárias são perfuradas pelo reagente, mas permanecem praticamente intactas. Posteriormente, o marcador de fluorescência marca especificamente o RNA dentro das plaquetas, evitando interferências com outras células ou fragmentos de tamanho semelhante. Usando a luz dispersa direta e fluorescência, as plaquetas são separadas dos eritrócitos e leucócitos (SYSMEX, [s.d.]) (Fig. 12). O sistema PLT-F é superior aos dois métodos de rotina existentes: o PLT-O de segunda geração e Plaquetas por impedância (PLT-I) de primeira geração (WADA et al., 2015) e correlaciona-se altamente com o método imunológico, mesmo para amostras com baixas concentrações de plaquetas (BRIGGS et al., 2012; SCHOORL et al., 2013; SEO; LEE; KIM, 2015; TANAKA et al., 2014).

Figura 12 – *Scattergram* do canal PLT-F com uma distribuição normal de células



Fonte: Sysmex Europe website, 2021.

Os analisadores da série XN também são equipados com um canal PLT-I baseado em um método de impedância elétrica e o canal PLT-O baseado em um método óptico (TANAKA et al., 2014). Ao comparar os sistemas PLT-F, PLT-O e PLT-I, WADA et al. (2015) utilizaram sangue artificial contendo plaquetas e altas concentrações de eritrócitos fragmentados. O sistema PLT-F mostrou apenas um aumento de 15-17% na contagem de plaquetas, enquanto os sistemas PLT-O e PLT-I mostraram aumentos de mais de 300%.

O PLT-F mostrou possuir alta reprodutibilidade principalmente em amostras com severa trombocitopenia ( $<50.000 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) (WILLIAMSON et al., 2013), se comparado aos métodos tradicionais PLT-O e PLT-I (SCHOORL et al., 2013). Um estudo recente comparou as três metodologias (PLT-I, PLT-O e PLT-F) em pacientes com talassemia, e encontrou significativa diferença entre os tipos de talassemia na plaquetometria realizada pela PLT-F, enquanto nas outras metodologias ela não foi encontrada (TANTANATE; KHOWAWISETSUT; PATTANAPANYASAT, 2017). Apesar de não haver relatos na literatura que explorem esse parâmetro na AF, por ser uma doença hemolítica, é possível que as contagens plaquetárias estejam alteradas, causando falsas impressões das reais contagens sanguíneas.

#### **2.6.5 - Conteúdo de Hemoglobina no Reticulócito - RET-He**

Analisadores hematológicos evoluíram consideravelmente nos últimos anos, disponibilizando novos parâmetros que fornecem informações a nível celular sobre a disponibilidade de ferro para eritropoiese (LEVY; SCHAPKAITZ, 2018). Dentre eles estão a porcentagem de hemácias microcíticas (% Micro-R), porcentagem de hemácias hipocrômicas (% Hypo-He) e o conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos (RET-He).

O RET-He é o mais amplamente estabelecido e fornece uma medida indireta do ferro disponível para a produção de novos eritrócitos nos últimos 3-4 dias (BRIGGS et al., 2012). Como os reticulócitos têm uma vida útil mais curta (1-2 dias) do que as hemácias maduras, o RET-He fornece uma indicação precoce de deficiência de ferro (TOKI et al., 2017).

LEVY & SCHAPKAITZ (2018) mediram o RET-He de mulheres grávidas em analisadores Sysmex XN-9000. Para a análise desse parâmetro, as células são

coradas por meio de um corante de ácido nucléico, no canal de reticulócitos, e analisadas por citometria de fluxo fluorescente. A luz dispersa direta *versus* fluorescência é representada como um *scattergram* mostrando eritrócitos e reticulócitos maduros. Os autores encontraram que o desempenho do RET-He foi superior aos parâmetros hematológicos padrão.

Nos analisadores ADVIA 120 e 2120 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) o parâmetro equivalente ao RET-He é o CHr (conteúdo médio de Hb celular dos reticulócitos). Ele é medido no *Hematology System Reticulocyte Count* (RETIC) juntamente com a concentração e porcentagem de reticulócitos (#RETIC e %RETIC, respectivamente) (ADVIA®, 2010).

Os estoques de ferro no corpo existem principalmente na forma de ferritina e, em contraste com a Hb, não são afetados por elevações acima do nível do mar ou pelo fumo. Contudo, de acordo com *guidelines* da Organização Mundial da Saúde (OMS), a ferritina é uma proteína de resposta de fase aguda e tem suas concentrações aumentadas durante a inflamação, tornando a interpretação clínica dos resultados difícil ou impossível (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). O diagnóstico de deficiência de ferro utiliza uma combinação de diversos parâmetros além da ferritina, incluindo a saturação de transferrina, ferro sérico e o VCM. Na AF, as reações inflamatórias decorrentes das CVOs podem influenciar esses testes. Desse modo, esse é um possível nicho de atuação do RET-He.

UIJTERSCHOUT *et al.* (2014) analisaram as associações entre o RET-He, ferritina, receptor de transferrina solúvel (sTfR), VCM e hemoglobina (Hb) em crianças com idades entre 0,5 e 3 anos. A hipótese inicial era de que crianças pequenas com depleção de ferro (usando o ponto de corte da OMS para ferritina  $<12 \mu\text{g/l}$ ), teriam menor RET-He e maiores concentrações de sTfR em comparação com crianças com ferritina  $\geq 12 \mu\text{g/l}$ . Apesar do estudo mostrar que o RET-He diminuiu com níveis baixos de ferritina e que seus níveis foram significativamente correlacionados com a ferritina, VCM e Hb, isso aconteceu somente quando os estoques de ferro estavam severamente esgotados (ferritina:  $<8 \mu\text{g/l}$ ).

O potencial clínico do RET-He para o diagnóstico de deficiência de ferro é limitado pela falta de intervalos de referência bem estabelecidos (LÖFVING *et al.*, 2018). Em 2018, VÁZQUEZ-LÓPEZ *et al.* (2019) avaliaram a utilidade do RET-He, sTfR e o índice de sTfR/log (sTfR-F) como um meio de identificar deficiência de ferro em crianças sem anemia e em adolescentes saudáveis. Os autores também

procuraram obter pontos de corte específicos por idade e sexo, e propor uma definição alternativa de deficiência de ferro com base nessas novas medidas. Embora comparável aos parâmetros clássicos, o valor de RET-He sozinho não foi considerado suficientemente indicativo nas fases iniciais da deficiência de ferro (AUC 0,68, IC 95% 0,61-0,74). Isso pode ser explicado pelo fato de que indivíduos com anemia ferropriva foram excluídos deste estudo, e que esse parâmetro só passa a apresentar alterações quando a produção de Hb está comprometida.

Apesar disso, os autores consideraram que o RET-He melhora a eficiência diagnóstica, se utilizado em conjunto com outros marcadores. Seu *cutoff* foi de <27 pg (1–5 anos) e <28.5 pg (6–16 anos). Embora não exista um padrão ouro, os autores traçaram suas definições para a deficiência de ferro sem a presença de anemia como: (a) *esgotamento do estoque de ferro*: ferritina baixa; (b) *eritropoiese com deficiência de ferro*: alto índice sTfR-F (que refletiria situações com sTfR alto e ferritina baixa e também condições em que há depleção do estoque de ferro, mas nenhum impacto sobre sTfR); (c) ou a combinação de  $\geq 2$  parâmetros entre ferritina baixa, CHr baixo e sTfR alto.

Já AHMED; FAYEK & SALEM (2020) procuraram avaliar o papel do RET-He no diagnóstico de anemia ferropriva em 102 pacientes utilizando o analisador Sysmex XN1000. O grupo com anemia apresentou níveis de RET-He significativamente mais baixos do que os do grupo controle com um *cutoff* de 26,5 pg com sensibilidade de 80% e especificidade de 90%.

Em 2014, o uso de RET-He para descartar rapidamente a eritropoiese por deficiência de ferro na presença de anemias complexas, decorrentes de câncer, foi demonstrado. Usando um *cutoff* de 32 pg/célula, esse parâmetro descartou a deficiência de ferro na população do estudo (n = 209) e em uma subpopulação de pacientes com baixa contagens de reticulócitos (n = 19) com um valor preditivo negativo (VPN) de 98,5% e 100%, respectivamente para essas populações. Em comparação, o VPN dos parâmetros tradicionais do hemograma (Hb <11 g / dL; VCM <80 fL) foi de apenas 88,5% (PEERSCHKE; PESSIN; MASLAK, 2014).

A etiologia da anemia em pacientes com câncer é complexa, envolvendo citopenias secundárias à quimioterapia, insuficiência da MO, doença crônica/inflamação (PEERSCHKE; PESSIN; MASLAK, 2014). Pacientes com AF compartilham algumas dessas características devido à natureza inflamatória da doença. Adicionalmente, eles podem sofrer citopenias secundárias o uso de HU e

supressão da MO. Desse modo, apesar de esse parâmetro não ter sido avaliado no cenário das DF, é relevante o seu escrutínio em cenários multifacetados.

Devido ao *turnover* lento dos eritrócitos (~120 dias), os parâmetros tradicionais do hemograma acerca dos índices de eritrócitos maduros (VCM, HCM e amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos [RDW]) podem não detectar os efeitos da deficiência de ferro precoce na eritropoiese. Esse fato, juntamente com a capacidade do RET-He de fazer parte da análise automatizada do hemograma, indica que esse parâmetro pode melhorar significativamente o manejo do paciente, particularmente em um ambiente ambulatorial (LÖFVING et al., 2018).

### **2.6.6 - Índice de Granulócitos Imaturos – IG**

Em resposta aos estímulos inflamatórios sinalizados à medula óssea durante o estresse ou infecção, formas de neutrófilos menos maduras podem entrar na circulação. Isso é conhecido como desvio à esquerda, que é definido como uma proporção elevada de granulócitos imaturos/totais ou uma contagem elevada de neutrófilos bastonetes (CORNBLEET, 2002; PARK et al., 2011).

A contagem de granulócitos imaturos (IGs) refere-se à soma de promielócitos, mielócitos e metamielócitos que amadurecem junto com a série mieloide a partir de células-tronco multipotentes localizadas na medula óssea (INCIR; KANT CALTI; PALAOGLU, 2020). Esse parâmetro é expresso como contagem absoluta de células e como porcentagem dos leucócitos.

A quantificação de IGs na contagem diferencial apesar de ser ainda considerada útil, especialmente em pacientes leucopênicos, é um teste demorado e trabalhoso. Portanto, é necessária uma seleção cuidadosa do paciente (WILE et al., 2001). Atualmente, pode-se utilizar analisadores hematológicos automatizados. Eles permitem a quantificação simples, rápida e barata dos IGs como um marcador da atividade da medula óssea, sem a necessidade de coleta de amostras de sangue extras (VAN DER GEEST et al., 2014).

Nos analisadores ADVIA (Siemens), uma estimativa da porcentagem de IGs é fornecida subtraindo a porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) da soma da porcentagem de neutrófilos e porcentagem de eosinófilos. Se o resultado for igual ou maior que 5%, a *flag* para IGs é acionada.

$$[(\% \text{ NEUT } + \% \text{ EOS}) - \% \text{ PMN}] \geq 5,0\%$$

Os valores padrão de acionamento das *flags* de acordo com os níveis de gravidade são:

$$+ [(\% \text{ NEUT } + \% \text{ EOS}) - \% \text{ PMN}] = 5.0\% \text{ a } 7.4\%$$

$$++ [(\% \text{ NEUT } + \% \text{ EOS}) - \% \text{ PMN}] = 7.5\% \text{ a } 10.0\%$$

$$+++ [(\% \text{ NEUT } + \% \text{ EOS}) - \% \text{ PMN}] > 10.0\%$$

Nos analisadores Sysmex XE-2100, a medição IGs (incluindo promielócitos, mielócitos e metamielócitos, mas não bastonetes ou blastos), é realizada no canal diferencial. As membranas de leucócitos maduros são rompidas por um agente de lise, deixando os núcleos “nus”, enquanto as células mieloides imaturas com baixo teor de lipídios na membrana permanecem intactas. A permeabilidade aumentada dos leucócitos permite a entrada de corante de polimetina com alta afinidade para o ácido nucléico. Posteriormente, as células são analisadas por meio da fluorescência dos ácidos nucleicos e *side scatter*. A vantagem desses analisadores é o fornecimento de uma contagem de IGs absoluta e diferencial e não apenas a presença de *flags*.

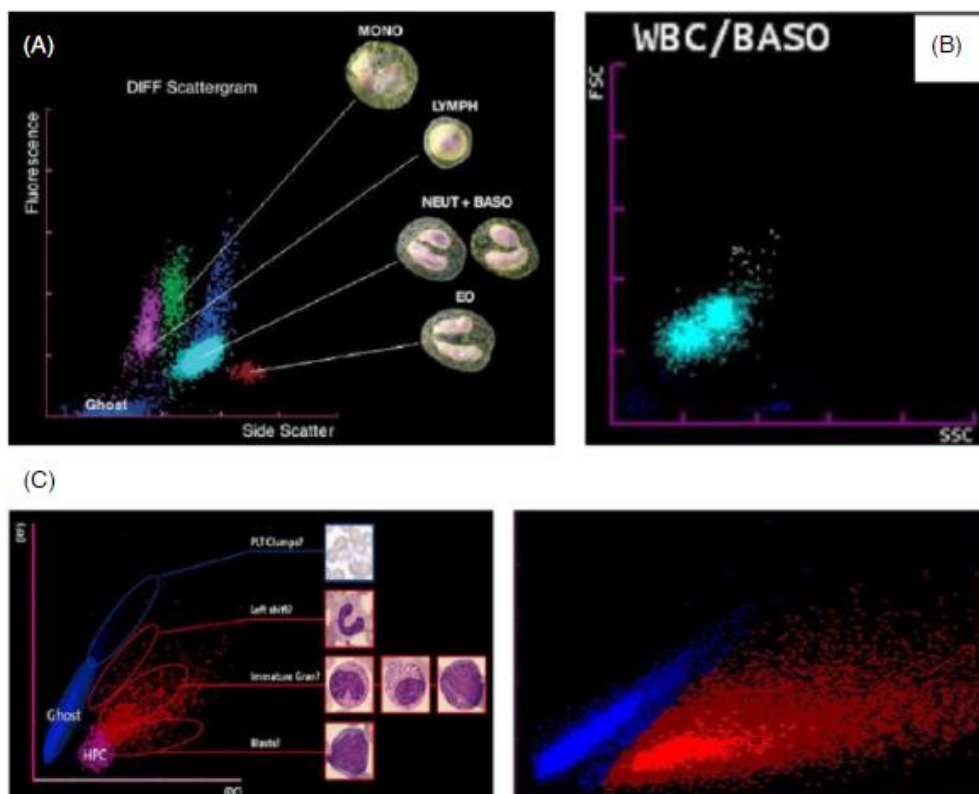
Na série XN-9000 da Sysmex utiliza-se o canal XN-DIFF, com a análise realizada por meio de citometria de fluxo fluorescente e o novo método SAFLAS (*Sysmex Adaptive Flagging Algorithm based on Shape-recognition*). Ele baseia-se na discriminação linear de agrupamentos de células no diagrama de dispersão WDF (*WBC differential fluorescence*) usando a forma e o posicionamento de diferentes populações de células mononucleares (SYSMEX AMERICA INC., 2016) (Fig. 13).

Em 1994, ARDRON; WESTENGARD & DUTCHER demonstraram que precursores de granulócitos menos maduros foram relatados como preditores melhores de infecção do que as contagens de bastonetes. Embora os mecanismos de sua regulação não serem completamente elucidados, estudos continuam a mostrar os IGs como um novo parâmetro preditivo para detectar a inflamação ou infecções bacterianas (HENRIOT et al., 2017; UEDA; KONDO; KELSOE, 2005).

AYRES; SGNAOLIN & MUNHOZ (2019) demonstraram que IG% <2,0% são úteis na exclusão do diagnóstico de sepse com especificidade alta (90,9%). Já INCIR; KANT CALTI & PALAOGLU (2020) evidenciaram que a combinação de IGs, *C-reactive protein* (CRP) e outros indicadores inflamatórios do hemograma pode ajudar

a detectar pacientes que estão na fase aguda de resposta à uma infecção ou inflamação.

Figura 13 - Clusters formados pelas células sanguíneas, utilizando a metodologia SAFLAS.



Fonte: SYSMEX AMERICA INC. (2016, p. 04)

Recentemente, (HUANG et al., 2019) investigaram a relação entre IG% e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) em pacientes com pancreatite aguda (PA). Eles encontraram que a combinação do escore de avaliação de gravidade de doença APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*), e IG% foi considerada o método ideal para prever SDRA entre pacientes com PA, demonstrando a diversidade de usos do parâmetro.

Os pacientes com AF frequentemente apresentam episódios infecciosos devido aos processos de vasculopatia e vaso-oclusão (NUZZO; FONSECA, 2004). Adicionalmente, já é bem documentado na literatura que crianças portadoras da doença possuem um risco aumentado de infecções bacterianas invasivas, particularmente de organismos encapsulados como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo b (MCGANN; HERNANDEZ; WARE, 2017; PEARSON, 1977).

O baço desempenha um papel fundamental no aumento da suscetibilidade a certas infecções bacterianas (CANNAS; MERAZGA; VIROT, 2019). A partir de episódios repetidos de falcização e dano isquêmico, o baço de indivíduos com DF encolhe a um pequeno remanescente e eles tornam-se asplênicos. A formação prejudicada de anticorpos e a decorrente opsonização deficiente devido a um defeito na via alternativa do complemento foi demonstrada por JOHNSTON; NEWMAN & STRUTH (1973). Adicionalmente, as lesões contínuas ao intestino e ossos devido a CVOs repetitivas somadas à i) saturação do sistema macrofágico por produtos de degradação dos eritrócitos da hemólise crônica e ii) disfunção esplênica e hepática subjacente, predispõem a infecções por salmonela (ONWUBALILI, 1983). Crianças com menos de cinco anos de idade apresentam maior risco de meningite e septicemia, enquanto a osteomielite por salmonela é provavelmente comum a todas as faixas etárias (MAAKARON; TAHER, 2021; ONWUBALILI, 1983).

LOBO *et al.* (2014) desenvolveram um estudo com crianças cariocas portadoras de DF nascidas entre 2000 e 2010. Os autores encontraram uma elevada presença de processos infecciosos na amostra estudada, sendo que a causa de 31% das mortes foi sepse. Similarmente, SABARENSE *et al.* (2015) acompanharam 2.576 crianças com DF em Minas Gerais nascidas entre 1998 e 2012 e constataram que 45% das mortes ocorreram devido a infecções.

## 2.7 Adesão ao Tratamento

De acordo com a OMS, a adesão ao tratamento compreende diversos comportamentos relacionados à saúde, que vão além de somente o uso dos medicamentos prescritos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). O conceito descrito por REZENDE (2011) a define como “O comportamento de um paciente diante das recomendações médicas ou de outros profissionais de saúde quanto ao uso de medicamentos, adoção de dietas ou mudanças do estilo de vida”.

O manejo de doenças crônicas geralmente requer um plano de cuidados de longo prazo, que é fundamental para alcançar melhores resultados, qualidade de vida e boa relação custo-benefício (HAMINE *et al.*, 2015; VISWANATHAN *et al.*, 2012). A OMS estima que a não adesão aos tratamentos de longo prazo na população geral é de aproximadamente 50% (HAYNES *et al.*, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION,

2003). No caso de pacientes com AF, a administração diária correta da HU é determinante no tratamento.

No Brasil, estudos com representatividade nacional sobre a prevalência de baixa adesão em portadores de doenças crônicas são escassos. Em geral, as publicações utilizam amostras locais/regionais, subgrupos populacionais ou focam em doenças crônicas específicas. De acordo com um estudo produzido por (TAVARES *et al.* (2016), a prevalência de baixa adesão ao tratamento medicamentoso para doenças crônicas no Brasil foi de 30,8%. A baixa adesão se mostrou maior em indivíduos mais jovens (20-39 anos). Já DIMATTEO (2004), identificou que a adesão ao tratamento parece ser um desafio maior para adolescentes com doenças crônicas em comparação com crianças e adultos (HANGHØJ; BOISEN, 2014).

Apesar dos resultados positivos trazidos pela HU, ela permanece subutilizada pelos pacientes e provedores (BRANDOW; PANEPINTO, 2010). O desenvolvimento de estudos que buscam a criação de intervenções acerca da não adesão ao tratamento com HU estão aumentando (LOISELLE *et al.*, 2016). Contudo, quando comparados aos trabalhos dedicados a outras doenças crônicas, os estudos que teorizam sobre a adesão nas DFs ainda estão sub-representados (HODGES *et al.*, 2020).

