

**RONALDO BORBA**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do aluno **Ronaldo Borba**.

Campinas, 31 de janeiro de 2002.

  
Prof.ª Dra. Helena Zerlotti W. Grotto  
Orientadora

***O RETICULÓCITO E SEUS PARÂMETROS DURANTE O USO  
DE HIDROXIURÉIA EM PACIENTES COM SÍNDROMES  
FALCIFORMES.***

***AValiação DA SÍNTESE DE HEMOGLOBINA FETAL E  
SUA CORRELAÇÃO COM OS PARÂMETROS  
RETICULOCITÁRIOS.***

**CAMPINAS**

**2002**

*i*

UNICAMP

**RONALDO BORBA**

***O RETICULÓCITO E SEUS PARÂMETROS DURANTE O USO  
DE HIDROXIURÉIA EM PACIENTES COM SÍNDROMES  
FALCIFORMES.***

***AValiação DA SÍNTESE DE HEMOGLOBINA FETAL E  
SUA CORRELAÇÃO COM OS PARÂMETROS  
RETICULOCITÁRIOS.***

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Médicas, área de Ciências  
Biomédicas.

***ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> HELENA ZERLOTTI WOLF GROTTO***

***CO-ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> CARMEN SILVIA PASSOS LIMA***

**CAMPINAS**

**2002**

UNIDADE 30  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
B644r  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 50523  
PROC 16.837/02  
C \_\_\_\_\_ D1 \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 22/08/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00172342-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

BIB ID 252375

B644r

**Borba, Ronaldo**

O reticulócito e seus parâmetros durante o uso de hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes. Avaliação da síntese de hemoglobina fetal e sua correlação com os parâmetros reticulocitários. / Ronaldo Borba. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

**Orientador : Helena Zerlotti Wolf Grotto, Carmem Silvia Passos Lima**

**Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.**

**1. Hidroxiuréia. 2. Hemoglobina fetal. 3. Anemia falciforme. I. Helena Zerlotti Wolf Grotto. II. Carmem Silvia Passos Lima. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.**

---

## **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Zerlotti Wolf Grotto**

---

---

### **Membros:**

---

**1. Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro**

---

**2. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati**

---

**3. Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto**

---

**Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 31/01/2002**

---

2003364

## ***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais Benedito e Clarice a quem  
muito devo, aos meus irmãos Marco e  
Marcelo, e à toda família que sempre me  
incentiva*

***AGRADECIMENTO ESPECIAL***

*À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Helena  
Zerlotti Wolf Grotto pelo constante apoio  
incentivo e muita dedicação na orientação  
deste trabalho*

## *AGRADECIMENTOS*

---

À Profª Drª Carmen Silvia Passos Lima pela contribuição na co-orientação deste trabalho.

À Profª Drª Maria de Fátima Sonati e à Profª Drª Sandra Fátima Menosi Gualandro, pelas precisas observações, sugestões e correções dos manuscritos.

À Elza M Kimura e à Fernanda G Pereira pelo precioso auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Patologia Clínica, especialmente aos do setor de Hematologia, pelo grande apoio, amizade e colaboração.

À Cleide Aparecida Moreira Silva da Comissão de Pesquisa Estatística por ter repartido comigo os seus conhecimentos com dedicação e paciência.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, pelo estímulo à pesquisa, através do apoio financeiro.

À FAEP-UNICAMP (nº 0303/01) e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos e companheiros do curso de pós-graduação por tornarem esta etapa da minha vida muito mais agradável e prazerosa.

À todos que direta ou indiretamente compartilharam comigo seus conhecimentos e experiências, desvendando dúvidas na busca do saber, para a concretização desta investigação.

	<b>PÁG</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xi</i>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1.Considerações gerais.....	14
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3.CASUÍSTICA</b> .....	27
3.1.Grupos de estudo.....	28
3.2.Critérios de inclusão de pacientes no estudo.....	28
3.3.Exames laboratoriais prévios ao tratamento.....	28
3.4.Esquema de tratamento com HU.....	29
3.5.Efeitos colaterais.....	29
3.6.Controle da terapêutica e da toxicidade.....	29
3.7.Critérios e manejo da toxicidade.....	30
3.8.Avaliação da eficácia do tratamento.....	30
3.9.Critérios de exclusão de pacientes.....	30
<b>4.METODOLOGIA</b> .....	31
4.1.Diagnóstico das hemoglobinopatias.....	32
4.2.Quantificação dos reticulócitos e seus parâmetros.....	32
4.3.Avaliação da produção de Hb F.....	32
4.4.Identificação das células F.....	33
4.5.Estatística.....	34