As múltiplas causas para a não adesão ao tratamento podem ser divididas em intencionais e não intencionais. O abandono não intencional caracteriza-se quando fatores que estão fora do domínio do paciente o impedem de seguir o tratamento proposto, como a falta de compreensão ou recordação das instruções ou não tomar os medicamentos por esquecimento (CONTE *et al.*, 2015; NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2009). Esses aspectos descritos são multifatoriais, derivando da doença (esquema terapêutico, efeitos adversos dos medicamentos e cronicidade da doença), do paciente (dificuldades financeiras, polifarmácia), do sistema de saúde (dificuldade de acesso ao fármaco, inadequação da relação médico-paciente e orientações confusas), e de nuances sociais e culturais (suporte social e familiar) (GIROTTI *et al.*, 2013; SGNAOLIN; FIGUEIREDO, 2012; TAVARES *et al.*, 2016).

A não-adesão intencional coloca os pacientes como atores principais na tomada de decisões referentes ao seu tratamento, podendo aderir, modificar ou desconsiderar as instruções dadas pelos profissionais de saúde (LEHANE; MCCARTHY, 2007). Os fatores subjacentes às suas decisões variam desde a

experiência de efeitos adversos (HANGHØJ; BOISEN, 2014) até suas percepções da necessidade do tratamento prescrito (LEMAY et al., 2018).

Os conceitos de não adesão “intencional” e “não intencional” referentes especificamente a DFs não são facilmente encontrados na literatura atual. Essa lacuna contribui para um eufemismo a respeito da complexidade da tomada de decisões sobre aderir ou não a um regime de HU (HODGES et al., 2020).

LOISELLE et al. (2016) constataram que as taxas médias de adesão à terapia medicamentosa em crianças com DF são de 55-74%. Segundo o Modelo Pediátrico de Autogestão (*Pediatric Self- Management Model*) os fatores que interferem sobre os comportamentos de adesão e autogestão da terapia medicamentosa em crianças se estabelecem em múltiplos níveis (MODI et al., 2012; SHIH; COHEN, 2020).

Dentre as barreiras enfrentadas pelos pacientes pediátricos, especialmente para as crianças mais jovens, encontra-se a dificuldade em engolir comprimidos. A falta de conhecimento dos cuidadores também é frequentemente citada como grande influência na baixa adesão, podendo se manifestar de diversas formas, como interrupção prematura da administração do fármaco porque os sintomas da doença não são aparentes e a dosagem incorreta (LOISELLE et al., 2016; OYEKU et al., 2013; WALSH et al., 2014).

Adicionalmente, quanto mais a idade se aproxima da adolescência há uma piora na adesão, fator comumente encontrado em outras condições crônicas (HANGHØJ; BOISEN, 2014; LOISELLE et al., 2016). Por mais que o esquecimento seja considerado o fator mais impactante para a não adesão nesses indivíduos (BADAWY; THOMPSON; LIEM, 2016), conflitos familiares e déficits de conhecimento ao fazer a transição para uma autogestão mais independente e relações sociais também interferem no tratamento (HANGHØJ; BOISEN, 2014; MODI et al., 2012). BADAWY et al. (2017) identificaram que pacientes com baixa adesão relataram taxas mais elevadas de isolamento social. Similarmente, no estudo de THORNBURG et al. (2010), as famílias de crianças/adolescentes com AF apontaram o apoio social como um facilitador da administração regular de HU (SHIH; COHEN, 2020), já que uma das maiores barreiras ao tratamento é o sentimento de diferença e o desejo de normalidade (HOEGY et al., 2020).

A literatura também constata que interações negativas com profissionais da saúde possuem impacto na adesão ao tratamento. A não obtenção do apoio adequado de profissionais de saúde parece estar relacionado especialmente à má

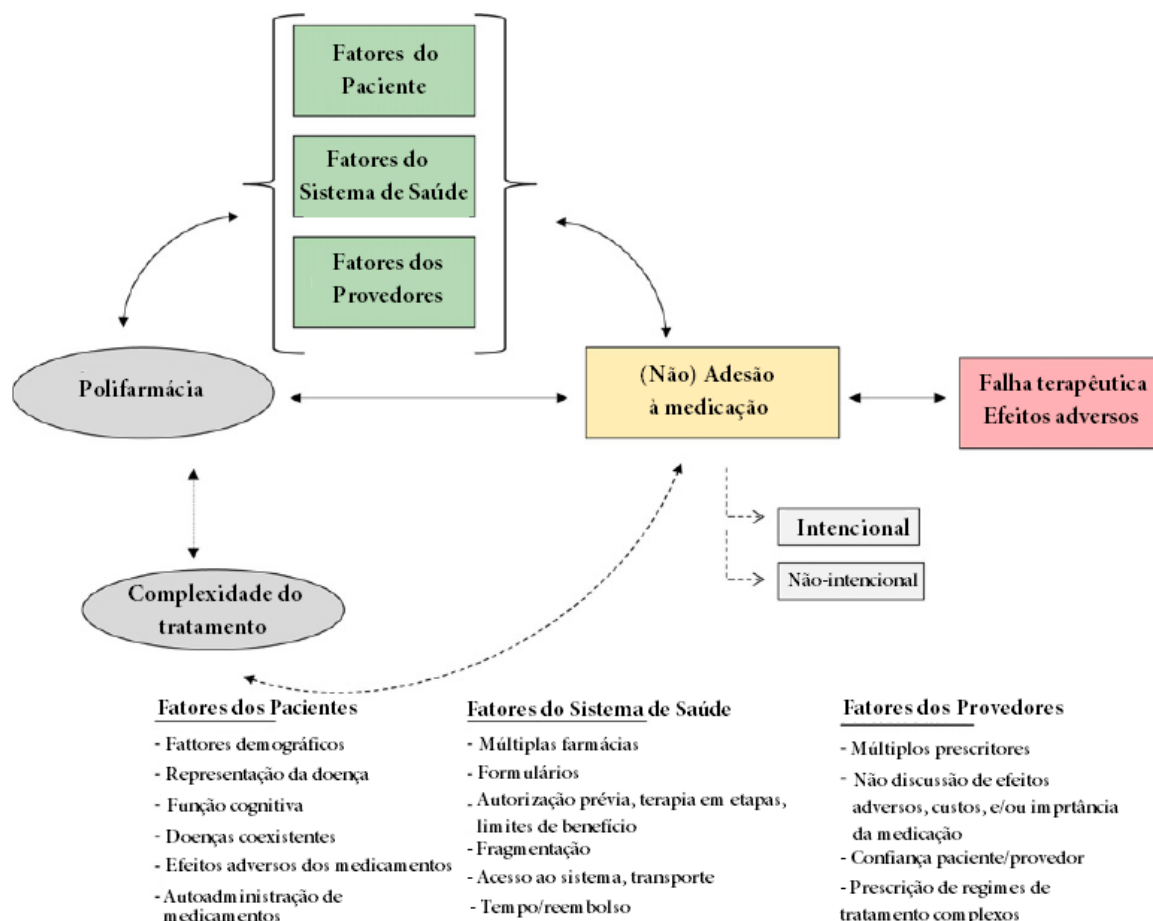
comunicação com os médicos, discriminação racial, étnica e socioeconômica (HANGHØJ; BOISEN, 2014; HAYWOOD et al., 2014). Dentre os 273 pacientes com DF investigados por HAYWOOD et al. (2014), aqueles que relataram experiências de discriminação no sistema de saúde foram 53% mais propensos a também relatar não adesão ao tratamento.

Assim como em crianças e adolescentes, o envolvimento cada vez maior de médicos na atenção primária melhora o bem-estar dos adultos com DF (ADAMS-GRAVES; BRONTE-JORDAN, 2016). No estudo desenvolvido por HODGES et al. (2020), o abandono intencional foi menos frequente do que o não intencional entre os participantes (70% e 30%, respectivamente), sugerindo que a maioria das barreiras à adesão não são resultantes de uma tomada de decisão consciente por parte do paciente.

As razões mais comuns ao abandono intencional incluem a aversão a tomar qualquer medicamento, incertezas quanto à eficácia da HU, percepção de que a HU causa mais resultados negativos relacionados à DF e repulsa aos efeitos adversos do medicamento (BRANDOW; PANEPINTO, 2010; HODGES et al., 2020). Já alguns motivos por trás do abandono não intencional do tratamento parecem ser comuns a todas as faixas etárias. A expressiva maioria dos relatos recaem no esquecimento de tomar o medicamento (HODGES et al., 2020). A dificuldade de acesso ao sistema de saúde decorrente de moradias rurais ou distantes dos centros de atendimento também já foram descritas na literatura (TELFAR et al., 2003), assim como o difícil manejo da doença em famílias de baixa renda (HILL, 1994; MADANI et al., 2018).

Adicionalmente, alguns pacientes apontam a complexidade de um regime de tratamento com múltiplos fármacos como um fator que contribui para o esquecimento de tomar HU (HODGES et al., 2020; MARCUM; GELLAD, 2012). Embora não haja um consenso geral, a OMS adota que a polifarmácia é definida como o uso simultâneo de quatro fármacos (ISMP, 2018). Em 2012, COLEMAN *et al.* realizaram uma meta-regressão multivariada e constataram que regimes de dosagem de duas, três e quatro vezes ao dia tiveram taxas de adesão médias significativamente menores em comparação com os regimes de única dose. O modelo proposto por MARCUM & GELLAD (2012) explora as vias potenciais da influência da polifarmácia para a não adesão a fármacos, onde ela é potencialmente mediada por diversos fatores que envolvem o paciente, o sistema de saúde/provedor do medicamento (Fig. 14).

Figura 14 - Modelo conceitual do efeito de diferentes fatores na adesão a fármacos



Fonte: Adaptado de MARCUM & GELLAD (2012, p. 05). Traduzido pelo autor.

A verificação da adesão em tratamentos crônicos pode ser realizada de maneira direta, a partir da avaliação de parâmetros laboratoriais e de metabólitos de fármacos, e de maneira indireta, como por exemplo, a partir de métodos de contagem de comprimidos ou de questionários autorrelatados (Teste de Morisky-Green – TMG, *Brief Medication Questionnaire* – BMQ, *Simplified Medication Adherence Questionnaire* - SMAQ), registros de retirada de medicamentos em farmácias, dentre outros (CONTE et al., 2015; FAUSTINO; SEID, 2010; GIROTTO et al., 2013).

Dos parâmetros convencionais do hemograma, o VCM é reconhecido por muitos autores como um excelente parâmetro de avaliação direta da adesão à HU (BADAWY et al., 2017; BARTOLUCCI et al., 2016; KATO et al., 2018; SILVA-PINTO

et al., 2013). Na análise indireta, pode correlacionar-se o comportamento de adesão do paciente com informações fornecidas por ele próprio, ou estimá-la, como na contagem de comprimidos e registro de dispensação. Na contagem manual de comprimidos se verifica a quantidade de comprimidos utilizada pelo paciente em um determinado intervalo de tempo e a quantidade que deveria ter sido utilizada neste intervalo. Já no controle de dispensação, pode-se obter a *Medication possession ratio* (MPR) e a *Proportion of days covered* (PDC) que indicam a proporção do período em que a quantidade de medicamento disponibilizada abarca e o número de dias que o paciente está coberto pelo fármaco em relação ao número total de dias no período, respectivamente.

Cada método indireto possui vantagens e limitações próprias. Questionários auto-relatados possuem menor custo e são fáceis de usar, contudo podem superestimar a adesão do paciente ser influenciado por *recall bias* (quando os participantes não se lembram de eventos ou experiências anteriores com precisão ou omitem detalhes). A contagem de comprimidos e o registro de dispensação são de simples utilização, porém não garantem a ingestão do medicamento (ANGHEL; FARCAS; OPREAN, 2019).

Embora não haja consenso na literatura, para ser considerado aderente ao tratamento, o paciente precisa ter utilizado no mínimo 80% da quantidade prescrita para o intervalo de tempo (LEE et al., 1996). A adesão moderada foi definida como a administração dos medicamentos prescritos entre 60% e 80% e a baixa adesão quando esta for menor do que 60% (WALSH et al., 2014). Todavia, deve-se realçar que em muitos casos esse número é apenas arbitrário. Adesão inferior a 80% pode ser suficiente para o sucesso de certos tratamentos, mas às vezes, uma maior taxa de adesão é necessária para garantir resultados ideais. Para o tratamento de HIV, por exemplo, considera-se tradicionalmente 95% como o nível mínimo de adesão necessário para o paciente ser considerado aderente ao tratamento (PATERSON et al., 2002).

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a HU é dispensada após as consultas regulares com o hematologista. No momento da dispensação é contabilizado o intervalo de tempo até a próxima consulta, para que o paciente receba o número adequado de medicamentos para todo o período. Quando o paciente retorna para nova dispensação é questionada a quantidade de medicamento que ele ainda

dispõe e essa informação ratifica a adequada identificação do perfil de adesão do paciente junto aos registros de dispensação realizados na Farmácia.

A HU é integrada ao grupo de medicamentos que compõem a Política Nacional de Assistência Farmacêutica (PNAF). Portanto, o acesso a ela se dá por meio do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (Ceaf) de acordo com os critérios definidos no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme publicado pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O acesso a medicamentos é um dos grandes desafios das políticas de saúde, especialmente para doenças crônicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos (PNAUM) foi um marco no Brasil como a primeira investigação de âmbito nacional com foco no acesso e utilização de medicamentos, caracterizando a organização dos serviços de assistência farmacêutica na Atenção Básica do SUS (ÁLVARES et al., 2017). Os dados coletados serviram de base para inúmeros estudos subsequentes, onde baixa adesão em doenças crônicas foi associada a perfis de pacientes que devido à região demográfica ou a tratamentos não inteiramente gratuitos, possuíam dificuldades de acesso ao tratamento (TAVARES et al., 2016). A disponibilidade do medicamento de forma acessível ou gratuita ao usuário impacta positivamente para o comprometimento do paciente com o tratamento. Portanto, irregularidades em sua distribuição contribuem para o abandono não intencional (FRITZEN; MOTTER; PANIZ, 2017; TAVARES et al., 2016).

Usualmente, pacientes com DF que tem menor adesão necessitam de atendimentos em emergências com maior frequência e internações mais longas (BADAWY et al., 2018). Em decorrência das diversas complicações associadas ao desenvolvimento da patologia e do monitoramento da adesão destes pacientes, exprime-se a necessidade do acompanhamento regular dos mesmos com o apoio de equipes multidisciplinares. O uso correto da HU conduz à estabilidade do paciente, diminuindo a frequência de crises agudas e internações hospitalares, melhorando a qualidade de vida desses indivíduos e atenuando o custo do tratamento.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOZENADAH, H. et al. **Consumer Chemistry: How Organic Chemistry Impacts Our Lives**. CC BY-NC-SA: [s.n.].

ADAMS-GRAVES, P.; BRONTE-JORDAN, L. Recent treatment guidelines for managing adult patients with sickle cell disease: challenges in access to care, social issues, and adherence. **Expert Review of Hematology**, v. 9, n. 6, p. 541–552, 2016.

ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.

ADVIA®. **ADVIA 2120/2120i Operator's Guide**, 2010.

AHMED, M. H.; GHATGE, M. S.; SAFO, M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. In: HOEGER, U.; HARRIS, J. R. (Eds.). . **Physiology & behavior**. Subcellular Biochemistry. Cham: Springer International Publishing, 2020. v. 94p. 345–382.

AHMED, R. A. .; FAYEK, M. H. .; SALEM, D. A. . Using Reticulocyte Hemoglobin Equivalent (RET- He) in Diagnosis of Iron Deficiency Anemia. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 113, n. 1, 2020.

AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19–27, 2011.

ALAPAN, Y. et al. Emerging Point-of- Care Technologies for Sickle Cell Disease Screening and Monitoring. **Expert Rev Med Devices.**, v. 13, n. 12, p. 1073–1093, 2016.

ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, n. March, p. 78–86, 2018.

ÁLVARES, J. et al. National survey on access, use and promotion of rational use of medicines: Methods. **Revista de Saude Publica**, v. 51, p. 1s-9s, 2017.

ALVINO, G. M. et al. Replication in Hydroxyurea: It's a Matter of Time. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 18, p. 6396–6406, 2007.

ANGHEL, L. A.; FARCAS, A. M.; OPREAN, R. N. An overview of the common methods used to measure treatment adherence. **Medicine and Pharmacy Reports**, v. 92, n. 2, p. 117–122, 2019.

ANVISA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. 1° ed. Brasília - DF: ANVISA, 2001.

ARDRON, M. J.; WESTENGARD, J. C.; DUTCHER, T. F. Band neutrophil counts are

- unnecessary for the diagnosis of infection in patients with normal total leukocyte counts. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 102, n. 5, p. 646–649, 1994.
- ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; MARQUI, A. B. T. DE. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 2016.
- ARIEY, F.; GAY, F.; MÉNARD, R. **Malaria Control and Elimination**. New York, NY: Springer New York, 2013. v. 2013
- ATAGA, K. I. et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 5, p. 429–439, 2017.
- ATAGA, K. I.; ORRINGER, E. P. Bone marrow necrosis in sickle cell disease: A description of three cases and a review of the literature. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 320, n. 5, p. 342–347, 2000.
- AYRES, L. S.; SGNAOLIN, V.; MUNHOZ, T. P. Immature granulocytes index as early marker of sepsis. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 41, n. 3, p. 392–396, 2019.
- BADAWY, S. M. et al. Health-related quality of life and adherence to hydroxyurea in adolescents and young adults with sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 64, n. 6, p. e26369, jun. 2017.
- BADAWY, S. M.; THOMPSON, A. A.; LIEM, R. I. Technology Access and Smartphone App Preferences for Medication Adherence in Adolescents and Young Adults With Sickle Cell Disease. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63, n. 5, p. 848–852, maio 2016.
- BALLANTINE, J. D.; KWON, S.; LIEM, R. I. Nucleated Red Blood Cells in Children With Sickle Cell. **Journal of Pediatric Hematology Oncology**, v. 41, n. 8, p. 487–492, 2019.
- BALLAS, S. K.; DOVER, G. J.; CHARACHE, S. Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. **American Journal of Hematology**, v. 32, n. 2, p. 104–111, 1989.
- BALLAS, S. K.; GUPTA, K.; ADAMS-GRAVES, P. Sickle cell pain: A critical reappraisal. **Blood**, v. 120, n. 18, p. 3647–3656, 2012.
- BARBOSA, S. M. DE M. et al. Air pollution and children's health: sickle cell disease. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 265–275, 2015.
- BARTOLUCCI, P. et al. Six months of hydroxyurea reduces albuminuria in patients with sickle cell disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 6, p. 1847–1853, 2016.

- BELFER, I. et al. A GCH1 haplotype confers sex-specific susceptibility to pain crises and altered endothelial function in adults with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 2, p. 187–193, 2014.
- BRAGA, J. A. . Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes General measures in the treatment of sickle cell disease. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 233–238, 2007.
- BRAGA, J. A. P. et al. Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2016. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 2, p. 147–157, 2016.
- BRANDOW, A. M. et al. Patients with sickle cell disease have increased sensitivity to cold and heat. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 1, p. 37–43, 2013.
- BRANDOW, A. M.; PANEPINTO, J. A. Hydroxyurea use in sickle cell disease: The battle with low prescription rates, poor patient compliance and fears of toxicities. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n. 3, p. 255–260, 2010.
- BRASIL. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. 1. ed. Brasília - DF: ANVISA, 2001.
- BRASIL, M. D. S. **Doença Falciforme: o que se deve saber sobre herança genética**. [s.l: s.n.].
- BRIDGES, K. R. et al. A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. **Blood**, v. 88, n. 12, p. 4701–4710, 1996.
- BRIGGS, C. et al. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. p. 1024–1030, 2012.
- BRIGGS, C. J. et al. Improved flagging rates on the sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 136, n. 2, p. 309–316, 2011.
- BRUGNARA, C. Sickle cell dehydration: Pathophysiology and therapeutic applications. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 187–204, 28 mar. 2018.
- BUORO, S. et al. Evaluation of nucleated red blood cell count by Sysmex XE-2100 in patients with thalassaemia or sickle cell anaemia and in neonates. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 588–594, 2015.
- BUTTARELLO, M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? **International Journal of**

- Laboratory Hematology**, v. 38, p. 123–132, 2016.
- BUTTARELLO, M. et al. Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 42, n. 4, p. 363–370, 2020.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.
- CANNAS, G.; MERAZGA, S.; VIROT, E. Sickle Cell Disease and Infections in High- and Low-Income Countries. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. e2019042, 2019.
- CARDOSO, C. DOS S. et al. Triagem neonatal de hemoglobinopatias no estado do Rio Grande do Sul no período de 2004 a 2014. **Boletim Científico de Pediatria**, v. 06, n. 3, p. 77–84, 2017.
- CELKAN, T. T. What does a hemogram say to us? **Turk Pediatri Arsivi**, v. 55, n. 2, p. 103–116, 2020.
- CISNEROS, G. S.; THEIN, S. L. Recent Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. May, p. 1–15, 2020.
- COBER, M. P.; PHELPS, S. J.; OHIO, N. Brief Review Article Penicillin Prophylaxis in Children with Sickle Cell Disease. **J Pediatr Pharmacol Ther**, v. 15, n. 3, p. 152–159, 2010.
- COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231–239, 2003.
- COLEMAN, C. I. et al. Dosing frequency and medication adherence in chronic disease. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 18, n. 7, p. 527–539, 2012.
- CONTE, D. B. et al. Adesão Ao Tratamento : Onde Está O Problema ? Percepções a Partir Da Vivência Em Equipe Multidisciplinar Hospitalar Adherence To Treatment : Where Is the Problem ? Insights From the Experience in Multidisciplinary Hospital. **Caderno Pedagógico Univates**, v. 12, n. 3, p. 85–100, 2015.
- CORBERAND, J. X. Reticulocyte analysis using flow cytometry. **Hematology and Cell Therapy**, v. 38, n. 6, p. 487–494, 1996.
- CORNBLEET, P. J. Clinical utility of the band count. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 22, n. 1, p. 101–136, 2002.
- COSTA, F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K. Anemia falciforme. In: **Tratado de Hematologia**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 205–223.

- COUQUE, N. et al. Improvement of medical care in a cohort of newborns with sickle-cell disease in North Paris: impact of national guidelines. **British Journal of Haematology**, v. 173, n. 6, p. 927–937, 2016.
- COVAS, D. T. et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, n. 3, p. 273–280, 2004.
- CROSBY, W. Seminars on the Hemolytic of Hemoglobin Anemias and Bile The Metabolism Pigment in Hemolytic. **The American journal of medicine**, 1955.
- DAHMANI, F. et al. Etude de l'hémogramme dans la drépanocytose homozygote: À propos de 87 patients. **Pan African Medical Journal**, v. 25, p. 1–10, 2016.
- DANGANA, A. et al. Fetal hemoglobin gene expression in patients with sickle cell disease in North Central Nigeria. **Int J Health Allied Sci**, v. 7, p. 98–103, 2018.
- DANISE, P. et al. Nucleated red blood cells and soluble transferrin receptor in thalassemia syndromes: Relationship with global and ineffective erythropoiesis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 12, p. 1539–1542, 2009.
- DANISE, P. et al. Evaluation of nucleated red blood cells in the peripheral blood of hematological diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 50, n. 2, p. 357–360, 1 jan. 2012.
- DAVIES, S. C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Reviews**, v. 17, n. 2, p. 99–109, 2003.
- DICKERHOFF, R.; VON RUECKER, A. Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. **Clin Lab Haematol**, v. 17, n. 2, p. 163–72, 1995.
- DIMATTEO, M. R. Variations in patients' adherence to medical recommendations: A quantitative review of 50 years of research. **Medical Care**, v. 42, n. 3, p. 200–209, 2004.
- DIQUATTRO, M. et al. Relationships between platelet counts , platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP : evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. **Int J Lab Hematol**, v. 31, n. 2, p. 199–206, 2009.
- DRAWZ, P. et al. Kidney disease among patients with sickle cell disease, hemoglobin SS and SC. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 207–215, 2016.
- DRESLER, W. F. C.; STEIN, R. Ueber den Hydroxylharnstoff; **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 150, n. 2, p. 242–252, 1869.

- DULÍN IÑÍGUEZA, E. et al. Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la comunidad autónoma de Madrid. Estudio piloto. **Anales de Pediatría**, v. 58, n. 2, p. 146–155, fev. 2003.
- DUSSE, L. M. S. A.; FREITAS, L. G. Clinical applicability of reticulated platelets. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 143–147, 2014.
- ELMARIAH, H. et al. Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 5, p. 530–535, 2014.
- FAILACE, R.; FERNANDES, F. **Hemograma: Manual de Interpretação**. 6° ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- FAUSTINO, Q. DE M.; SEID, E. M. F. Cognitive-Behavioral Intervention and Adherence to the Treatment by Persons with HIV/AIDS. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 26, n. 1, p. 121–130, 2010.
- FEUCHTBAUM, L. et al. Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity. **Genetics in Medicine**, v. 14, n. 11, p. 937–945, 2012.
- FRITZEN, J. S.; MOTTER, F. R.; PANIZ, V. M. V. Regular access and adherence to medications of the specialized component of pharmaceutical services. **Revista de saude publica**, v. 51, p. 109, 2017.
- GARDNER, K. et al. Survival in adults with sickle cell disease in a high-income setting. **Blood**, v. 128, n. 10, p. 1436–1438, 2016.
- GASTON, M. H. et al. Prophylaxis with Oral Penicillin in Children with Sickle Cell Anemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, p. 1593–1599, 1986.
- GELL, D. A. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, n. October 2017, p. 13–42, 2018.
- GIROTTO, E. et al. Adherence to pharmacological and non pharmacological treatment for arterial hypertension and associated factors in primary care. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 18, n. 6, p. 1763–1772, 2013.
- GLADWIN, M. T. et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 116, n. 2, p. 436–444, 2002.
- GRAHAM, G. S. A case of sickle cell anemia with necropsy. **Archives of Internal Medicine**, v. 34, n. 6, p. 778–800, 1924.
- GROSSE, S. D. et al. Sickle cell disease in Africa: A neglected cause of early childhood mortality. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 41, n. 6 SUPPL.4, p. S398–S405, 2011.
- GULATI, G. et al. An evaluation of the performance of Sysmex XE-2100 in enumerating

nucleated red cells in peripheral blood. **Arch Pathol Lab Med**, v. 131, n. 7, p. 1077–83, 2007.

HAMIDEH, D.; ALVAREZ, O. Sickle cell disease related mortality in the United States (1999-2009). **Pediatric Blood & Cancer**, v. 60, n. 9, p. 1482–1486, set. 2013.

HAMINE, S. et al. Impact of mHealth chronic disease management on treatment adherence and patient outcomes: A systematic review. **Journal of Medical Internet Research**, v. 17, n. 2, p. 1–15, 2015.

HANGHØJ, S.; BOISEN, K. A. Self-reported barriers to medication adherence among chronically ill adolescents: A systematic review. **Journal of Adolescent Health**, v. 54, n. 2, p. 121–138, 2014.

HARRINGTON, D. J.; ADACHI, K.; ROYER, W. E. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 3, p. 398–407, set. 1997.

HARRISON, P. et al. An Interlaboratory Study of a Candidate Reference Method for Platelet Counting. p. 448–459, 2001.

HAYNES, R. et al. Interventions for helping patients to follow prescriptions for medications. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2002.

HAYWOOD, C. et al. Perceived Discrimination, Patient Trust, and Adherence to Medical Recommendations Among Persons with Sickle Cell Disease. **Journal of General Internal Medicine**, v. 29, n. 12, p. 1657–1662, 2014.

HENRIOT, I. et al. New parameters on the hematology analyzer XN-10 (Sysmex™) allow to distinguish childhood bacterial and viral infections. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 39, n. 1, p. 14–20, 2017.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 3, p. 179–184, 1910.

HIGGS, D. R. et al. The Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle-Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 306, n. 24, p. 1441–1446, 17 jun. 1982.

HILL, S. A. **Managing Sickle Cell Disease: In Low-Income Families**. [s.l.] Temple University Press, 1994.

HODGES, J. R. et al. Intentional and unintentional nonadherence to hydroxyurea among people with sickle cell disease: A qualitative study. **Blood Advances**, v. 4, n. 18, p. 4463–4473, 2020.

- HOEGY, D. et al. Sickle cell disease perceptions of caregivers, adolescent, and adult patients: Barriers and facilitators to medical care adherence. **Journal of Advanced Nursing**, v. 76, n. 9, p. 2391–2400, 2020.
- HOFFMANN, J. J. M. L.; VAN DEN BROEK, N. M. A.; CURVERS, J. Reference Intervals of Reticulated Platelets and Other Platelet Parameters and Their Associations. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, n. 11, p. 1635–1640, 1 nov. 2013.
- HOFFMANN, R. J. J. M. L. Reticulated platelets : analytical aspects and clinical utility. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1107–1117, 2014.
- HONG, K. H. et al. Platelet count evaluation using three automated haematology analysers compared with the immunoplatelet reference method , and estimation of possible inadequate platelet transfusion. **Int J Lab Hematol**, v. 31, n. 3, p. 298–306, 2009.
- HOPPE, C. et al. Simvastatin reduces vaso-occlusive pain in sickle cell anaemia: a pilot efficacy trial. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 4, p. 620–629, 2017.
- HUANG, Y. et al. Immature granulocytes: A novel biomarker of acute respiratory distress syndrome in patients with acute pancreatitis. **Journal of Critical Care**, v. 50, p. 303–308, 2019.
- HWANG, D. H. et al. Automated nucleated RBC measurement using the Sysmex XE-5000 hematology analyzer frequency and clinical significance of the nucleated RBCs. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 3, p. 379–384, 2016.
- IBRAHIM, H. et al. Detection and quantification of circulating immature platelets: agreement between flow cytometric and automated detection. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 42, n. 1, p. 77–83, 2016.
- IMPERIALI, C. E. et al. Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN haematology analyser in adult population. **Biochemia medica**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 2018.
- ISMP. Desafio global de segurança do paciente medicação sem danos. **Instituto para práticas seguras no uso de medicamentos**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2018.
- JOÃO, A. R.; PINTO, S.; COSTA, E. Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 3, p. 188–192, 2008.
- JOERGENSEN, M. K.; BATHUM, L. Reference intervals for mean platelet volume and

immature platelet fraction determined on a sysmex XE5000 hematology analyzer. v. 5513, 2016.

JOHNSTON, R. B.; NEWMAN, S. L.; STRUTH, A. G. An Abnormality of the Alternate Pathway of Complement Activation in Sickle-Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 288, n. 16, p. 803–808, 19 abr. 1973.

JONES, S. et al. Windy weather and low humidity are associated with an increased number of hospital admissions for acute pain and sickle cell disease in an urban environment with a maritime temperate climate. **British Journal of Haematology**, v. 131, n. 4, p. 530–533, 2005.

JUNG, H. et al. Immature platelet fraction: Establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 30, n. 5, p. 451–459, 2010.

KAPOOR, S.; LITTLE, J. A.; PECKER, L. H. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 12, p. 1810–1824, 2018.

KARAKUKCU, M. et al. The Importance of Nucleated Red Blood Cells in Patients with Beta Thalassemia Major and Comparison of Two Automated Systems with Manual Microscopy and Flow Cytometry. **Clin Lab**, v. 61, n. 9, p. 1289–1295, 2015.

KARON, B. S. et al. Evaluation of lactate, white blood cell count, neutrophil count, procalcitonin and immature granulocyte count as biomarkers for sepsis in emergency department patients. **Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 16–17, p. 956–958, 2017.

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

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

KO, Y. J. et al. Establishment of reference interval for immature platelet fraction. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 35, n. 5, p. 528–533, 2013.

KO, Y. J. et al. Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN hematology analyzer: A comparison study with Sysmex XE-2100. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1091–1097, 2015.

KOSMACHEVSKAYA, O. V.; TOPUNOV, A. F. **Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin Biochemistry (Moscow)**, 8 dez. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0006297918120155>>

KUYPERS, F. A. Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes.

- Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 155–179, 2014.
- LANDBURG, P. P. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 44, n. 4, p. 229–232, 2010.
- LANZKRON, S.; PATRICK CARROLL, C.; HAYWOOD, C. Mortality rates and age at death from sickle cell disease: U.S., 1979-2005. **Public Health Reports**, v. 128, n. 2, p. 110–116, 2013.
- LÊ, P. Q. et al. Survival among children and adults with sickle cell disease in Belgium: Benefit from hydroxyurea treatment. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 11, p. 1956–1961, nov. 2015.
- LEE, J. Y. et al. Assessing medication adherence by pill count and electronic monitoring in the African American study of kidney disease and hypertension (AASK) pilot study. **American Journal of Hypertension**, v. 9, n. 8 I, p. 719–725, 1996.
- LEHANE, E.; MCCARTHY, G. Intentional and unintentional medication non-adherence: A comprehensive framework for clinical research and practice? A discussion paper. **International Journal of Nursing Studies**, v. 44, n. 8, p. 1468–1477, 2007.
- LEMAY, J. et al. Medication adherence in chronic illness: Do beliefs about medications play a role? **Patient Preference and Adherence**, v. 12, p. 1687–1698, 2018.
- LERVOLINO, L. G. et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2011.
- LETTRE, G.; BAUER, D. E. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: From genetic epidemiology to new therapeutic strategies. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2554–2564, 2016.
- LEVY, S.; SCHAPKAITZ, E. The clinical utility of new reticulocyte and erythrocyte parameters on the Sysmex XN 9000 for iron deficiency in pregnant patients. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 40, n. 6, p. 683–690, 2018.
- LI, J. et al. Immature platelet fraction related parameters in the differential diagnosis of thrombocytopenia. **Platelets**, v. 31, n. 6, p. 771–776, 2020.
- LOBO, C. L. DE C. et al. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 1, p. 34–39, jan. 2014.
- LÖFVING, A. et al. Reference intervals for reticulocyte hemoglobin content in healthy infants. **Pediatric Research**, n. April, p. 1–5, 2018.

- LOISELLE, K. et al. Systematic and Meta-Analytic Review: Medication Adherence among Pediatric Patients with Sickle Cell Disease. **Journal of Pediatric Psychology**, v. 41, n. 4, p. 406–418, 2016.
- LONDON, I. M. et al. Heme Synthesis and Red Blood Cell Dynamics in Normal Humans and in Subjects with Polycythemia vera, Sickle Cell Anemia, and Pernicious anemia. **Journal Biological Chemistry**, v. 179, n. 1, p. 463–483, 1949.
- LUNYERA, J. et al. Attitudes of primary care physicians toward sickle cell disease care, guidelines, and comanaging hydroxyurea with a specialist. **Journal of Primary Care and Community Health**, v. 8, n. 1, p. 37–40, 2017.
- LUZZATTO, L.; MAKANI, J. Hydroxyurea — An Essential Medicine for Sickle Cell Disease in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 2, p. 187–189, 2019.
- MAAKARON, J. E.; TAHER, A. T. **Sickle Cell Anemia Clinical Presentation**.
- MADANI, B. M. et al. Quality of life among caregivers of sickle cell disease patients: a cross sectional study. **Health and quality of life outcomes**, v. 16, n. 1, p. 176, 2018.
- MAHONY, B. S.; GITHENS, J. H. Sickling Crises and Altitude. **Clinical Pediatrics**, v. 18, n. 7, p. 431–435, 1979.
- MAKONI, M. Newborn screening for sickle cell disease in Africa. **The Lancet. Haematology**, v. 8, n. 7, p. e476, 2021.
- MARAHATTA, A.; WARE, R. E. Hydroxyurea: Analytical techniques and quantitative analysis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 67, p. 135–142, 2017.
- MARCUM, Z. A.; GELLAD, W. F. Medication Adherence to Multidrug Regimens. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 28, n. 2, p. 287–300, 2012.
- MAST, A. E.; BLINDER, M. A.; DIETZEN, D. J. Reticulocyte hemoglobin content. **American Journal of Hematology**, v. 83, n. 4, p. 307–310, 2008.
- MATIC, G. B. et al. Whole blood analysis of reticulated platelets: Improvements of detection and assay stability. **Communications in Clinical Cytometry**, v. 34, n. 5, p. 229–234, 1998.
- MAY, J. E. et al. Three neglected numbers in the CBC: The RDW, MPV, and NRBC count. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 86, n. 3, p. 167–172, mar. 2019.
- MCAULEY, C. F. et al. High mortality from Plasmodium falciparum malaria in children living with sickle cell anemia on the coast of Kenya. **Blood**, v. 116, n. 10, p. 1663–1668, 2010.
- MCCABE, D. J. H. et al. Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. **Br J Haematol**, v. 126, n. 6, p.

861–869, 2004.

MCCURDY, P. 32-DFP and 51-Cr for measurement of red cell life span in abnormal hemoglobin syndromes. **Blood**, v. 33, n. 2, p. 214–224, 1969.

MCCURDY, P. R.; SHERMAN, A. S. Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia. A Study with Both DF32P and 51CR. **The American Journal of Medicine**, v. 64, n. 2, p. 253–258, 1978.

MCGANN, P. T. et al. Hydroxyurea Therapy for Children With Sickle Cell Anemia in Sub-Saharan Africa: Rationale and Design of the REACH Trial. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63, n. 1, p. 98–104, 14 jan. 2016.

MCGANN, P. T.; HERNANDEZ, A. G.; WARE, R. E. Sickle cell anemia in sub-Saharan Africa: Advancing the clinical paradigm through partnerships and research. **Blood**, v. 129, n. 2, p. 155–161, 2017.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2 nov. 2015.

MEINTKER, L. et al. Measurement of immature platelets with Abbott CD-Sapphire and Sysmex XE-5000 in haematology and oncology patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 11, p. 2125–2131, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E I. E. EM S. D. DE A. F. E I. E. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : Rename 2020**. 1ª ed. Brasília - DF: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme**. [s.l.: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **NOTA INFORMATIVA No 268/2020**. Disponível em: <<https://falabr.cgu.gov.br/>>. Acesso em: 18 fev. 2021.

MINNITI, C. P. Glutamine and the Dawn of Combination Therapy for Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 3, p. 292–294, 19 jul. 2018.

MITTAL, H. et al. The effects of air quality on haematological and clinical parameters in children with sickle cell anaemia. **Annals of Hematology**, v. 88, n. 6, p. 529–533, 2009.

MOAT, S. J. et al. Newborn screening for sickle cell disorders using tandem mass spectrometry: three years' experience of using a protocol to detect only the disease states. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 54, n. 5, p. 601–611, 2017.

MODI, A. C. et al. Pediatric self-management: A framework for research, practice, and policy. **Pediatrics**, v. 129, n. 2, 2012.

- MORKIS, I. V. C. et al. Assessment of immature platelet fraction and immature reticulocyte fraction as predictors of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, n. 2, p. 259–264, 2015.
- NAGEL, R. L. et al. Hematologically and Genetically Distinct Forms of Sickle Cell Anemia in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 14, p. 880–884, 4 abr. 1985.
- NANDAKUMAR, S. K.; ULIRSCH, J. C.; SANKARAN, V. G. Advances in understanding erythropoiesis: Evolving perspectives. **British Journal of Haematology**, v. 173, n. 2, p. 206–218, 2016.
- NARCI, H. et al. Nucleated red blood cells as predictor of all-cause mortality in emergency department. **American Journal of Emergency Medicine**, 2020.
- NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE. Medicines adherence: Involving patients in decisions about prescribed medicines and supporting adherence. **NICE Guidelines**, n. January, p. 1–31, 2009.
- NAVALKELE, P. et al. Invasive Pneumococcal Disease in Patients With Sickle Cell Disease. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 39, n. 5, p. 341–344, jul. 2017.
- NEVITT, S. J.; JONES, A. P.; HOWARD, J. **Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease** **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 20 abr. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD002202.pub2>>
- NEWBORN SCREENING FOR SICKLE CELL DISEASE AND OTHER HEMOGLOBINOPATHIES. Newborn Screening for Sickle Cell Disease and Other Hemoglobinopathies. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 258, n. 9, p. 1205, 4 set. 1987.
- NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Sickle hemoglobin polymerization in solution and in cells. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 14, n. 93, p. 239–263, 1985.
- NORONHA, J. F. A. et al. Evaluation of reticulated platelets in patients with sickle cell diseases. **Thrombosis Research**, v. 121, n. 2, p. 259–267, 2007.
- NOVELLI, E. M.; GLADWIN, M. T. Crises in sickle cell disease. **Chest**, v. 149, n. 4, p. 1082–1093, 2016.
- NOZAKI, A. et al. Hydroxyurea suppresses HCV replication in humans: A Phase I trial of oral hydroxyurea in chronic hepatitis C patients. **Antiviral Therapy**, v. 15, n. 8, p.

1179–1183, 2010.

NUZZO, D. V. P. DI; FONSECA, S. F. Sickle cell disease and infection. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 347–54, 2004.

OHENE-FREMPONG, K. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 288–294, 1998.

OJODU, J. et al. Incidence of sickle cell trait--United States, 2010. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 63, n. 49, p. 1155–8, 12 dez. 2014.

ONWUBALILI, J. K. Sickle cell disease and infection. **Journal of Infection**, v. 7, n. 1, p. 2–20, jul. 1983.

ORRINGER, E. et al. Effects of hydroxyurea on hemoglobin F and water content in the red blood cells of dogs and of patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 78, n. 1, p. 212–216, 1991.

OYEKU, S. O. et al. Parental and other factors associated with hydroxyurea use for pediatric sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 60, n. 4, p. 653–658, abr. 2013.

PAGE, E. et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura: Diagnostic criteria, clinical features, and long-term outcomes from 1995 through 2015. **Blood Adv**, v. 1, n. 10, p. 590–600, 2017.