<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1.Análise descritiva/comparativ.....	36
5.2.Análise das correlações.....	37
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7.CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>8.SUMMARY.....</b>	<b>54</b>
<b>9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>10.APÊNDICE.....</b>	<b>64</b>

	<i>PÁG</i>
<b>TABELA 1:</b> Dados hematológicos em pacientes com síndromes falciformes.....	38
<b>TABELA 2:</b> Coeficientes de Correlação de Spearman entre as variáveis estudadas.....	39

	<i>PÁG</i>
<b>FIGURA 1:</b> Organização dos agrupamentos gênicos (Hoffbrand & Pettit 2001)..	14
<b>FIGURA 2:</b> Locais de síntese das cadeias globínicas no embrião, no feto e no adulto (Hoffbrand & Pettit 2001).....	15
<b>FIGURA 3:</b> Boxplots relacionados às porcentagens de células F em pacientes com síndromes falciformes.....	40
<b>FIGURA 4:</b> Número de hemácias e células F obtida pelo citômetro de fluxo FACS Calibur usando Ac anti-hemoglobina fetal humana conjugada a FITC (HbF FITC). A: paciente com síndrome falciforme durante tratamento mostrando hemácias que não contém HbF (M1) e contendo 65% HbF (M2) e B: paciente com síndrome falciforme que não recebeu HU mostrando hemácias que não contém HbF (M1) e hemácias contendo 16% HbF (M2).....	41
<b>FIGURA 5:</b> Boxplots relacionados à Hb F/cel F em pacientes com síndromes falciformes.....	42
<b>FIGURA 6:</b> Boxplots relacionados ao índice médio de fluorescência (MFI) # em pacientes com síndromes falciformes.....	43
<b>FIGURA 7:</b> Correlação entre as porcentagens de Hb F e cels F nos dois grupos de pacientes estudados (com HU: $r=0.7582$ e sem HU: $r=0.9342$ )....	44



***RESUMO***

A hemoglobina Fetal (HbF) é um inibidor eficaz da polimerização da HbS. A hidroxiuréia (HU) é usada para aumentar a síntese de HbF e melhorar a evolução clínica de pacientes com síndromes falciformes. Foram estudados uma série de parâmetros laboratoriais relativos à produção de HbF e à resposta dos reticulócitos (RTC), e foram comparados os dados entre 2 grupos: 13 pacientes com síndromes falciformes tratados com HU e 33 pacientes com síndromes falciformes sem tratamento. No grupo tratado com HU, os resultados mostraram uma maior concentração de Hb, no volume corpuscular médio (VCM), na hemoglobina corpuscular média (HCM), no volume corpuscular médio dos RTC (VCMr), na concentração de HbF, na porcentagem de células F e na quantidade de Hb F/célula F. O número de RTC, o índice médio de fluorescência (MFI) e o número de neutrófilos foram significativamente menores em pacientes usando HU. Houve uma correlação significativa entre o VCMr e os níveis de HbF e entre o VCMr e as células F em pacientes tomando HU. A concentração de HbF/célula F foi significativamente maior em pacientes tratados com HU, mas este aumento aparentemente é independente da produção de células F. Esses dados demonstram que os parâmetros reticulocitários fornecidos por analisadores hematológicos de última geração, podem ser úteis para acompanhar as mudanças eritropoiéticas em pacientes usando HU e, permitem uma melhor compreensão de como essa terapia induz o aumento da produção de HbF e celsF nos pacientes com síndromes falciformes.



## ***1. INTRODUÇÃO***

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A síntese das cadeias da molécula de hemoglobina (Hb) é codificada por grupos de genes localizados em 2 cromossomos: no cromossomo 16 (braço curto, 16p 13.3) estão as seqüências de genes responsáveis pela síntese das cadeias  $\zeta$  e  $\alpha$  e no cromossomo 11 (braço curto, 11p 15.5) os genes das globinas  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\beta$ . Na vida embrionária a combinação dessas cadeias dá origem às hemoglobinas Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ). Ao redor da 12<sup>a</sup> semana de gestação inicia-se a produção de Hb fetal (Hb F), constituída de 2 cadeias  $\alpha$  e 2 cadeias  $\gamma$  que vai predominar durante todo o período fetal. No 3<sup>o</sup> trimestre da gravidez ocorre a gradativa substituição da síntese das cadeias  $\gamma$  pelas cadeias  $\beta$ , iniciando assim a produção de Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) que, após o nascimento é acompanhada de pequenas quantidades de Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) e Hb F (Figuras 1 e 2) (Hoffbrand & Pettit 1995; Olivieri & Weatherall 1998). As proporções de cada Hb são as seguintes:

- |                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| - ao nascimento: 70-80% Hb F | - aos 6 meses: > 95% Hb A |
| 2-3% Hb A <sub>2</sub>       | 2-3% Hb A <sub>2</sub>    |
| 15-25% Hb A                  | 0-2% Hb F                 |

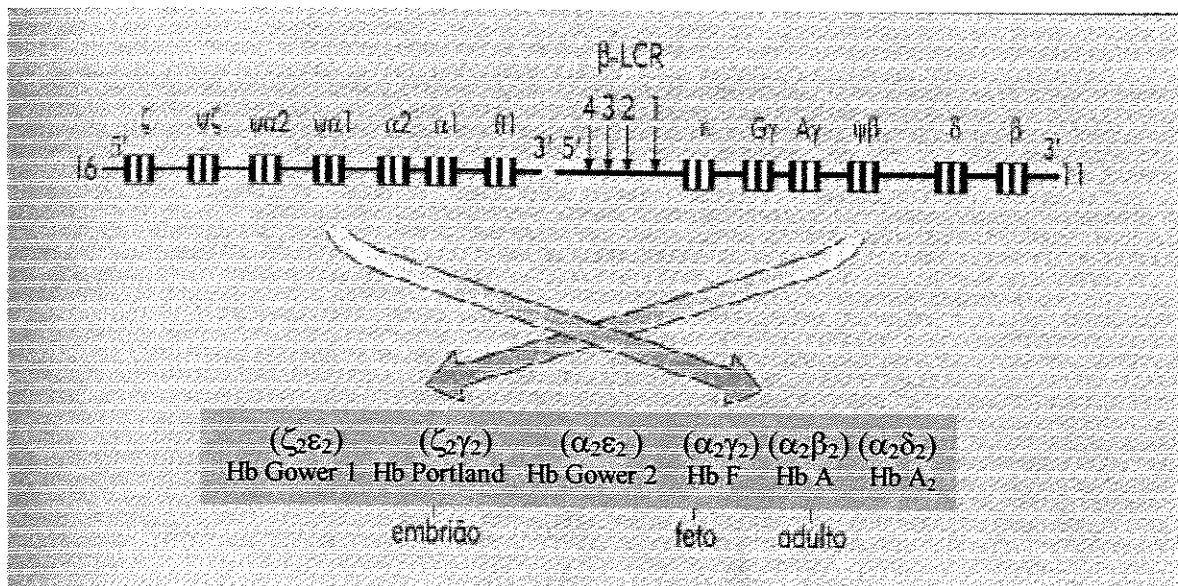
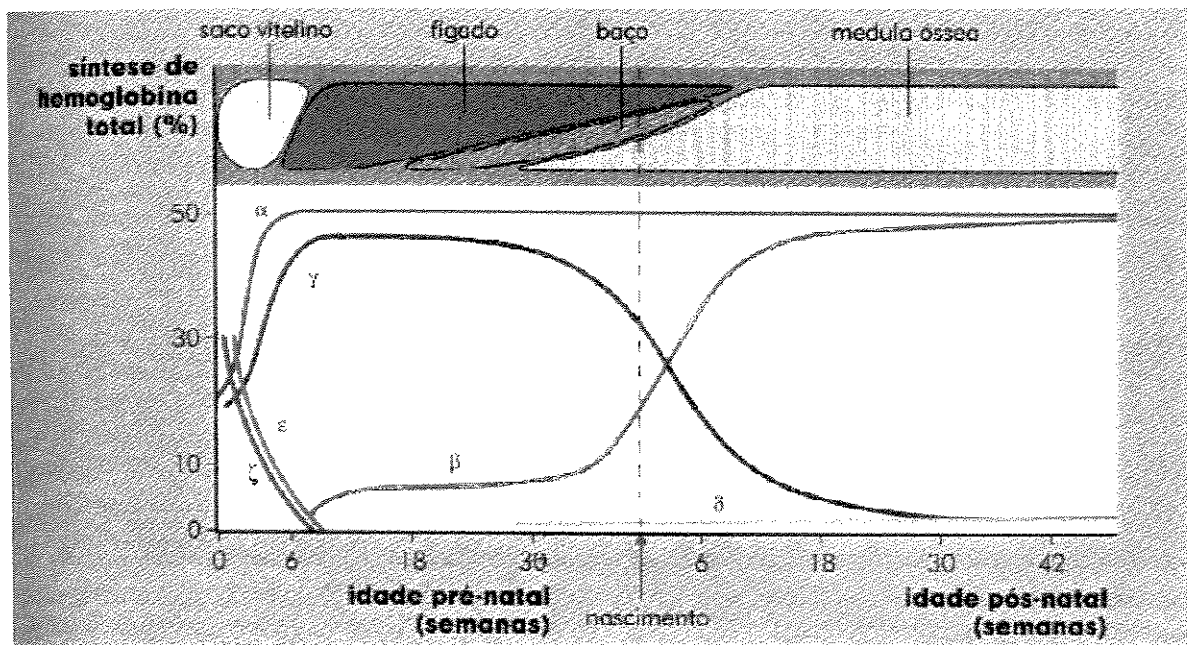