PARK, B. H. et al. Delta neutrophil index as an early marker of disease severity in critically ill patients with sepsis. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 299, 2011.

PATERSON, D. L. et al. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 3, p. 253, 2002.

PAULING, L. et al. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, v. 110, n. 25, p. 543, 1949.

PAYNE, A. B. et al. Invasive Pneumococcal Disease Among Children With and Without Sickle Cell Disease in the United States, 1998 to 2009. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 12, p. 1308–1312, dez. 2013.

PEARSON, H. A. Sickle cell anemia and severe infections due to encapsulated bacteria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 136, n. 2 Suppl., p. 25–30, 1977.

PEERSCHKE, E. I. B.; PESSIN, M. S.; MASLAK, P. Using the hemoglobin content of reticulocytes (RET-He) to evaluate anemia in patients with cancer. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 142, n. 4, p. 506–512, 2014.

PÉREZ-ÉCIJA, A.; GARCÍA, F. J. M. **Diagnostic use of the reticulocyte maturity indices by the Sysmex XN-V analyser** Sysmex Educational Enhancement and

**Development**, 2021.

PERUTZ, M. F. et al. **Structure of Hæmoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 5.5- resolution, obtained by X-ray analysis***Nature*, fev. 1960.

Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/185416a0>>

PIEL., F.; STEINBERG., M.; REES., D. Sickle Cell Disease. **The New England journal of medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.

PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 8, 2010.

PIEL, F. B. et al. Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 142–151, 2013a.

PIEL, F. B. et al. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 7, 2013b.

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

PIOMELLI, S.; DANOFF, S.; BECKER, M. Prevention of bone malformations and cardiomegaly in Cooley ' s anemia by early hypertransfusion regime. **Ann NY Acad Sci**, v. 165, p. 427, 1969.

PIPITONE, S. et al. Evaluation of automated nucleated red blood cells counting on Sysmex XE5000 and Siemens ADVIA 2120. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 10, p. 1857–1859, 2012.

PIVA, E. et al. Clinical Utility of Reticulocyte Parameters. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 1, p. 133–163, 2015.

PLATT, O. S. et al. Mortality In Sickle Cell Disease -- Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 23, p. 1639–1644, 9 jun. 1994.

PRELOZNIK-ZUPAN, I.; CERNELC, P.; ZONTAR, D. Reticulocyte analysis using light microscopy and two different flow cytometric procedures. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 440, n. SUPPL. 5, p. 185–187, 2000.

PURTLE, S. W. et al. Nucleated red blood cells, critical illness survivors and postdischarge outcomes: A cohort study. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2017.

QUINN, C. T. et al. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. **Blood**, v. 115, n. 17, p. 3447–3452, 2010.

- QUINN, C. T. et al. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 12, p. 1195–1201, 2016.
- RAI, D.; WILSON, A.; MOOSAVI, L. **Histology, Reticulocytes**. Disponível em: <[https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/28438#ref\\_11574956](https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/28438#ref_11574956)>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- RAPPAPORT, E. . et al. Automated Hematology: where we stand. **South Med J**, v. 81, n. 3, p. 365–70, 1988.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.
- REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1383–1389, 2002.
- REYNOLDS, S. **Ultimate Gating Strategy for Flow Cytometry Data Analysis**. Disponível em: <<https://www.flowmetric.com/cytometry-blog/flow-cytometry-gating-strategy>>. Acesso em: 16 abr. 2021.
- REZENDE, J. DE. **Linguagem Médica**. 4° ed. [s.l.] Kelps, 2011.
- RILEY, R. S. et al. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 15, n. 5, p. 267–294, 2001.
- RINDER, H. et al. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. **Arch Pathol Lab Med**, v. 117, n. 6, p. 606–610, 1993.
- ROSENKRANZ, H. S.; GUTTER, B.; BECKER, Y. Studies on the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*: selective inhibition by hydroxyurea. **Journal of Bacteriology**, v. 115, n. 2, p. 682–690, 1973.
- ROSENTHAL, F.; WISLICKI, L.; KOLLEK, L. Über die chemischen Beziehungen von schwersten Blutgiften zu Abbauprodukten des Eiweisses. **Klin. Wochenschr**, v. 7, p. 972–977, 1928.
- SABARENSE, A. P. et al. Survival of children with sickle cell disease in the comprehensive newborn screening programme in Minas Gerais, Brazil. **Paediatrics and International Child Health**, v. 35, n. 4, p. 329–332, 2015.
- SADREAMELI, S. C. et al. Secondhand smoke is associated with more frequent hospitalizations in children with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 3, p. 313–317, 2016.
- SAKURAGI, M. et al. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic

- disorders. **International Journal of Hematology**, v. 101, n. 4, p. 369–375, 2015.
- SAVAGE, W. J. et al. Evidence gaps in the management of sickle cell disease: A summary of needed research. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 4, p. 273–275, 2015.
- SAVITT, T. L.; GOLDBERG, M. F. Herrick's 1910 Case Report of Sickle Cell Anemia: The test of the Story. **JAMA**, v. 261, n. 2, p. 266–271, 1989.
- SAXON, B. R. et al. Reticulated platelet counts in the assessment of thrombocytopenic disorders. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement**, v. 87, n. 424, p. 65–70, 1998.
- SCHAPKAITZ, E. Stability of new erythrocyte and reticulocyte parameters interesting for anemia on the Sysmex XN 9000. **Lab Medicine**, v. 49, n. 3, p. 219–225, 2018.
- SCHOORL, M. et al. New fluorescent method (PLT-F) on sysmex XN2000 hematology analyzer achieved higher accuracy in low platelet counting. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 140, n. 4, p. 495–499, 2013.
- SCOTT, J. P. et al. Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. **Journal of Pediatrics**, v. 128, n. 6, p. 820–828, 1996.
- SEAKINS, M. et al. Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 52, n. 2, p. 422–432, 1973.
- SEHOP. Guia de prática clínica sobre enfermidade de células falciformes pediátrica. **Soc Española Hematol Y Oncol Pediátrica**, 2010.
- SEO, J. Y.; LEE, S.; KIM, S. Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex. **Int J Lab Hematol**, v. 37, n. 2, p. 155–64, 2015.
- SERJEANT, G. R. The natural history of sickle cell disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 10, p. 1–12, 2013.
- SGNAOLIN, V.; FIGUEIREDO, A. E. P. L. Adesão ao tratamento farmacológico de pacientes em hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 2, p. 109–116, jun. 2012.
- SHIH, S.; COHEN, L. L. A Systematic review of medication adherence interventions in pediatric sickle cell disease. **Journal of Pediatric Psychology**, v. 45, n. 6, p. 593–606, 2020.
- SHOOTER, C. et al. First reported duplication of the entire beta globin gene cluster causing an unusual sickle cell trait phenotype. **British Journal of Haematology**, v. 170, n. 1, p. 128–131, 2015.

- SILVA-PINTO, A. C. et al. Efeitos clínicos e hematológicos do tratamento com hidroxiureia em pacientes falciformes: Experiência de um centro no Brasil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 4, p. 238–243, 2013.
- SILVA, W. S. et al. Screening for structural hemoglobin variants in bahia, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 13–18, 2016.
- SOLANKI, D. L. et al. Hemolysis in Sickle Cell Disease as Measured by Endogenous Carbon Monoxide Production: A Preliminary Report. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 89, n. 2, p. 221–225, 1 fev. 1988.
- SOTOUDEH, E.; SOTOUDEH, H. A hypothesis about the role of fetal hemoglobin in COVID-19. **Medical Hypotheses**, v. 144, n. June, p. 109994, 2020.
- SPIVAK, J. L.; HASSELBALCH, H. Hydroxycarbamide: A user's guide for chronic myeloproliferative disorders. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 11, n. 3, p. 403–414, 2011.
- STEARNS, B.; LOSEE, K. A.; BERNSTEIN, J. Hydroxyurea. A New Type of Potential Antitumor Agent 1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 201–201, mar. 1963.
- STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Bailliere's Clinical Haematology**, v. 11, n. 1, p. 163–184, 1998.
- STEINBERG, M. H. et al. Effect of Hydroxyurea on Mortality and Morbidity in Adult Sickle Cell Anemia: Risks and Benefits Up to 9 Years of Treatment. **Journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 13, p. 1645–1651, 2003.
- STEINBERG, M. H. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? **Blood**, v. 123, n. 4, p. 481–485, 23 jan. 2014.
- STEINBERG, M. H. et al. Hemoglobins of the Embryo, Fetus, and Adult. In: **Disorders of Hemoglobin**. Cambridge: Cambridge University Press, 2018. p. 119–136.
- SUMITA, N. et al. **Automação laboratorial: Histórico ,seleção, implantação e gestão. Chapter: Analisadores de Gases Sanguíneos**. 1º ed. Barueri: Manole, 2017.
- SYSMEX. **PLT-F channel**. Disponível em: <<https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/technologies/plt-f-channel.html>>.
- SYSMEX AMERICA INC. Beyond a Better Box - XN-Series™ Automated Hematology Analyzers. 2016.
- TANAKA, Y. et al. Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-Series Automated Hematology Analyzers. v. 348, n. September

2013, p. 341–348, 2014.

TANTANATE, C.; KHOWAWISETSUT, L.; PATTANAPANYASAT, K. Performance Evaluation of Automated Impedance and Optical Fluorescence Platelet Counts Compared With International Reference Method in Patients With Thalassemia. **Arch Pathol Lab Med**, v. 141, n. 6, p. 830–836, 2017.

TAVARES, N. U. L. et al. Factors associated with low adherence to medicine treatment for chronic diseases in brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 50, n. supl 2, p. 1–11, 2016.

TELFAIR, J. et al. Rural/urban differences in access to and utilization of services among people in Alabama with sickle cell disease. **Public Health Reports**, v. 118, n. 1, p. 27–36, 2003.

THOM, C. S. et al. Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 3, 2013.

THORNBURG, C. D. et al. Adherence to Hydroxyurea Therapy in Children with Sickle Cell Anemia. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 3, p. 415–419, 2010.

TOKI, Y. et al. Reticulocyte hemoglobin equivalent as a potential marker for diagnosis of iron deficiency. **International Journal of Hematology**, v. 106, n. 1, p. 116–125, 2017.

TRAEGER-SYNODINOS, J.; HARTEVELD, C. L. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. **Biomarkers in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 119–131, 2014.

TVEDTEN, H. What is your diagnosis ? Discrepancy in platelet counts determined using a Sysmex XT-2000 iV hematology analyzer. **Vet Clin Pathol**, v. 39, n. 3, p. 395–396, 2010.

UÇAR, M. A. et al. The importance of RET-Hb in the diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia and the evaluation of response to oral iron therapy. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 496–502, 2019.

UEDA, Y.; KONDO, M.; KELSOE, G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1771–1780, 2005.

UIJTERSCHOUT, L. et al. The value of Ret-Hb and sTfR in the diagnosis of iron depletion in healthy, young children. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 8, p. 882–886, 2014.

UPPAL, V. et al. Reticulocyte count and its parameters: comparison of automated

analyzers, flow cytometry, and manual method. **Journal of Hematopathology**, v. 13, n. 2, p. 89–96, 2020.

URRECHAGA, E.; BORQUE, L.; ESCANERO, J. F. Potential utility of the new sysmex XE 5000 red blood cell extended parameters in the study of disorders of iron metabolism. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1411–1416, 2009.

VAN DE WYNGAERT, Z. et al. Immature platelet fraction (IPF): A reliable tool to predict peripheral thrombocytopenia. **Current Research in Translational Medicine**, v. 68, n. 1, p. 37–42, 2020.

VAN DER GEEST, P. J. et al. Immature granulocytes predict microbial infection and its adverse sequelae in the intensive care unit. **Journal of Critical Care**, v. 29, n. 4, p. 523–527, 2014.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, M. A. et al. The usefulness of reticulocyte haemoglobin content, serum transferrin receptor and the sTfR-ferritin index to identify iron deficiency in healthy children aged 1–16 years. **European Journal of Pediatrics**, v. 178, n. 1, p. 41–49, 2019.

VISWANATHAN, M. et al. Interventions to Improve Adherence to Self-administered Medications for Chronic Diseases in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, n. 11, p. 785, 4 dez. 2012.

WADA, A. et al. Accuracy of a New Platelet Count System ( PLT-F ) Depends on the Staining Property of Its Reagents. p. 1–13, 2015.

WALSH, K. E. et al. Medication adherence among pediatric patients with sickle cell disease: A systematic review. **Pediatrics**, v. 134, n. 6, p. 1175–1183, 2014.

WALTERS, M. C. et al. Pulmonary, Gonadal, and Central Nervous System Status after Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 16, n. 2, p. 263–272, 2010.

WANG, F. S. et al. Development and clinical application of nucleated red blood cell counting and staging on the automated haematology analyser XE-2100™. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 25, n. 1, p. 17–23, 2003.

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

WEATHERALL, D. et al. Inherited Disorders of Hemoglobin. **Disease Control Priorities in Developing Countries (2nd Edition)**, p. 663–680, 2006.

WEATHERALL, D. J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global

- health burden. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4331–4336, 2010.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704–712, 2001.
- WIERENGA, K. J. J.; HAMBLETON, I. R.; LEWIS, N. A. Survival estimates for patients with homozygous sickle-cell disease in Jamaica: A clinic-based population study. **Lancet**, v. 357, n. 9257, p. 680–683, 2001.
- WILE, M. J. et al. Manual Differential Cell Counts Help Predict Bacterial Infection. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 115, n. 5, p. 644–649, 1 maio 2001.
- WILLIAMS, T. N. et al. Bacteraemia in Kenyan children with sickle-cell anaemia: a retrospective cohort and case-control study. **The Lancet**, v. 374, n. 9698, p. 1364–1370, 2009.
- WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle cell anemia and its phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, n. March, p. 113–147, 2018.
- WILLIAMSON, D. . et al. Thrombocytopenia in Critically Ill Patients receiving thromboprophylaxis: frequency, risk factors, and outcomes. **CHEST**, v. 144, n. 4, p. 1207–1215, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Adherence to long-term therapies: evidence for action**. [s.l.: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. **Who**, p. 1–5, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Status Report On Noncommunicable Diseases 2014. 2014.
- WUN, T. et al. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 129, n. 5, p. 507–516, 1997.
- YALLOP, D. et al. The associations between air quality and the number of hospital admissions for acute pain and sickle-cell disease in an urban environment. **British Journal of Haematology**, v. 136, n. 6, p. 844–848, 2007.
- YAWN, B. P. et al. Management of sickle cell disease: Summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 312, n. 10, p. 1033–1048, 2014.
- ZAGO, M. A. et al. Genetic control of F cells in human adults. **Blood**, v. 53, n. 5, p.

977–986, 1979.

ZÚÑIGA C., P. et al. Sickle cell disease: A diagnosis to keep in mind. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 89, n. 4, p. 525–529, 2018.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A Anemia Falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, possuindo altos índices de morbimortalidade. Ela é caracterizada por fenômenos inflamatórios crônicos (tais como crises hemolíticas e lesões progressivas dos tecidos e órgãos) exacerbados por episódios agudos de falcização, dor óssea e vaso-occlusão. Em decorrência das diversas complicações associadas ao desenvolvimento da patologia e do monitoramento da adesão ao tratamento (HU) destes pacientes, exprime-se a necessidade do acompanhamento regular dos pacientes com o apoio de equipes multidisciplinares. A identificação da doença em seu estágio inicial e seus fatores de risco, assim como o encaminhamento ágil e apropriado para o atendimento especializado, são essenciais para um melhor resultado terapêutico. A alta taxa de desinformação sobre a doença, por parte dos pacientes, é atribuída ao seu baixo nível socioeconômico e de escolaridade, afetando diretamente sua adesão e sendo associada a um pior prognóstico. O uso correto da HU conduz à estabilidade do paciente, diminuindo a frequência de crises agudas e internações hospitalares, melhorando a qualidade de vida desses indivíduos e atenuando o custo do tratamento.

Este estudo procura analisar os resultados de novos parâmetros hematológicos (parâmetros avançados do hemograma - PCAs) que sinalizem, em tempo real, as condições medulares e sanguíneas de pacientes portadores de AF e verificar a sua possível utilidade clínica na avaliação da adesão à HU. Assim, novos parâmetros poderão ser inseridos no acompanhamento dos pacientes, colaborando na identificação daqueles com má adesão, a fim de indicar a necessidade de intervenções para fidelização ao tratamento.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Verificar a utilidade dos parâmetros clínicos avançados do hemograma (PCAs) como avaliação da adesão à hidroxiureia (HU) em pacientes portadores de Anemia Falciforme.

### 5.2 – Objetivos específicos

Em pacientes portadores de AF:

- Verificar o perfil demográfico, a polifarmácia e os parâmetros hematológicos dos pacientes;
- Avaliar a adesão à HU por meio de método direto (volume eritrocitário corpuscular médio) e método indireto (registro de retirada de comprimidos/adesão autorrelatada);
- Comparar os dois métodos (direto e indireto) para medida de adesão à HU em pacientes portadores de AF;
- Comparar os resultados obtidos entre os distintos métodos de avaliação da adesão com os PCAs (RET-He, NRBC e IRF, IPF e PLT-F, IG);
- Verificar a associação entre os parâmetros hematológicos clássicos e adesão à HU
- Verificar a associação entre adesão à HU e variáveis demográficas;
- Verificar a associação entre dose e adesão à HU;
- Verificar a associação entre frequência de uso e adesão à HU;
- Verificar a associação entre efeitos adversos e adesão à HU;
- Estabelecer um ponto de corte para os parâmetros hematológicos associados à adesão.

## 6. ARTIGO ORIGINAL

### **Advanced Clinical Parameters – a complementary hydroxyurea adherence evaluation in sickle cell anemia treatment**

Isabela Delfino Moreira<sup>1</sup>, Carem Luana Machado Lessa<sup>2</sup>, Gueverson Leonardo Gonçalves Rocha<sup>1,3</sup>, Laura Dewes Schmitz<sup>4</sup>, Viviane Schmitt Jahnke<sup>5</sup>, Laura Maria Fogliatto<sup>1,2</sup>, Maria Cristina Werlang<sup>1</sup>, Liane Nanci Rotta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

<sup>2</sup> Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

<sup>3</sup> Clinicas Hospital of Porto Alegre/RS, Brazil.

<sup>4</sup> Undergraduate Program in Pharmacy, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre/RS, Brazil.

<sup>5</sup> Vale do Rio dos Sinos University (UNISINOS), Porto Alegre/RS, Brazil

\*Corresponding author

Liane N. Rotta

Sarmiento Leite, 245 – Centro Histórico

CEP: 90.050-170 - Porto Alegre/RS – Brasil

e-mail: lnrotta@ufcspa.edu.br

Phone +55 51 3303 8889

## ABSTRACT

**Objectives:** Given the complex pathology of sickle cell anemia (SCA) and low adherence to Hydroxyurea (HU) treatment, there is a need to seek parameters that identify recent changes in patient status. The Advanced Clinical Parameters (ACPs) allow an early analysis of hematopoiesis. We aimed to draw the demographic profile of non-adherent SCA patients and to verify the use of ACPs as a measure of HU treatment adherence.

**Method:** In a cross-sectional study, we divided 83 SCA subjects treated with HU into Children (<12 years old) and Adolescents/Adults ( $\geq 12$  years old). Their hemogram with the PCAs, electronic medical charts and pharmacy claim data were analyzed.

**Results:** Non-adherent  $\geq 12$  years old patients had significantly increased WBC, absolute neutrophil, lymphocyte, monocyte, and basophil counts, RBC, RET, RDW, and PLT, and significantly decreased VCM and HCM. Subjects in the Adolescent/Adult group with IG $\dagger \geq 0.035$  cells/mm<sup>3</sup> had the RR for non-adherence increased by 4.6 times ( $p=0.014$ ), and the systemic immune inflammation index (SII) of non-adherent patients was also significantly higher ( $p=0.042$ ).

**Conclusion:** IG $\dagger$  presents clinical utility in early identification of non-adherence to HU, especially when combined with other parameters, suggesting the evaluation of ACPs in laboratory routine, as they can be easily implemented.

## Introduction

Sickle cell disease (SCD) is a group of inherited hemoglobin (Hb) disorders that affects the shape and function of red blood cells (RBC) (1). They were first described by Herrick in 1910 (2) and are caused by abnormal beta-globin alleles carrying the sickle mutation on the HBB gene (Glu6Val,  $\beta$ S). The incidence of SCD varies by country, race, and ethnicity and amounts to approximately 3.2 million cases worldwide and 300,000 births every year (3,4).

The most common and severe disease form is Sickle Cell Anemia (SCA), characterized by homozygosity for the mutated Hb variant - HbS. Intraerythrocytic deoxygenation in tissues with high oxygen demand prompts intracellular HbS polymerization, disrupting cell architecture and flexibility (1,5,6). The damaged erythrocytes display flawed rheologic features and expression of adhesion molecules. It leads to hemolytic anemia and cycles of microvascular vaso-occlusion, resulting in repeated organ ischemia-reperfusion injury (5–7).

Hydroxyurea (HU) is an inhibitor of the enzyme ribonucleoside diphosphate reductase and the only medication approved for SCD/SCA treatment. It has multiple physiological effects, including an increase in HbF expression and a decrease in platelet and white cell counts (7,8). However, despite the consequential reduction in morbidity/mortality and improved quality of life, the hydroxyurea adherence remains suboptimal (9,10).

The etiology of chronic treatment non-adherence is multifactorial. It encompasses a plethora of intentional and unintentional barriers (11) and translates to poor outcomes and consequent additional burdens for healthcare systems (12). The traditional Complete Blood Count (CBC) is routinely used to monitor SCA patients; however, there is a need to search for innovative parameters that identify recent changes in patient status. The Advanced Clinical Parameters (ACPs) of the CBC depict an improvement in hematological automation. They allow an early analysis of erythropoiesis, granulopoiesis, and thrombocytopoiesis (13). Accurate estimates of treatment compliance assist in highlighting possible predictors and risk factors, along with the development of strategies/interventions to improve medication adherence. The aim of this study was to evaluate the ACPs as a measure of adherence to hydroxyurea in patients with SCA.

## Methods

### ***Patient enrollment***

This is a single-institution cross-sectional study conducted between January 2018 and December 2019 using a nonprobability convenience sampling methodology. All patients assisted at Clinicas Hospital of Porto Alegre (HCPA)/Brazil were eligible if they (i) had a diagnosis of SCA (HbSS) confirmed with hemoglobin electrophoresis, (ii) were  $\geq 2$  years old, and (iii) initiated HU at least 6 months before study entry. Our exclusion criteria included patients without (i) the investigated parameters in their CBC, (ii) self-reported adherence in their medical chart, and (iii) pharmacy claim databases. The selected patients were classified as children (2-11 years old) and adolescents and up ( $\geq 12$  years old).

This study was registered and approved by HCPA's Research Ethics Committee. Informed consent was obtained from all participants and children's legal guardians and all experimental procedures were performed according to the Declaration of Helsinki.

### ***Adherence measure and medical records review***

We evaluated HU adherence using the records on HCPA's pharmacy claim database and self-reported adherence through a medical chart review. Hydroxyurea (500mg) was provided to patients in bottles with a hundred capsules. The days until the next hematological appointment were calculated and the patients were supplied with the correct amount of medication. When the patient returned for the follow-up and new prescription refilling, the Proportion of Days Covered (PDC) by the amount of hydroxyurea was calculated using the following formula (12,14):

$$\text{PDC} = \frac{\text{Total Days of Drug Available}}{\text{Days until Follow Up}} \times 100$$

A cut-off point of  $\geq 80\%$  covered days categorized the patients as being adherent (14). However, this method does not prove actual drug intake. Therefore, patient electronic medical records were reviewed to obtain their self-reported adherence information. If the patient PDC was  $\geq 80\%$ , but they claimed not to take the medication regularly, they were automatically lowered to the non-adherent category. Sociodemographic characteristics and polypharmacy data were also collected. Our

polypharmacy criteria followed the World Health Organization guideline as to the use of four or more medications at the same time by an individual (15).

### ***Laboratory data***

Peripheral venous blood specimens were collected into K2EDTA-containing tubes, and classic CBC parameters (WBC – white blood cells; absolute (†) and percentual (%) count of neutrophil (N), lymphocyte (L), monocyte (M), eosinophil (E) and basophil (B); RET – reticulocytes; RBC – red blood cells; Hb - haemoglobin; Htc – hematocrit; MCV – mean corpuscular value; MCH- mean corpuscular haemoglobin; MCHC - mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW – red cell distribution width, PLT – platelet count; MVP – mean platelet value) and PCAs (IRF – immature reticulocyte fraction; IPF – immature platelet fraction; IG – immature granulocytes, RET-He - Reticulocyte haemoglobin equivalent; PLT-F – fluorescent platelet count) were determined using a Sysmex XN-9000® blood analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). All tests were performed within four hours of peripheral blood collection and the blood analysis was carried upon laboratory-established quality control procedures. If the patient had more than one CBC registered during the study period, the first one was selected for analysis. We additionally calculated the patient's platelet-lymphocyte ratio (PLR), neutrophil/lymphocyte ratio (NLR), and Systemic immune-inflammation index (SII - platelet $\times$ neutrophil/lymphocyte counts) (16).

### ***Statistical Analysis***

All data were analyzed using SPSS Statistics® version 25.0.0.0 (IBM corporation, New York, NY, USA). Sample distributions were estimated using the Shapiro-Wilk normality test. Medians between groups were analyzed using the Mann-Whitney U test, and variables were described as median and interquartile range. Pearson's chi-square test was used for comparisons between qualitative variables.

Pearson's correlation coefficient and receiver-operating characteristic (ROC) plots were used to determine the specificity and sensitivity of significant variables as possible markers. The optimal cutoff point was defined using the Youden method. In addition, the relative risk (RR) of statistically significant variables to non-adherence was calculated. Correlation analyses between markers were performed using Spearman's correlation coefficient. Significant differences were defined according to an  $\alpha$ -value of 5% ( $p < 0.05$ ).

## Results

This study was originally comprised of 106 patients. We excluded 23 patients for the following reasons: six had undergone chronic transfusion in the last two months, seven did not have records in the pharmacy claim database, nine did not have the self-reporting adherence in their medical chart, and one had initiated HU less than six months before the study. The goal sample was estimated at 34 patients, expecting to find a correlation between HU adherence and VCM similar to that observed in Badawy et al. (2017) of  $r=0.42$  with a power of 80% and 5% significance.

Of the remaining 83 patients, 48.19% ( $n=40$ ) were male and 51.81% were female ( $n=43$ ). 69.88% of the total sample were Black and “Pardo (brown-skinned)” and the remaining 30.12% were Caucasian. They were divided into two groups: Children ( $<12$  years old) and Adolescent/Adult ( $\geq 12$  years old). Our primary age divisions did not associate with high or low adherence ( $p=0.428$ ). However, when we stratified the subjects into multiple age categories, we found that the group corresponding to 12 – 18 years old was associated with nonadherence ( $p=0.030$ ). All clinical and sociodemographic data are shown in Table 1.

### **Children group**

In this group, the median age was four years old. Of the 27 patients, only three were classified as non-adherent. No sociodemographic parameters were significantly associated with high or low adherence (Table 1).

Although not statistically significant ( $p=0.446$ ), the median dose for the non-adherent children was slightly higher than the adherent group dose, 25.1 mg/kg/day (IQR 18.2-30.3) and 22.22 mg/kg/day (IQR 18.5-26.6), respectively. The following classic hematological parameters, RBC ( $p=0.017$ ), Hb ( $p=0.013$ ) and Htc ( $p=0.009$ ) were significantly lower in the non-adherent group (Table 2). Due to the small number of non-adherent children, the cutoffs resulted from the ROC curves were not analyzed.

Additionally, we assessed possible connections between the hematological parameters and sociodemographic data regardless of adherence category (data not shown). Black/Pardo children presented higher levels of HbA2 ( $p=0.021$ ) and HbSS ( $p=0.007$ ), while displaying lower MCV ( $p=0.013$ ) and MCH ( $p=0.017$ ). RET-He was the only ACP that show a difference between groups, with Caucasian children exhibiting statistically significant higher levels ( $p=0.05$ ). When divided into sex

categories, the female patients presented lower N% ( $p=0.028$ ) and NLR (neutrophil/lymphocyte ratio,  $p=0.045$ ).

Polypharmacy was observed in 12 subjects, including two of the three non-adherent cases. Total platelet count was lower in children displaying polypharmacy regardless of adherence ( $p=0.049$ ). 16 children (59.3%) took HU diluted in water due to difficulty in swallowing the pills. Furthermore, most of children did not present drug-related side effects to the HU treatment, and it was not related to patient adherence. However, the two cases that underwent drug-related side effects exhibited significantly lower WBC (white blood cells,  $p=0.026$ ) and L $\dagger$  (absolute lymphocyte count,  $p=0.042$ ).

Finally, we aimed to draw possible correlations between parameters. HbA2 showed a positive strong correlation with HbSS ( $r=0.759$ ,  $p<0.001$ ) and strong negative correlation with HbF% ( $r=-0.703$ ,  $p<0.001$ ). Of the PCAs, IG $\dagger$  (absolute immature granulocytes) was strongly correlated with WBC ( $r=0.767$ ,  $p<0.001$ ), N $\dagger$  ( $r=0.812$ ,  $p<0.001$ ), and M $\dagger$  ( $r=0.722$ ,  $p<0.001$ ). RET-He also presented a strong positive correlation with VCM ( $r=0.758$ ,  $p<0.001$ ) and HCM ( $r=0.762$ ,  $p<0.001$ ) (Supplementary Figure 1).

### ***Adolescent/Adults group***

The median age for the adolescent/adult group was 33 years old. Black and “Pardo” patients were more adherent to treatment ( $p=0.017$ ), with Caucasian adolescents/adults presenting a relative risk (RR) of 3.65 to being non-adherent (Table 5). Patients displaying drug-related side effects had significantly lower adherence ( $p=0.002$ ) with an RR of 5.0. Surprisingly, patients in the use of polypharmacy exhibited higher HbF% levels ( $p=0.027$ , regardless of adherence category), and higher adherence rate ( $p=0.047$ ) with a RR of non-adherence 66% lower. Polypharmacy was not related to school years ( $p=0.257$ ). Distance to the hospital and marital status were not significant for treatment adherence (Table 1).

Female patients presented lower levels of HbA ( $p=0.022$ ), and Caucasian patients exhibited higher M $\dagger$  ( $p=0.032$ ) regardless of adherence category. Cases displaying drug-related side effects had significantly higher RDW ( $p=0.039$ ) and higher pill count/day ( $p=0.035$ ) (Data not shown).

Table 3 shows the hematological and HU parameters for the Adolescent/Adult group. Despite not significant, similarly to the children group, adolescents/adults with low adherence rates also were under higher HU doses (Table 3). Non-adherent

patients had significantly higher levels of WBC, N $\dagger$ , L $\dagger$ , M $\dagger$ , B $\dagger$ , RBC, RDW, PLT, and RET and lower MCV and MCH. The absolute immature granulocyte count (IG $\dagger$ ) was the only PCA to present statistical significance between groups, with higher levels in cases with low adherence rates ( $p=0.008$ ). We also assessed the SII (a composite indicator integrating platelet, neutrophil, and lymphocyte counts) of patients, and it was significantly higher in low adherence subjects ( $p=0.042$ ).

Figure 1 shows the established cutoffs for the significant parameters in addition to their ROC curves. The higher AUCs were WBC (0.824), MCV (0.820), M $\dagger$  (0.816) and MCH (0.813). Except for MCV and MCH, values equal to or higher than the cutoff predicted low treatment adherence. SII presented the highest RR for low-adherence, 9.3 times for cases with  $SII \geq 394.41$ . Patients with  $MCV \leq 96.7$  (fL) have the RR of low adherence increased 9.1 times. As for cases with an  $IG\ddagger \geq 0.035$  (cells/mm<sup>3</sup>), the RR is increased by 4.6 times (Table 5).

Table 4 shows the accuracy diagnostic of the CBC parameters. L $\dagger$ , B $\dagger$ , and HCM displayed 100.0% sensibility, and RBC exhibited the highest specificity (97.8%). WBC showed the highest combined sensitivity and specificity, 80.0% and 87.0%, respectively, and IG# presented sensibility of 70.0% and specificity of 75.0%. All parameters demonstrated a higher negative predictive value (NPV >88.2%) with lower positive predictive value (PPV: 28.6% to 80.0%). RBC showed the highest accuracy (87.5%) and highest combined NPV and PPV (88.2% and 80.0%, respectively).

Pearson's correlation test showed a strong negative correlation between HbF% and both HbA2 ( $r=-0.811$ ,  $p<0.001$ ) and HbSS ( $r=-0.798$ ,  $p<0.001$ ). IG $\dagger$  strongly correlated with WBC ( $r=0.773$ ,  $p<0.001$ ), and N $\dagger$  ( $r=0.737$ ,  $p<0.001$ ) and RET-He had a strong positive correlation with MCH ( $r=0.720$ ,  $p<0.001$ ) and moderate with MCV ( $r=0.673$ ,  $p<0.001$ ), and MCHC ( $r=0.643$ ,  $p<0.001$ ). In the platelet parameters, IPF showed strong positive correlation with MVP ( $r=0.773$ ,  $p<0.001$ ) and PLT-F strongly correlated with PLT ( $r=0.986$ ,  $p<0.001$ ) (Supplementary Figure 1).

## Discussion

It has been decades since the identification of HU benefits on HbF production (18), erythrocytes rheological properties (19), pain reduction (20), and overall improvement in quality of life (8). According to the World Health Organization, the non-adherence to long-term treatments in the general population is approximately 50%

(21), and monitoring of patient adherence is pivotal for planning interventions and policy-making (22).

Our sample population had an overall medication adherence rate of 84%, similar to that found by Inoue et al. (2016) in a feasibility study (24). The authors conducted a study using an electronic medication container device to track adherence and showed that the median adherence rate for the 12 patients evaluated was 85%. Even as caucasians account for 76.7% of the population in southern Brazil (24), our patients were majorly black/pardo (70%), evidencing the disease's ties to ethnicity. Furthermore, similarly to a previous review study regarding medication adherence among pediatric patients with SCD and a model of pediatric self-management that found poor adherence in adolescents with SCD (25,26), we identified significantly lower adherence in the 12-18 age category ( $p=0.030$ ). Forgetfulness, supportiveness of peer relationships, and shifts in treatment dynamics are common barriers for chronically ill adolescents (27).

Following national guidelines for HU dosage (28), the initial recommended dosing was 15 mg/kg/day based on the patient's actual or ideal weight, whichever was lower. The dose was increased five mg/kg/day every four weeks, and patients were monitored for CBC parameters and drug-related side effects according to Brazilian protocols (28). Eighty-one patients were under the maximum tolerated dose (MTD) for hydroxyurea (35 mg/kg/day). The two patients with HU over the MTD (39 mg/kg/day and 44.4 mg/kg/day) were in the adolescent/adult group and did not have any clarifying information in their medical charts regarding the dosage.

The difficulty to differentiate between treatment inefficacy and non-adherence is among the many challenges associated with HU treatment. There is a wide interpatient pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) variability due to different genetic, metabolic, and physiological profiles. It can affect patient's MTD and possibly result in underdosing, or overdosing (29).

We observed only three cases (11.11%) of low adherence in the children group. Rates of medication adherence in the pediatric population are variable and pose unique challenges (30). Whether or not a child receives their prescribed therapy depends not only on themselves but also on the parent/caregiver, who is often responsible for giving the medication. In our pediatric sample, we found high compliance of parents regarding the treatment of their child. According to our research, electronic charts of children were more in-depth when compared to the

adolescent/adult group. This finding might be associated with the parents' behavior of worrying more about their children's health than their own.

Non-adherent children presented significantly lower erythrocyte parameters RBC, Hb, and Htc. Discontinuing the HU treatment may activate the bone marrow. However, our unexpected findings regarding this group are either suggestive of a possible hemolysis rise, as previous studies have shown the beneficial effects of HU on intravascular hemolysis markers in SCA patients (31,32), or it resulted from our small number of non-adherent cases. Furthermore, black and pardo children presented higher HbA2 and HbSS, and lower MCV, MCH and Ret-He. A study researched hematologic differences between african-americans and Caucasians, and found that african-americans exhibited lower MCV (33). However, no other studies are investigating this parameter in SCA or SCD patients, regarding CBC differences related to ethnicities. In addition, the higher HbA2 and HbSS might promote less cell hydration and impact the lower MCV, MCH, and Ret-He. The lower NLR exhibited by girls will require further research. To our best knowledge, there is no recording of difference in hematological parameters in children solely based on sex. Therefore, studies with larger pediatric samples are required.

Only two children (7.41%) presented drug-related side effects to the medication. One child exhibited stomachache upon taking the HU, and the other experienced hair loss. Gastrointestinal issues are common HU drug-related side effects (34), and, although more unusual, the hair loss appeared to be transient. These two children also had lower WBC and L $\dagger$ . However, since there are only two cases, it is not recommended to make assumptions about possible connections.

Of the 27 children, 16 (59.3%) took HU diluted in water due to age and difficulty swallowing pills. The liquid and capsule formulations of HU are bioequivalent (35). However, the correct preparation of the solution relies on the parents/caregivers and the HU adherence of the children is directly connected to the parents' compliance with treatment. Overall, HU was well tolerated among our pediatric patients, and our sample exhibited high adherence rates.

The adolescent/adult group was composed of 56 individuals, with 31 women and 25 men. Like our children group, the dose of non-adherent patients was higher when compared to high adherence patients (25.00 mg/kg/day and 21.50 mg/kg/day, respectively). In addition, the negative impact of drug-related side effects on patient adherence has been previously described (36). Of the ten non-adherent patients, four

exhibited gastrointestinal discomfort upon taking HU. It is one of the most commonly reported clinical drug-related side effects of HU therapy (34) and highly impacted adherence rates. Surprisingly, polypharmacy was higher in adherent patients. We believe this finding may be a result of comprehending disease severity or more contact with the healthcare system.

Our non-adherent patients presented significantly higher RBC counts, reticulocytes, and RDW, alongside lower MCV and MCH. The high erythrocyte count may be related to more active bone marrow. These patients are not taking HU regularly, and this behavior might dampen its decreasing effect on bone marrow function. These results also indicate that the erythrocytes are less hydrated and emphasize the anisocytosis due to the probable presence of more sickling cells. Furthermore, their higher platelet count may predispose them to pulmonary arterial hypertension due to in situ thrombosis promotion (37).

The immune system of adolescent/adult non-adherent patients also seems to be more active and may be evidence of the inflammatory traits of the disease. The higher WBC count might also represent greater disease severity, as high leukocyte counts are a risk factor for acute chest syndrome (ACS) and hemorrhagic stroke (38,39). Our results further support the claim that innate immune cells are protagonists of SCD pathophysiology (40). It is known that HU reduces neutrophil count and lowers the expression of adhesion markers on these cells (41); therefore, the medication's irregular use possibly increases its production and activation.

Additionally, our findings of significantly lower absolute monocyte, lymphocyte, and basophil counts in adherent patients ( $p=0.002$ ,  $p=0.042$ , and  $p=0.006$ , respectively) are further evidence of HU's effect on dampening the bone marrow. Wongtong et al. (2015) found a correlation between absolute monocyte count and hemoglobin in SCD patients (42). However, we did not observe the same in our population. As evidence of the inflammatory effects promoted by HU intermittent taking, non-adherent patients also presented a significantly higher systemic immune-inflammation index (SII). This finding may indicate a perpetuating chronic inflammatory state affecting blood flow and leading to vaso-occlusive crisis and other complications such as leg ulcers, autosplenectomy, nephropathy, pulmonary hypertension, and stroke (43).

The IG† count was the only ACP to differ in adherent and non-adherent patients from the adolescent/adult group ( $p=0.008$ ). This parameter has been studied for sepsis

prediction in a plethora of situations (44,45). In our study, it exhibited a prediction of non-adherence above the cutoff value of 0.04 cells/mm<sup>3</sup> with a sensibility of 70.0% and specificity of 75.0%. The NPV of 91.7% indicates a high probability of identifying adherent patients when the IG count is under the cutoff. Lower levels of HU may stimulate the bone marrow and emphasize the inflammatory nature of SCA, promoting recruitment into the circulation of immature neutrophils.

HbF and MCV are currently in use for assessing adherence, both of which increase with HU treatment. Given the sickle cell lifespan of 31.9 days (ranging from 14.1 to 53.6 days) (46), it can take several weeks for these biomarkers to reflect adherence changes. It impacts clinical decisions regarding patient adherence and rightful dosage, as it becomes difficult to differentiate between treatment inefficacy and non-adherence. This indicates a need for biomarkers that provide early information about patient status.

It is logical to pursue the identification and implementation of clinically valuable parameters. The presence of IG in the peripheral blood of non-pregnant individuals may indicate a stimulus to the bone marrow, such as a response to infection or inflammation. The relatively short lifespan of immature granulocytes in circulation (even if prolonged when compared to mature ones) (47) grants the IG $\uparrow$  count advantage over the traditionally used parameters (HbF and MCV). The early detection of changes in IG counts may improve patient care by assisting in earlier poor adherence detection and possibly complement the already established biomarkers on treatment intervention. Additionally, the SII presented the highest RR for low-adherence, 9.3 times for cases with  $SII \geq 394.41$  ( $p=0.028$ ). The significant IG $\uparrow$  and SII findings indicate a higher systemic inflammation in non-adherent adolescent/adult patients. Therefore, our study suggests that these parameters can support adherence monitoring in SCA patients, especially if combined.

The majority of SCD/SCA patients have low education and socioeconomic levels (48,49). It may lead to misinformation concerning the disease, directly affecting their adherence, and associating with a worse prognosis. Hydroxyurea treatment can reduce the disease's clinical symptoms and allows them a higher quality of life. Therefore, the discovering of new hematological parameters is paramount. The ACPs are available in a variety of analyzers, and their use remains suboptimal. Research to further extend their usability is necessary to meet market demands and support cost-effective patient care.

The findings of this study have to be seen in the light of some limitations and challenges. Our research was faced with limited access to data. We depended on the previously recorded clinical information, and it led to the exclusion of several patients. Our children group presented a small number of non-adherent cases; therefore, we were unable to properly analyze the proposed variables. Additionally, we were able to identify a gap in the literature regarding HU adherence monitoring in SCA patients based on validated markers such as HbF and MCV, further emphasizing the relevance of this study.

Going forward, we encourage future researchers to explore the PCAs in other aspects of SCD/SCA disease, especially the IG $\dagger$  count as a biomarker for infection prediction. In Brazil, the non-adherence to chronic illnesses treatment is relevant and requires the support of multidisciplinary teams (50). Therefore, we highlight the need to assess patient demands, develop and implement new approaches in public health planning to relieve the global burden of SCA.

## **Conclusion**

This study provides evidence of the absolute IG count clinical utility, especially when combined with other parameters. It can help the understanding of HU adherence obtained by indirect means, such as the pill count. Additionally, we present insights into the sociodemographic and hematological aspects of pediatric and adult SCA patients. The absolute IG count can complement the already established adherence biomarkers in early identification of non-adherence. We highly suggest the use of all advanced clinical parameters as they can be easily implemented and performed in laboratory routines.

## **Conflict of interest**

The authors declare no competing interests.

## **Acknowledgements**

We acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarships of Isabela Delfino Moreira. The authors also thank the research team that made this study possible.

## References

1. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4:1–22.
2. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med*. 1910;VI(5):517–21.
3. Piel F, Hay S, Gupta S, Weatherall D, Williams T. Global Burden of Sick Cell Anaemia in Children under Five , 2010 – 2050: Modelling Based on Demographics , Excess Mortality , and Interventions. *PLOS Med*. 2013;10(7).
4. Global Burden of Disease Study. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117–71.
5. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561–73.
6. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sick Cell Disease. 2019;
7. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick-cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757):2018–31.
8. Luzzatto L, Makani J. Hydroxyurea — An Essential Medicine for Sick Cell Disease in Africa. *N Engl J Med*. 2019;380(2):187–9.
9. Badawy SM, Thompson AA, Lai J-S, Penedo FJ, Rychlik K, Liem RI. Health-related quality of life and adherence to hydroxyurea in adolescents and young adults with sick cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Jun;64(6):e26369.
10. Thornburg CD, Files BA, Luo Z, Miller ST, Kalpatthi R, Iyer R, et al. Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. *Blood*. 2012 Nov 22;120(22):4304–10.
11. Hodges JR, Phillips SM, Norell S, Nwosu C, Khan H, Luo L, et al. Intentional and unintentional nonadherence to hydroxyurea among people with sick cell disease: A qualitative study. *Blood Adv*. 2020;4(18):4463–73.
12. Anghel LA, Farcas AM, Oprean RN. An overview of the common methods used to measure treatment adherence. *Med Pharm Reports*. 2019;92(2):117–22.
13. Sumita N, Galoro C de O, Shcolnik W, Ferreira C dos S, Dias C, Campana G, et al. Automação laboratorial: Histórico ,seleção, implantação e gestão. Chapter: Analisadores de Gases Sanguíneos. 1°. Barueri: Manole; 2017. 402 p.
14. Chu L, Kawatkar AA, Gabriel SE. Medication Adherence and Attrition to Biologic Treatment in Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin Ther*. 2015;37(3):660-666.e8.
15. World Health Organization. Medication Without Harm - Global Patient Safety Challenge on Medication Safety. Vol. 1. Geneva; 2017.
16. Wang ZC, Jiang W, Chen X, Yang L, Wang H, Liu YH. Systemic immune-inflammation index independently predicts poor survival of older adults with hip fracture: a prospective cohort study. *BMC Geriatr*. 2021;21(1):155.
17. Badawy SM, Thompson AA, Lai JS, Penedo FJ, Rychlik K, Liem RI. Adherence to hydroxyurea, health-related quality of life domains, and patients' perceptions of sick cell disease and hydroxyurea: A cross-sectional study in adolescents and young adults. *Health Qual Life Outcomes*. 2017;15(1):1–10.
18. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea Enhances Fetal Hemoglobin Production in Sick Cell Anemia. *J Clin Invest*. 1984;74(2):652–6.
19. Ballas SK, Dover GJ, Charache S. Effect of hydroxyurea on the rheological

- properties of sickle erythrocytes in vivo. *Am J Hematol.* 1989;32(2):104–11.
20. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ. Effect of Hydroxyurea on the frequency of painful crises in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med.* 1995;332(20):1318–22.
  21. World Health Organization. Adherence to long-term therapies: evidence for action. 2003.
  22. Hanghøj S, Boisen KA. Self-reported barriers to medication adherence among chronically ill adolescents: A systematic review. *J Adolesc Heal.* 2014;54(2):121–38.
  23. Inoue S, Kodjebacheva G, Scherrer T, Rice G, Grigorian M, Blankenship J, et al. Adherence to hydroxyurea medication by children with sickle cell disease (SCD) using an electronic device: a feasibility study. *Int J Hematol.* 2016;104(2):200–7.
  24. IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de domicílios - Síntese de Indicadores 2015. Ibge. 2015. 105 p.
  25. Reeves SL, Jary HK, Gondhi JP, Raphael JL, Lisabeth LD, Dombkowski KJ. Hydroxyurea use among children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(6):2–5.
  26. Loiselle K, Lee JL, Szulczewski L, Drake S, Crosby LE, Pai ALH. Systematic and Meta-Analytic Review: Medication Adherence among Pediatric Patients with Sickle Cell Disease. *J Pediatr Psychol.* 2016;41(4):406–18.
  27. Modi AC, Pai AL, Hommel KA, Hood KK, Cortina S, Hilliard ME, et al. Pediatric self-management: A framework for research, practice, and policy. *Pediatrics.* 2012;129(2).
  28. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme. 2018.
  29. Pandey A. Hydroxyurea treatment of sickle cell disease: towards a personalized model-based approach. *J Transl Genet Genomics.* 2021;
  30. Matsui D. Current issues in pediatric medication adherence. *Pediatr Drugs.* 2007;9(5):283–8.
  31. Chenou F, Hounkpe BW, Domingos I de F, Tonassé WV, Batista THC, Santana RM, et al. Effect of hydroxyurea therapy on intravascular hemolysis and endothelial dysfunction markers in sickle cell anemia patients. *Ann Hematol.* 2021;100(11):2669–76.
  32. Nourai M, Lee JS, Zhang Y, Kanas T, Zhao X, Xiong Z, et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica.* 2013;98(3):464–72.
  33. Beutler E, West C. Hematologic differences between African-Americans and whites: The roles of iron deficiency and  $\alpha$ -thalassemia on hemoglobin levels and mean corpuscular volume. *Blood.* 2005;106(2):740–5.
  34. Boyd AS, Neldner KH. Hydroxyurea therapy. *J Am Acad Dermatol.* 1991;25(3):518–24.
  35. Estep JH, Melloni C, Thornburg CD, Wiczling P, Rogers Z, Rothman JA, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of a liquid formulation of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *J Clin Pharmacol.* 2016 Mar;56(3):298–306.
  36. Kapoor S, Little JA, Pecker LH. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(12):1810–24.
  37. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary

- hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*. 2007;110(6):2166–72.
38. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: Incidence and risk factors. *Blood*. 1994;84(2):643–9. doi: 10.1182/blood.v84.2.643.643
  39. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors. *Blood*. 1998;91(1):288–94.
  40. Allali S, Maciel TT, Hermine O, De Montalembert M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica*. 2020;105(2):273–83.
  41. Benkerrou M, Delarche C, Brahim L, Fay M, Vilmer E, Elion J, et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2002;99(7):2297–303.
  42. Wongtong N, Jones S, Deng Y, Cai J, Ataga KI. Monocytosis is associated with hemolysis in sickle cell disease. *Hematology*. 2015;20(10):593–7.
  43. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(2–3):263–99.
  44. Hampson P, Dinsdale RJ, Wearn CM, Bamford AL, Bishop JRB, Hazeldine J, et al. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: A prospective observational cohort study. *Ann Surg*. 2017;265(6):1241–9.
  45. Ayres LS, Sgnaolin V, Munhoz TP. Immature granulocytes index as early marker of sepsis. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(3):392–6.
  46. Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood*. 2010;115(17):3447–52.
  47. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2013;41(3):820–32.
  48. Fernandes TAA de M, Medeiros TMD de, Alves JJP, Bezerra CM, Fernandes JV, Serafim ÉSS, et al. Socioeconomic and demographic characteristics of sickle cell disease patients from a low-income region of northeastern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(3):172–7.
  49. Lubeck D, Agodoa I, Bhakta N, Danese M, Pappu K, Howard R, et al. Estimated Life Expectancy and Income of Patients With Sickle Cell Disease Compared With Those Without Sickle Cell Disease. *JAMA Netw open*. 2019;2(11):e1915374.
  50. Tavares NUL, Bertoldi AD, Mengue SS, Arrais PSD, Luiza VL, Oliveira MA, et al. Factors associated with low adherence to medicine treatment for chronic diseases in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016;50(suppl 2):1–11.

**Table 1.** Clinical and sociodemographic characteristics of the 83 SCA patients treated with HU at HCPA.

General sample				
	Total count	Adherence		<i>p-value</i>
		High, n (%)	Low, n (%)	
Age (years)				
< 12	27	24 (88.9)	3 (11.1)	0.428
≥ 12	56	46 (82.1)	10 (17.9)	
Stratified age groups (years)				
<12	27	24 (88.9)	3 (11.1)	0.030*
12 – 18	11	6 (54.5)	5 (45.5)	
19 – 29	10	8 (80.0)	2 (20.0)	
30 – 39	20	17 (85.0)	3 (15.0)	
≥ 40	15	15 (100.0)	0 (0.0)	
Children (<12 years)				
Sex				
Male	15	14 (93.3)	1 (6.7)	0.430
Female	12	10 (83.3)	2 (16.7)	
Race/Ethnicity				
Black/Pardo	14	13 (92.9)	1 (7.1)	0.509
Caucasian	13	11 (84.6)	2 (15.4)	
Distance from hospital				
Same city	13	10 (76.9)	3 (12.0)	0.098
Other cities	14	14 (100.0)	0 (0.0)	
Side effects				
Yes	25	22 (88.0)	3 (12.0)	1.0
No	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
Polypharmacy				
Yes	11	10 (90.9)	1 (9.1)	0.599
No	12	10 (83.3)	2 (16.7)	
Adolescents and adults (≥12 years)				
Sex				
Male	25	22 (88.0)	3 (12.0)	0.320
Female	31	24 (77.4)	7 (22.6)	
Race/Ethnicity				
Black/Pardo	44	39 (88.6)	5 (11.4)	0.017*
Caucasian	12	7 (58.3)	5 (41.7)	
Distance from hospital				
Same city	22	16 (72.7)	6 (27.3)	0.150
Other cities	34	30 (88.2)	4 (11.8)	
Marital status				
Single	46	36 (78.3)	10 (21.7)	0.266
Married	8	8 (100.0)	0 (0.0)	
Divorced	2	2 (100.0)	0 (0.0)	

Education level				
Middle school (Incomplete/Complete)	31	24 (77.4)	7 (22.6)	0.351
High School or above (Incomplete/Complete)	24	21 (87.5)	3 (12.5)	
Side effects				
Yes	25	22 (88.0)	3 (12.0)	1.0
No	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
Polypharmacy				
Yes	11	10 (90.9)	1 (9.1)	0.599
No	12	10 (83.3)	2(16.7)	

HCPA, Clinical Hospital of Porto Alegre; SCA, sickle cell anemia.

Variables were calculated using Pearson's chi-square test.

\**p-value* <0.05

**Table 2.** Hematological parameters of the 27 with SCA in the Children Group

Parameter	Adherence category						p-value
	High			Low			
	n	Median	(IQR)	n	Median	(IQR)	
HbA ‡	24	4.5	(13.8)	3	0.4	(0.7)	0.649
HbA2	24	2.7	(2.2-3.1)	3	2.6	(1.8-3.2)	0.671
HbF%	24	18.9	(13.7-26.4)	3	20.9	(16.5-35.6)	0.512
HbSS	24	75.8	(66.9-81.2)	3	76.5	(61.4-80.3)	0.758
WBC	24	10.6	(8.1-14.3)	3	13.3	(6.9-17.4)	0.643
N%	24	42.4	(34.6-50.9)	3	47.4	(33.4-47.9)	0.817
N†	24	4.1	(3.1-6.6)	3	6.28	(2.29-8.35)	0.758
L%	24	41.1	(36.0-54.6)	3	37.74	(31.23-54.37)	0.589
L†	24	4.3	(2.9-6.1)	3	5.00	(3.73-5.44)	0.758
M%	24	8.2	(6.5-9.3)	3	6.79	(4.08-10.28)	0.487
M†	24	0.9	(0.6-1.2)	3	0.90	(0.28-1.79)	1.000
E%	24	2.7	(1.6-6.6)	3	7.73	(7.17-10.10)	0.064
E†	24	0.2	(0.2-0.7)	3	0.95	(0.53-1.76)	0.076
B%	24	0.5	(0.3-0.7)	3	0.46	(0.44-0.91)	0.589
B†§	24	0.06	(0.03-0.09)	3	0.080	(0.030-0.120)	0.535
RBC	24	2.6	(2.4-2.9)	3	2.06	(1.57-2.36)	0.017*
HGB	24	8.6	(7.8-9.2)	3	6.60	(6.40-7.40)	0.013*
Htc	24	24.1	(21.9-26.1)	3	18.20	(17.90-20.10)	0.009**
MCV	24	92.9	(82.3-99.9)	3	97.6	(77.1-114.0)	0.589
MCH	24	33.4	(28.2-36.5)	3	35.9	(27.1-42.0)	0.537
MCHC	24	35.6	(34.5-36.4)	3	36.8	(35.2-36.9)	0.334
RDW	24	17.2	(15.9-20.5)	3	18.2	(17.3-29.5)	0.280
PLT	24	380.5	(223.0-496.0)	3	402.0	(316.0-485.0)	0.589
MVP	22	9.8	(9.4-10.8)	3	9.8	(9.8-10.1)	0.867
IG%	24	0.3	(0.2-0.4)	3	0.3	(0.1-0.4)	0.937
IG†§	24	0.03	(0.02-0.05)	3	0.05	(0.01-0.05)	0.969
NRBC%	23	0.6	(0.0-1.4)	3	1.5	(1.1-3.7)	0.063
NRBC†	23	0.1	(0.0-0.2)	3	0.1	(0.1-0.7)	0.124
RET%	17	8.5	(5.9-10.3)	3	11.0	(9.4-12.6)	0.223
IRF	17	35.7	(27.9-40.1)	3	41.9	(32.7-51.5)	0.138
RET-He	17	35.5	(30.9-37.1)	3	39.5	(27.1-49.0)	0.368
PLT-F	23	378.0	(252.0-524.0)	3	427.0	(305.0-478.0)	0.748
IPF	22	1.5	(1.1-2.3)	3	1.6	(1.5-3.2)	0.314
IPF†	23	5.7	(3.5-7.5)	3	7.6	(4.6-13.7)	0.214
HU dose	23	22.2	(18.5-26.6)	3	25.1	(18.2-30.3)	0.446
Number of HU pills claimed	23	100.0	(100.0-200.0)	3	100.0	(100.0-300.0)	0.963
Days between medical appointments	24	112	(75-132)	3	126	(105-133)	0.536
HU pills/day	24	1.0	(1.0-1.0)	3	1.0	(1.0-2.0)	0.596
NLR	24	1.1	(0.6-1.4)	3	1.3	(0.6-1.5)	0.700

PLR	24	76.8 (53.2-106.2)	3	73.9 (63.2-130.0)	0.817
SII	24	320.3 (201.1-537.3)	3	396.90 (297.76-617.04)	0.396

B, basophil; E, eosinophils; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; HU, hydroxyurea; IG, immature granulocytes; IPF, immature platelet fraction; IQR, interquartile range; IRF, immature reticulocyte fraction; L, lymphocytes; LDH, lactate dehydrogenase; M, monocytes; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MVP, mean platelet volume; N, neutrophils; n, number of patients; NRBC, nucleated red blood cells; PLT: platelet count; PLT-I, platelet counts by impedance; PLT-F, platelet counts by fluorescence; RBC, red blood cells; RDW, red cell distribution width; RET, reticulocytes; RET-He, reticulocyte hemoglobin equivalent; WBC, white blood cell; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SCA, sickle cell anemia; SII, systemic inflammation index.

† Absolute count (cells/mm<sup>3</sup>)

% Differential count

‡ Parameter represented by mean (standard deviation - SD) due to median and IQR being zero.

§ Parameter with added decimal places.

Variables were calculated using Shapiro-Wilk normality test and Mann–Whitney U test.

\* *p-value* <0.05

\*\* *p-value* <0.01

**Table 3.** Hematological parameters of the 83 patients with SCA in the Adolescent/Adult Group.

Parameter	Adherence category						p-value
	High			Low			
	n	Median	(IQR)	n	Median	(IQR)	
HbA $\ddagger$	46	2.1	(9.6)	10	0.3	(1.0)	0.755
HbA2	46	2.9	(2.3-3.3)	10	3.1	(2.5-3.6)	0.362
HbF%	46	19.8	(12.2-27.3)	10	17.5	(12.4-22.9)	0.398
HbSS	46	75.6	(69.3-83.3)	10	79.8	(74.2-84.5)	0.252
WBC	46	7.4	(5.7-8.8)	10	11.1	(9.7-12.3)	0.001**
N%	45	44.9	(40.1-57.4)	10	48.3	(45.9-58.7)	0.275
N $\dagger$	45	3.1	(2.4-4.9)	10	5.8	(4.5-7.3)	0.006**
L%	45	42.9	(31.3-49.0)	10	32.6	(27.4-43.2)	0.077
L $\dagger$	45	2.7	(2.1-3.3)	10	3.3	(3.73-4.7)	0.042*
M%	45	8.7	(6.8-10.7)	10	10.1	(8.4-10.7)	0.222
M $\dagger$	45	0.6	(0.4-0.9)	10	1.0	(0.28-1.79)	0.002**
E%	45	1.4	(1.0-2.0)	10	2.1	(1.2-6.5)	0.064
E $\dagger$	45	0.1	(0.1-0.2)	10	0.2	(0.1-1.9)	0.101
B%	45	0.5	(0.3-0.7)	10	0.6	(0.5-0.7)	0.295
B $\dagger$ $\S$	45	0.04	(0.02-0.06)	10	0.06	(0.05-0.08)	0.006**
RBC	46	2.2	(1.9-2.6)	10	2.5	(2.2-3.6)	0.041*
HGB	46	8.7	(7.8-9.7)	10	8.9	(7.6-9.8)	0.797
Htc	46	23.8	(22.2-26.9)	10	24.8	(21.2-28.9)	0.684
MCV	46	106.1	(98.4-117.3)	10	92.7	(85.1-95.9)	0.002**
MCH	46	38.6	(35.6-43.3)	10	34.0	(28.5-34.7)	0.002**
MCHC	46	36.3	(35.4-37.1)	10	35.6	(35.1-35.9)	0.076
RDW	46	15.8	(15.2-17.5)	10	17.9	(17.6-20.9)	0.012*
PLT	46	319.5	(223.0-404.0)	10	430.5	(377.0-535.0)	0.022*
MVP	46	10.3	(9.7-10.9)	9	9.9	(9.8-10.3)	0.290
IG%	45	0.3	(0.2-0.4)	10	0.4	(0.3-0.6)	0.105
IG $\dagger$ $\S$	44	0.02	(0.01-0.04)	10	0.05	(0.03-0.07)	0.008**
NRBC%	46	3.7	(1.1-7.5)	10	1.3	(0.4-2.1)	0.072
NRBC $\dagger$	45	0.3	(0.1-0.5)	10	0.1	(0.1-0.2)	0.197
RET%	38	5.5	(4.5-8.8)	9	11.4	(10.7-15.3)	0.003**
IRF	38	33.8	(26.6-38.0)	9	31.2	(24.9-34.5)	0.508
RET-He	38	36.6	(33.5-40.7)	9	35.4	(29.0-37.0)	0.160
PLT-F	40	346.5	(255.0-395.0)	9	435.0	(348.0-508.0)	0.096
IPF	40	3.0	(1.9-4.4)	9	2.3	(1.8-3.6)	0.510
IPF $\dagger$	39	9.5	(6.6-12.9)	9	9.3	(7.8-14.6)	0.833
HU dose	41	21.5	(16.39-26.2)	8	25.0	(20.8-26.6)	0.180
Number of HU pills claimed	45	300.0	(200.0-400.0)	9	200.0	(200.0-400.0)	0.398
Days between medical appointments	46	147	(98-154)	5	87	(48-123)	0.386

HU pills/day	46	2.4 (2.0-3.0)	10	2.4 (2.0-3.0)	0.733
NLR	45	1.1 (0.8-1.9)	10	1.5 (1.1-2.1)	0.116
PLR	45	111.0 (77.4-158.9)	10	116.0 (94.7-151.9)	0.777
SII	45	341.8 (186.8-764.6)	10	747.1 (429.9-801.2)	0.042*

B, basophil; E, eosinophils; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; HU, hydroxyurea; IG, immature granulocytes; IPF, immature platelet fraction; IQR, interquartile range; IRF, immature reticulocyte fraction; L, lymphocytes; LDH, lactate dehydrogenase; M, monocytes; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MVP, mean platelet volume; N, neutrophils; n, number of patients; NRBC, nucleated red blood cells; PLT: platelet count; PLT-I, platelet counts by impedance; PLT-F, platelet counts by fluorescence; RBC, red blood cells; RDW, red cell distribution width; RET, reticulocytes; RET-He, reticulocyte hemoglobin equivalent; WBC, white blood cell; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SCA, sickle cell anemia; SII, systemic inflammation index.

† Absolute count (cells/mm<sup>3</sup>)

% Differential count

‡ Parameter represented by mean (standard deviation - SD) due to median and IQR being zero.

§ Parameter with added decimal places.

Variables were calculated using Shapiro-Wilk normality test and Mann–Whitney U test.

\* *p-value* <0.05

\*\* *p-value* <0.01

**Table 4.** Diagnostic measures of CBC parameters to adherence in SCA adolescent/adult patients (values  $\geq$  the cutoff of the parameters are predictors of low adherence).

Parameter	Sensibility	Especificity	PPV	NPV	Accuracy	<i>p-value</i>
WBC	80.0	87.0	57.1	95.2	85.7	0.001**
N†	80.0	71.1	38.1	94.1	72.7	0.006**
L†	100.0	44.4	28.6	100.0	54.5	0.042*
M†	70.0	84.4	50.0	92.7	81.8	0.002**
B†	100.0	46.7	29.4	100.0	56.4	0.007**
RBC	40.0	97.8	80.0	88.2	87.5	0.041*
RDW	80.0	78.3	44.4	94.7	78.6	0.012*
PLT	70.0	78.3	41.2	92.3	76.8	0.022*
IG†	70.0	75.0	38.9	91.7	74.1	0.009**
RET%	77.8	84.2	53.8	94.1	83.0	0.004**
MCV‡	80.0	80.4	47.1	94.9	80.4	0.002**
MCH‡	100.0	58.7	34.5	100.0	66.1	0.002**
SII	90.0	60.0	33.3	96.4	65.5	0.042*

The results are expressed as percentual (%). B†, absolute basophil count; CBC, complete blood count; IG†, absolute immature granulocyte count; L†, absolute lymphocyte count; M†, absolute monocyte count; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; N†, absolute neutrophil count; NPV, negative predictive value; PLT, platelet count; PPV, positive predictive value; RBC, red blood cells; RDW, red blood cells distribution width; RET, reticulocyte count; SCA, sickle cell anemia; SII, systemic inflammation index; WBC, white blood count.

† Absolute count (cells/mm<sup>3</sup>)

% Differential count

‡ Values  $\leq$  the cutoff are predictors of low adherence.

\**p-value* <0.05

\*\* *p-value* <0.01

**Table 5.** Relative risk of CBC and qualitative parameters to adherence in SCA Adolescent/Adult patients.

		Adherence				RR	IC95%	<i>p</i> -value
		High		Low				
		n	%	n	%			
Sex	Male	22	88.0	3	12.0	1		
	Female	24	77.4	7	22.6	1.88	(0.54 - 6.54)	0.320
Ethnicity	Black/Pardo	39	88.6	5	11.4	1		
	Caucasian	7	58.3	5	41.7	3.67	(1.27 - 10.61)	0.017*
Distance to hospital	Same city	16	72.7	6	27.3	1		
	Other cities	30	88.2	4	11.8	0.43	(0.14 - 1.36)	0.150
Marital status‡	Single	36	78.3	10	21.7			0.266
	Married	8	100.0	0	0.0			
	Divorced	2	100.0	0	0.0			
Educational level	Up to 12th Grade	24	77.4	7	22.6	1		
	High School or above	21	87.5	3	12.5	0.55	(0.16 - 1.92)	0.351
Adverse effects to HU	No	40	88.9	5	11.1	1		
	Yes	4	44.4	5	55.6	5.00	(1.82 - 13.76)	0.002**
Polypharmacy	Não	6	60.0	4	40.0	1		
	Sim	38	86.4	6	13.6	0.34	(0.12 - 0.99)	0.047*
WBC	< 9.62	40	95.2	2	4.8	1		
	≥ 9.62	6	42.9	8	57.1	12.0	(2.88 - 49.97)	0.001**
N†	< 4.46	32	94.1	2	5.9	1		
	≥ 4.46	13	61.9	8	38.1	6.48	(1.52 - 27.63)	0.012*
L† ‡	< 2.55	20	100.0	0	0.0			0.009**
	≥ 2.55	25	71.4	10	28.6			0.012*
M†	< 0.94	38	92.7	3	7.3	1		
	≥ 0.94	7	50.0	7	50.0	6.83	(2.04 - 22.89)	0.002**
B† ‡	< 0.035	21	100.0	0	0.0			0.009**
	≥ 0.035	24	70.6	10	29.4			0.002**
RBC	< 3.18	45	88.2	6	11.8	1		
	≥ 3.18	1	20.0	4	80.0	6.80	(285 - 16.23)	0.000**
RDW	< 17.55	36	94.7	2	5.3	1		
	≥ 17.55	10	55.6	8	44.4	8.44	(1.99 - 35.80)	0.004**
PLT	< 412	36	90.0	4	10.0	1		
	≥ 412	10	62.5	6	37.5	3.75	(1.22 - 11.54)	0.021*
IG	< 0.035	33	91.7	3	8.3	1		
	≥ 0.035	11	61.1	7	38.9	4.67	(1.37 - 15.94)	0.014*
RET	< 10.64	32	94.1	2	5.9	1		
	≥ 10.64	6	46.2	7	53.8	9.15	(2.18 - 38.47)	0.003**
SII	< 394.41	27	96.4	1	36	1	(1.27 - 68.77)	

	≥ 394.41	18	66.7	9	33.3	9.33		0.028*
VCM	> 96.7	37	94.9	2	5.1	1		
	≤ 96.7	9	52.9	8	47.1	9.18	(2.17 - 38.77)	0.003**
HCM ‡	> 37.6	27	100.0	0	0.0			0.001**
	≤ 37.6	19	65.5	10	34.5			0.003**

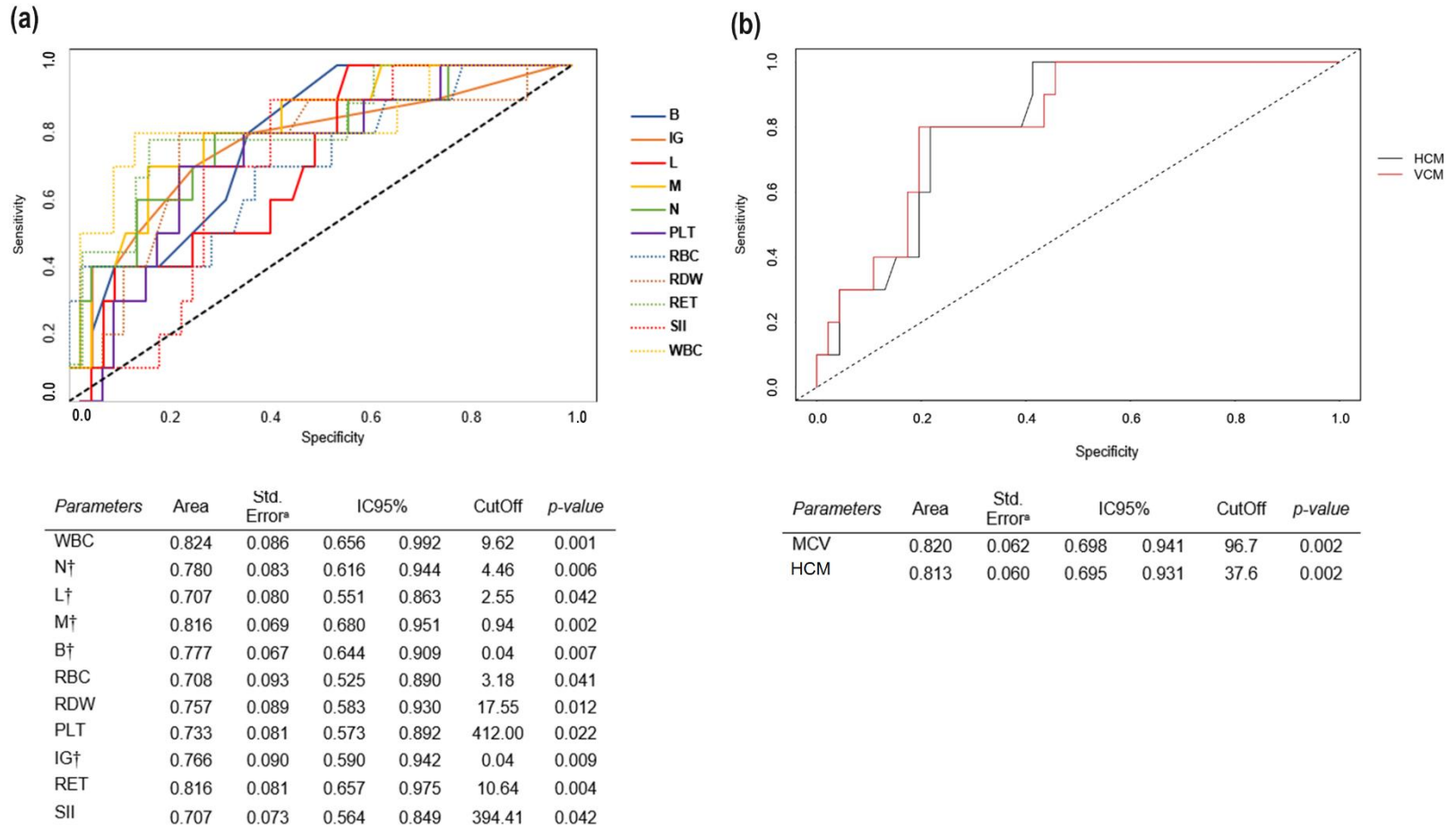
B†, absolute basophil count; CBC, complete blood count; HU, hydroxyurea IG†, absolute immature granulocyte count; L†, absolute lymphocyte count; M†, absolute monocyte count; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; N†, absolute neutrophil count; NPV, negative predictive value; PLT, platelet count; PPV, positive predictive value; RBC, red blood cells; RDW, red blood cells distribution width; RET, reticulocyte count; RR, relative risk; SCA, sickle cell anemia; SII, systemic inflammation index; WBC, white blood count.

‡ Significant association with low adherence, but it is not possible to calculate the RR.

\**p-value* <0.05

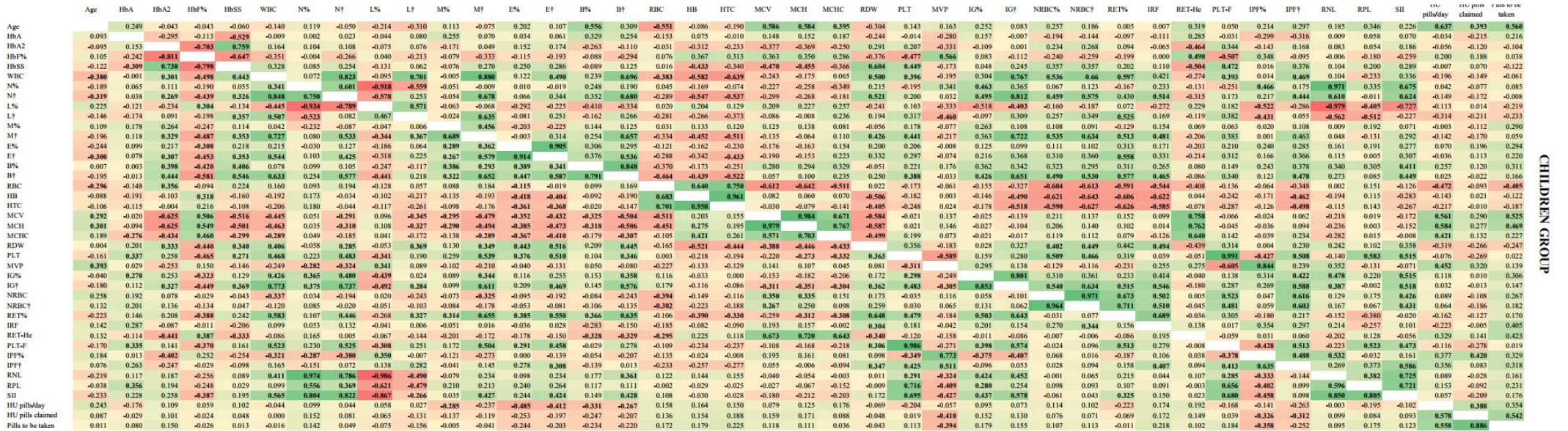
\*\* *p-value* <0.01

**Fig 1 – ROC curve CBC parameters to adherence in SCA Adolescent/Adult patients.**



B†, absolute basophil count; CBC, complete blood count; IG†, absolute immature granulocyte count; L†, absolute lymphocyte count; M†, absolute monocyte count; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; N†, absolute neutrophil count; PLT, platelet count; RBC, red blood cells; RDW, red blood cells distribution width; RET, reticulocyte count; SCA, sickle cell anemia; SII, systemic inflammation index; WBC, white blood count.

Supplementary Fig. 1 - Correlation heatmap between parameters



CHILDREN GROUP

B, basophil; E, eosinophils; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; HU, hydroxyurea; IG, immature granulocytes; IPF, immature platelet fraction; IQR, interquartile range; IRF, immature reticulocyte fraction; L, lymphocytes; LDH, lactate dehydrogenase; M, monocytes; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MVP, mean platelet volume; N, neutrophils; n, number of patients; NRBC, nucleated red blood cells; PLT: platelet count; PLT-I, platelet counts by impedance; PLT-F, platelet counts by fluorescence; RBC, red blood cells; RDW, red cell distribution width; RET, reticulocytes; RET-He, reticulocyte hemoglobin equivalent; WBC, white blood cell; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR, platelet-to-lymphocyte ratio; SII, systemic inflammation index.

† Absolute count (cells/mm<sup>3</sup>)  
 % Differential count  
 Correlations in bold showed statistical significance

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação da anemia falciforme em seu estágio inicial, assim como o monitoramento apropriado são essenciais para um melhor resultado terapêutico. A Hemoglobina fetal (HbF) e o Volume Corpuscular Médio (VCM) são os parâmetros utilizados atualmente para avaliar a adesão ao tratamento com hidroxiureia (HU), ambos se elevando com tratamento contínuo.

Contudo, dado o tempo de vida inferior do eritrócito falciforme na circulação, pode-se passar várias semanas para que esses biomarcadores reflitam as mudanças de adesão dos pacientes. Isso pode impactar nas decisões clínicas tomadas acerca de mudanças no tratamento e até mesmo na dosagem do medicamento, pois torna-se difícil diferenciar entre a ineficácia do tratamento e a baixa adesão.

Isso indica a necessidade de parâmetros que forneçam informações precoces sobre o estado do paciente. Este estudo procurou verificar a possível utilidade clínica dos Parâmetros Avançados do Hemograma (PCAs) como medida de adesão ao tratamento com hidroxiureia em uma população pediátrica e adolescente/adulta de indivíduos com anemia falciforme.

A partir dos nossos resultados, a contagem absoluta de Granulócitos Imaturos (IG#) mostrou significativa diferença entre pacientes com alta e baixa adesão pertencentes ao grupo adolescentes/adultos. A presença de granulócitos imaturos no sangue periférico de indivíduos pode indicar um estímulo à medula óssea, como uma resposta à infecção ou inflamação. Irregularidades na continuidade do tratamento com HU podem estimular a medula óssea e enfatizar a natureza inflamatória da doença, promovendo o recrutamento dos granulócitos imaturos para a circulação. Adicionalmente, seu tempo de vida relativamente curto na circulação confere a eles uma vantagem sobre os parâmetros tradicionalmente usados, auxiliando na detecção precoce da baixa adesão.

Como evidência dos efeitos inflamatórios promovidos pelo uso intermitente de HU, os pacientes adolescentes/adultos não aderentes também apresentaram um índice de inflamação sistêmica (IIS) significativamente maior. Esse achado pode indicar um estado inflamatório crônico que pode levar a crises vaso-oclusivas e outras complicações.

Os PCAs estão disponíveis em uma variedade de analisadores hematológicos e podem ser facilmente incorporados a rotinas laboratoriais. Ao serem inseridos no

acompanhamento dos pacientes, esses parâmetros podem ser indicativos precoces de não adesão ao tratamento se utilizados em conjunto com os parâmetros já estabelecidos (HbF e VCM).

O uso correto da HU conduz à estabilidade do paciente, diminuindo a frequência de crises agudas e internações hospitalares, melhorando a qualidade de vida desses indivíduos e atenuando o custo do tratamento. O baixo nível socioeconômico e de escolaridade dos pacientes falcêmicos pode afetar diretamente sua adesão, conduzindo-os a um pior prognóstico. Portanto, encoraja-se a continuidade de estudos que possam expandir e aprofundar o uso dos PCAs na anemia falciforme, assim como o desenvolvimento de projetos de extensão que englobem essa população.

## 8. ANEXOS

### Anexo A – Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do CAAE: 80997817.7.0000.5327

Título do Projeto: Avaliação dos parâmetros avançados do hemograma em pacientes com Anemia Falciforme

Você ou o paciente pelo qual você é responsável está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar alguns parâmetros novos do exame de hemograma, que podem fornecer informações adicionais, com o intuito de prever a ocorrência de crises associadas à anemia falciforme. Na hematologia, o hemograma é um exame amplamente utilizado na avaliação dos pacientes. A solicitação dos parâmetros clínicos avançados no exame de hemograma pode fornecer informações mais detalhadas sobre o quadro clínico dos pacientes.

Esta pesquisa está sendo realizada no ambulatório de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em parceria com a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes:

Na requisição para a realização do exame de hemograma de rotina, o médico assistente também solicitará a avaliação de alguns parâmetros novos que serão estudados na pesquisa. Não serão necessárias coletas de sangue adicionais, além daquelas previstas para a realização do hemograma de rotina. Este procedimento de solicitar parâmetros a mais no exame de hemograma será realizado nas três próximas consultas de rotina e os dados obtidos serão analisados pela equipe de pesquisa. Para analisar adequadamente os dados obtidos no exame, também será necessário realizar uma consulta ao prontuário eletrônico para buscar informações relacionadas à doença falciforme (evolução clínica, ocorrência de vasculopatias, uso de hidroxiuréia e outros medicamentos) e informações como sexo e idade. Por isso, solicitamos a sua autorização para realizar este acesso.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, exceto a possibilidade de quebra da confidencialidade dos dados. Os pesquisadores tomarão o cuidado para que isto não ocorra, utilizando sempre um código para identificação dos participantes. Este estudo será apenas de revisão de registros em prontuários e análise de resultados de exames, não havendo nenhuma interferência no tratamento clínico, que será o mesmo independentemente de você concordar ou não com a participação na pesquisa.

A participação nesta pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes neste momento. Contudo, os dados gerados através desta pesquisa poderão auxiliar futuros pacientes e até mesmo o próprio participante, se for comprovada a eficácia destes novos parâmetros em prever crises da doença. Os médicos poderão agir com antecedência, minimizando os danos causados pelas crises.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 1 de 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação nesta pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Dra. Laura Fogliatto, pelo telefone (51) 3359-6335, ou com o pesquisador Gueverson Rocha, pelo telefone (51) 3359-6335 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359-7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante (e seu responsável) e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável (Se aplicável)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha imparcial (Se aplicável)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 2 de 2

## Anexo B – Parecer de aprovação do comitê de ética do HCPA

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos parâmetros avançados do hemograma em pacientes com Anemia Falciforme

**Pesquisador:** Laura Maria Fogliatto

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 80997817.7.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.474.953

**Apresentação do Projeto:**

Estudo vinculado a Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA, a pesquisadora responsável no HCPA é co-orientadora. A doença falciforme está dispersa na população de forma heterogênea, com prevalência mais alta nos estados com maior concentração de afro descendentes. No Brasil, a maior prevalência encontra-se na população baiana. O processo vaso-oclusivo decorrente da falcização eritrocitária acontece quando os produtos resultantes do stress ocasionado pela doença entram na corrente sanguínea: os reticulócitos jovens, flexíveis e maleáveis, que carregam em sua estrutura moléculas de adesão e também agregados de banda, causados pela oxidação da HbS. Estes reticulócitos fixam-se às paredes do endotélio e das vênulas pós-capilares, reduzindo o fluxo sanguíneo. Por fim, os eritrócitos falcizados, densos e não deformáveis, se agregam aos reticulócitos que já se encontravam aderidos à parede do vaso, ocasionando uma obstrução estável e, conseqüentemente, danos isquêmicos aos diversos tecidos. Os parâmetros clínicos avançados (PCAs) representam um upgrade da automação no hemograma, fornecendo informações detalhadas sobre alguns aspectos clínicos, ou seja, constituem um passo a mais nas possibilidades diagnósticas, podendo reduzir o tempo para a definição terapêutica. A tecnologia beneficia paciente, e pela agilidade, auxilia os médicos indicando o tipo de abordagem diante de diferentes situações. Isso impacta na redução dos custos hospitalares e laboratoriais. Os PCAs incluem os seguintes parâmetros: IPF – Fração de plaquetas imaturas, IRF – Fração de Reticulócitos Imaturos, NRBC – Eritrócitos Nucleados, RET - He – Conteúdo de Hemoglobina nos

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903

**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.474.953

Reticulócitos, IG – Granulócitos Imaturos e PLT-F – Plaquetas Fluorescentes. Estes parâmetros podem ser importantes auxiliares na rotina laboratorial, ajudando no diagnóstico diferencial de algumas condições clínicas e na otimização da requisição de testes adicionais, o que pode significar economia de tempo e dinheiro, com benefício para o paciente que terá a conduta terapêutica aplicada em menor espaço de tempo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo geral:

Avaliar o poder preditor dos PCAs (IPF, IRF, IG, RET-He, NRBC e PLT-F) no desenvolvimento de eventos vaso-oclusivos e vasculopatias na anemia falciforme.

Objetivos específicos

- Correlacionar os PCAs (IPF, PLT-F, IRF, IG, RET-He e NRBC) em pacientes com anemia falciforme com a ocorrência de eventos vaso oclusivos e vasculopatias (crise algica, hipertensão pulmonar, isquemia cerebral);
- Comparar o desempenho dos PCAs na anemia falciforme;
- Avaliar o comportamento dos PCAs (IPF, PLT-F, IRF, IG, RET-He e NRBC) em pacientes falcêmicos com piora clínica aguda;
- Comparar os PCAs de pacientes com adesão farmacológica à hidroxiureia, com os dados de pacientes com má adesão, no que diz respeito à predição da ocorrência de fenômenos vaso-oclusivos e vasculopatias.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Possíveis Riscos: Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, exceto a possibilidade de quebra da confidencialidade dos dados. Os pesquisadores tomarão o cuidado para que isto não ocorra, utilizando sempre um código para identificação dos participantes. Este estudo será apenas de revisão de registros em prontuários e análise de resultados de exames, não havendo nenhuma interferência no tratamento clínico, que será o mesmo independentemente de você concordar ou não com a participação na pesquisa.

Possíveis Benefícios: A participação nesta pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes neste momento. Contudo, os dados gerados através desta pesquisa poderão auxiliar futuros pacientes e até mesmo o próprio participante, se for comprovada a eficácia destes novos parâmetros em prever crises da doença. Os médicos poderão agir com antecedência, minimizando os danos causados pelas crises.

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.474.953

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Delimitação: Estudo de coorte, prospectivo.

Acompanhamento: Os pacientes serão acompanhados durante o período de um ano, sendo que, as consultas no HCPA ocorrem a cada três meses. Serão realizados três hemogramas, com espaçamento de 3 meses entre eles. As características clínicas descritas nos prontuários, bem como, sinais e sintomas vasculocclusivos presentes serão correlacionados com os resultados obtidos no hemograma e com os parâmetros que se busca avaliar, realizados na data vigente.

Critérios de inclusão, exclusão e amostragem: Serão critérios para inclusão no estudo, todos os pacientes com diagnóstico de anemia falciforme que são acompanhados no Serviço Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de março de 2018 a março de 2019. Serão excluídos deste estudo pacientes que não possuírem hemograma com os parâmetros que se busca investigar. Atualmente o ambulatório de Hemoglobinopatias do HCPA está atendendo, regularmente, cerca de 120 pacientes com doença falciforme. Incluir-se-ão pacientes ambos os sexos, independentemente da idade.

Processamento das amostras: As amostras serão analisadas no Laboratório de Análises Clínicas do HCPA. Serão realizados hemogramas assistenciais e será incluso os PCAs como exames de pesquisa, os quais estão descritos no orçamento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto, formulário de delegações de função e TCLE adequados.

**Recomendações:**

Nada a recomendar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.453.409 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas, nova versão de projeto e de TCLE adicionadas em 16/01/2018. Não apresenta novas pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (versão do projeto de 16/01/2018, TCLE de 16/01/2018 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.474.953

metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 97 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) Para que possa ser realizado, o projeto deve estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.
- c) O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.
- d) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- e) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- f) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1050876.pdf	16/01/2018 17:25:17		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_resposta_CEP.doc	16/01/2018 17:24:34	GUEVERSON LEONARDO GONCALVES ROCHA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Resposta_CEP.PDF	16/01/2018 17:23:50	GUEVERSON LEONARDO GONCALVES ROCHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_REVISADO.docx	16/01/2018 17:22:45	GUEVERSON LEONARDO GONCALVES	Aceito

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.474.953

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_REVISADO.docx	16/01/2018 17:22:45	ROCHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado.doc	16/01/2018 17:21:33	GUEVERSON LEONARDO GONCALVES ROCHA	Aceito
Orçamento	Orcamento.xlsx	11/12/2017 16:36:34	Laura Maria Fogliatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Delegacao_atividades_HCPA.PDF	11/12/2017 16:20:02	Laura Maria Fogliatto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_editavel.docx	11/12/2017 16:19:46	Laura Maria Fogliatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_amstras_HCPA.PDF	11/12/2017 16:19:33	Laura Maria Fogliatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCUD.PDF	11/12/2017 16:19:23	Laura Maria Fogliatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	11/12/2017 16:19:12	Laura Maria Fogliatto	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	11/12/2017 16:19:01	Laura Maria Fogliatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Submissao_inicial_e_declaracoes_editavel.docx	11/12/2017 16:18:47	Laura Maria Fogliatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Submissao_inicial_e_declaracoes.pdf	11/12/2017 16:18:35	Laura Maria Fogliatto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.PDF	11/12/2017 16:18:19	Laura Maria Fogliatto	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.474.953

PORTO ALEGRE, 26 de Janeiro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Marcia Mocellin Raymundo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F  
**Bairro:** Santa Cecilia **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

## Anexo C – Aprovação da Comissão de Pesquisa da UFCSPA (ComPesq)

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**UFCSPA**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE  
COMISSÃO DE PESQUISA**Atestado**

Atestamos que o projeto de pesquisa intitulado *“Avaliação dos parâmetros avançados do hemograma em pacientes com anemia falciforme”* está registrado na Comissão de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre com o número 024/2018, sob responsabilidade de Liane Nanci Rotta.

Salientamos que este registro **não autoriza o pesquisador a coletar ou analisar dados oriundos de sujeitos de pesquisa.**

Salientamos ainda que este registro **não garante a concessão de recursos financeiros por parte da UFCSPA a este projeto de pesquisa.**

Porto Alegre, 27 de março de 2018.

**Pedro Dal Lago**  
Coordenador de Pesquisa  
UFCSPA

Anexo D – Aprovação do projeto pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CARTA DE APROVAÇÃO

**Projeto:** 170654

**Data da Versão do Projeto:** 16/01/2018

**Pesquisadores:**

LAURA MARIA FOGLIATTO

GUEVERSON LEONARDO CONGALVES ROCHA

**Título:** Avaliação dos parâmetros avançados do hemograma em pacientes com Anemia Falciforme

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 09 de abril de 2018

Prof. Patricia Ashton Prolla  
Coordenadora GPPG/HCPA

## Anexo E – Author guidelines do periódico *European Journal of Haematology*

### Author Guidelines

#### Contents

- [1. Submission](#)
- [2. Aims and Scope](#)
- [3. Manuscript Categories and Requirements](#)
- [4. Preparing Your Submission](#)
- [5. Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
- [6. Author Licensing](#)
- [7. Publication Process After Acceptance](#)
- [8. Post Publication](#)
- [9. Editorial Office Contact Details](#)

#### 1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal <https://submission.wiley.com/journal/ejh>. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at anytime by logging on to [submission.wiley.com](https://submission.wiley.com) and clicking the “My Submissions” button. For technical help with the submission system, please review our FAQs or contact [submissionhelp@wiley.com](mailto:submissionhelp@wiley.com).

#### Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

#### Preprint policy

This journal will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of a manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact: [eur-j-haematology@wiley.com](mailto:eur-j-haematology@wiley.com)

#### 2. AIMS AND SCOPE

*European Journal of Haematology* is an international journal for communication of basic and clinical research in haematology. The journal welcomes manuscripts on molecular, cellular and clinical research on diseases of the blood, vascular and lymphatic tissue, and on basic molecular and cellular research related to normal development and function of the blood, vascular and lymphatic tissue. The journal also welcomes reviews on clinical haematology and basic research, case reports, and clinical pictures.

#### 3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

When submitting your paper, please provide a novelty statement concerning your presented findings using the questions below. Please include this on the title page of your manuscript. Upon acceptance, they will be presented within the article.

1. What is the new aspect of your work?
2. What is the central finding of your work?
3. What is (or could be) the specific clinical relevance of your work?

#### **MANUSCRIPT TYPES**

*European Journal of Haematology* accepts the following manuscript types:

##### **Original Articles**

Manuscripts containing original research from all fields in haematology are considered for publication. It is understood that neither the article nor any of its essential parts has been or will be published elsewhere, with the exemption of presentations at scientific meetings. For organization of the manuscript see below. Manuscripts must not exceed 4,000 words excluding abstract, references, tables, figures and legends. A maximum of 50 references is allowed. A maximum of six figures or tables is allowed. Additional figures/tables must be clearly marked as supplemental and will be published as such only electronically.

Please include the following information in the title page of your manuscript:

1. What is the NEW aspect of your work? (ONE sentence)
2. What is the CENTRAL finding of your work? (ONE sentence)
3. What is (or could be) the SPECIFIC clinical relevance of your work? (ONE sentence)

##### **Review Articles**

Review articles on recent developments or history of haematology may be solicited by the Editor-in-Chief. Suggestions are welcomed in the form of a one-page synopsis. Review articles must be exhaustive and should include appropriate reference to the literature. Review articles will go through the usual peer-review process before a final decision regarding publication is made. Manuscripts must not exceed 6,000 words excluding abstract, references, tables, figures and legends. A maximum of 80 references is allowed.

##### **Letters to the Editor**

*European Journal of Haematology* welcomes critical or ancillary comments to manuscripts published in the journal. These should be addressed to the Editor-in-Chief, indicating that they are regarded as a "letter to the editor" and not as an original article. They may contain one table or figure and should not be more than 500 words. The editor reserves the right to edit the letters for clarity. A title must accompany the letter. *If you wish to submit a response to a published letter please select the category 'Response'.*

##### **Case Reports**

*European Journal of Haematology* accepts a very limited number of case reports. These must provide fundamental new information on a relevant topic. Sole descriptions of unusual or rare clinical cases without a clear impact for future research are not sufficient to be published in this category. Reports must be instructive and contain a critical review of the literature related to the presented case. Case reports must not exceed 1,000 words excluding references, tables, figures and legends. A maximum of 2 tables or figures and 5 references is allowed.

##### **Clinical Pictures**

As of 01.03.2015 this manuscript category will be closed and no submissions accepted.

#### 4. PREPARING YOUR SUBMISSION

##### Cover Letters

A covering letter must be included, signed by the corresponding author and stating on behalf of all the authors that the work has not been published and is not being considered for publication elsewhere.

##### Submission format

Submissions via the new Research Exchange portal can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) or LaTeX (.tex) formats.

If submitting your manuscript file in LaTeX format via Research Exchange, select the file designation "Main Document – LaTeX .tex File" on upload. When submitting a Latex Main Document, you must also provide a PDF version of the manuscript for Peer Review. Please upload this file as "Main Document - LaTeX PDF." All supporting files that are referred to in the Latex Main Document should be uploaded as a "LaTeX Supplementary File."

Cover Letters and Conflict of Interest statements may be provided as separate files, included in the manuscript, or provided as free text in the submission system. A statement of funding (including grant numbers, if applicable) should be included in the "Acknowledgements" section of your manuscript.

##### Title page

The title page should contain an informative title, author(s)'s names and their affiliations. Name, address, telephone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author. If the title exceeds 40 characters (letters and spaces) a running title of no more than 40 characters must be supplied. The following information is also required on the title:

- Abstract word count
- Manuscript word count
- Number of references
- Number of figures and tables
- Number of supplemental illustrations/tables

##### Authorship

On initial submission, the submitting author will be prompted to provide the email address and country for all contributing authors.

##### Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

##### *Conflict of Interest Statement*

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

##### Abstract and Keywords

The abstract must not exceed 200 words and should be arranged in a structured fashion (to include objectives, methods, results and conclusions.) It should state the purpose of the study, basic procedures (study subject /patients/animals and methods), main findings (specific data and statistical significance), and principal conclusions. Below the abstract, provide 3-10 key words that will assist indexers in cross-indexing the article. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

### Main body of text

- As papers are single-blind peer reviewed, the main text file should not include any information that might identify the authors.
- The journal uses British/US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.
- Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

### Methods and Materials

If a method or tool is introduced in the study, including software, questionnaires, and scales, the author should state the license this is available under and any requirement for permission for use. If an existing method or tool is used in the research, the authors are responsible for checking the license and obtaining the permission. If permission was required, a statement confirming permission should be included in the Methods and Materials section.

### References

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals (in parentheses). All references cited, and only these, must be listed at the end of the paper. References should be according to the style used in Index Medicus and the International List of Periodical Title Word Abbreviations (ISO 833). All authors must be listed.

Examples:

#### Standard journal articles

1. International Steering Committee. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1997; 336: 309.
2. Cieutat AM, Lobel P, August JT, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N, Bainton DF. Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker. *Blood* 1998; 91: 1044-1058.

#### Chapter in a book

3. Philips DJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1995: 465-478.

#### Proceedings

4. Rausch C, Murgatroyd PW, Schnickelheim Z, eds. *Cerebral glucose utilization testing*. New York: Medical Press, 1989:141-149.

### Endnotes

Endnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep endnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper.

### Footnotes

Footnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep footnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper and should not include references.

### Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

**Figure Legends**

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

**Figures**

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

**Color figures.**

Figures submitted in color will be reproduced in color free of charge. Authors are encouraged to consider the accessibility of their figures to readers with color-blindness or other visual impairments. If greyscale or monochrome figures are not possible, authors should consider limiting the use of color and avoid palettes that cause difficulty for readers with colour-blindness, such as green/red. It is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white' however, where greyscale or monochrome figures are not possible, authors should consider limiting the use of colour and avoid palettes that cause difficulty for readers with color-blindness, such as green/red.

**Data Citation**

In recognition of the significance of data as an output of research effort, Wiley has endorsed the [FORCE11 Data Citation Principles](#) and is implementing a mandatory data citation policy. Wiley journals require data to be cited in the same way as article, book, and web citations and authors are required to include data citations as part of their reference list.

Data citation is appropriate for data held within institutional, subject focused, or more general data repositories. It is not intended to take the place of community standards such as in-line citation of GenBank accession codes.

When citing or making claims based on data, authors must refer to the data at the relevant place in the manuscript text and in addition provide a formal citation in the reference list. We recommend the format proposed by the [Joint Declaration of Data Citation Principles](#):

[dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)

**Additional Files****Appendices**

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

**Supporting Information**

Supporting information is information that is not essential to the article but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

[Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

**General Style Points**

The following points provide general advice on formatting and style.

- Abbreviations: In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly, and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- Units of measurement: Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.
- Numbers: numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- Trade Names: Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

### Wiley Author Resources

**Manuscript Preparation Tips:** Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, we encourage authors to consult Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

### Article Preparation Support

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

## 5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

### Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determine that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on confidentiality of the review process is available [here](#).

**Guidelines on Publishing and Research Ethics in Journal Articles** Please review Wiley's policies surrounding human studies, animal studies, clinical trial registration, biosecurity, and research reporting guidelines [here](#).

### Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

### Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see <http://varnomen.hgvs.org/>, where examples of acceptable nomenclature are provided.

**Nucleotide sequence data** can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ) [www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp)
- EMBL Nucleotide Archive: [ebi.ac.uk/ena](http://ebi.ac.uk/ena)
- GenBank [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

**Proteins sequence data** should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): [pir.georgetown.edu](http://pir.georgetown.edu)
- SWISS-PROT: [expasy.ch/sprot/sprot-top](http://expasy.ch/sprot/sprot-top)

### **Conflict of Interest**

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

### **Funding**

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <http://www.crossref.org/fundingdata/registry.html>

### **Authorship**

The journal follows the [ICMJE definition of authorship](#), which indicates that authorship be based on the following 4 criteria:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he or she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged. These authorship criteria are intended to reserve the status of authorship for those who deserve credit and can take responsibility for the work. The criteria are not intended for use as a means to disqualify colleagues from authorship who otherwise meet authorship criteria by denying them the opportunity to meet criterion #s 2 or 3. Therefore, all individuals who meet the first criterion should have the opportunity to participate in the review, drafting, and final approval of the manuscript.

### **Data Sharing and Data Accessibility**

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

### **Data Citation**

Please also cite the data you have shared, like you would cite other sources that your article refers to, in your references section. You should follow the format for your data citations laid out in the Joint Declaration of Data Citation Principles, <https://www.force11.org/datacitationprinciples>:

[dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)

**Human subject information in databases.** The journal refers to the [World Health Medical Association Declaration of Taipei on Ethical Considerations Regarding Health Databases and Biobanks](#).

#### **Publication Ethics**

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

#### **ORCID**

As part of our commitment to supporting authors at every step of the publishing process, *Cytopathology* requires the submitting author (only) to provide an ORCID ID when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. [Find more information](#).

### **6. AUTHOR LICENSING**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please [click here](#).)

**Self-Archiving definitions and policies.** Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click [here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

**Open Access fees:** If you choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

**Funder Open Access:** Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

### **7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE**

#### **Accepted article received in production**

When your accepted article is received by Wiley's production team, you (corresponding author) will receive an email asking you to login or register with [Author Services](#). You will be asked to sign a publication license at this point.

#### **Accepted Articles**

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After publication of the final version article (the article of record), the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is correct for indexing. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

**Proofs**

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any copyediting or typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No special software is required, all common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email. Return of proofs via e-mail is possible in the event that the online system cannot be used or accessed.

**Publication Charges****Accepted Articles**

This journal offers rapid publication via Wiley's Accepted Articles Service. Accepted Articles are published on Wiley Online Library within 5 days of receipt, without waiting for a copyright agreement (they are protected under a general copyright statement).

**Early View** The journal offers rapid publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Before we can publish an article, we require a signed license (authors should login or register with Wiley Author Services). Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

**Citing this Article: eLocators**

This journal now uses eLocators. eLocators are unique identifiers for an article that service the same function page numbers have traditionally served in the print world. When citing this article, please insert the eLocator in place of the page number. For more information, please visit the Author Services eLocator page [here](#).

**8. POST PUBLICATION****Access and sharing**

When your article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- For non-open access articles, the corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

**Promoting the Article**

Find out how to do that [here](#).

**Article Promotion Support**

[Wiley Editing Services](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

**Measuring the Impact of your Work**

Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

**Archiving Services**

Portico and CLOCKSS are digital archiving/preservation services we use to ensure that Wiley content will be accessible to customers in the event of a catastrophic event such as Wiley going out of business or the platform not being accessible for a significant period of time. Member libraries participating in these services will be able to access content after such an event. Wiley has licenses with both Portico and CLOCKSS, and all journal content gets delivered to both services as it is published on Wiley Online Library. Depending on their integration mechanisms, and volume loads, there is always a delay between content being delivered and showing as "preserved" in these products.

**9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS**

For queries about submissions, please contact: [eur-j-haematology@wiley.com](mailto:eur-j-haematology@wiley.com)