Figura 1: Organização dos agrupamentos gênicos (Hoffbrand & Pettit 2001).



**Figura 2:** Locais de síntese das cadeias globínicas no embrião, no feto e no adulto (Hoffbrand & Pettit 2001).

A existência da Hb F foi aventada por Korber em 1866 que, analisando hemolisados de recém-nascidos, observou que estes hemolisados eram resistentes à desnaturação em pH alcalino, sugerindo que algumas células continham uma hemoglobina com uma estrutura diferente. Esta hipótese foi fortalecida em 1949 por Jope, que observou que a hemoglobina do recém-nascido apresentava uma maior absorvância que a do adulto. Em 1957, Pauling e col., através da análise do N-terminal das cadeias globínicas, sugeriram que a Hb F era um tetrâmero com 2 subunidades em comum com a hemoglobina A, que seriam as 2 cadeias  $\alpha$  e outras 2 subunidades com uma estrutura diferente, o que eles chamaram de cadeias não- $\alpha$ . Essas subunidades diferentes correspondiam às cadeias  $\gamma$ , que assim como as cadeias  $\beta$ , continham 146 resíduos, diferindo em 39 deles, de acordo com estudos de Schroeder e col., em 1963. Concluiu-se então, que a Hb F era composta por 2 cadeias  $\alpha$  e 2 cadeias  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Em 1968, Shroeder e col. relataram existir uma heterogeneidade na sequência das cadeias  $\gamma$ , resultante de dois tipos de cadeia  $\gamma$ , de acordo com o aminoácido presente na posição 136: a  $\gamma^G$  (glicina), e a  $\gamma^A$  (alanina).



Na vida fetal, a proporção é de 75% de cadeias  $\gamma^G$  para 25% de cadeias  $\gamma^A$ . Após o nascimento temos 40% de cadeias  $\gamma^G$  para 60% de cadeias  $\gamma^A$  (Bunn & Forget 1986).

Os mecanismos envolvidos nas substituições das diferentes cadeias de globina durante o desenvolvimento embrionário não estão totalmente elucidados. É sabido que o estado de metilação dos genes está envolvido (genes expressos tendem a ser hipometilados e os não-expressos hipermetilados). Outros fatores, como o estado de condensação dos cromossomos e a participação de seqüências promotoras determinam se um gene será ou não transcrito (Hoffbrand & Pettit 1995; Olivieri e Weatherall 1998). Em algumas situações, a síntese de cadeias  $\gamma$  pode persistir na vida adulta, como na Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF), onde deleções gênicas ou mutações de ponto na região promotora dos genes  $\gamma$  ativam os genes ou impedem que mecanismos repressores atuem na inibição dos mesmos (Grosveld e col 1993; Wood 1993; Olivieri & Weatherall 1998).

Em condições de expansão eritróide aguda, pós-quimioterapia, pós-transplante de medula óssea, ou em certas doenças malignas como na leucemia mielóide crônica juvenil, pode haver uma reativação da síntese de cadeias  $\gamma$  e aumento da produção de células F (cels F) e, conseqüentemente, a detecção de níveis elevados de Hb F (Olivieri & Weatherall 1998; Weatherall 2001).

As Síndromes Falciformes (SF) compreendem um grupo de doenças hereditárias que têm, como característica comum, a presença de hemácias em forma de foice. Isso acontece devido à presença da hemoglobina S (Hb S), um tipo anômalo de Hb, proveniente da substituição de uma única base no codon 6 do gene da globina beta, onde uma adenina (A) é substituída por uma timina (T) (GAG→GTG), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina (Beutler 2001). Esta substituição ocorre na superfície da molécula, alterando sua carga, já que o ácido glutâmico é carregado negativamente e a valina tem carga neutra. Como resultado, a Hb S tem sua mobilidade eletroforética mais lenta do que a Hb A em direção ao pólo positivo quando em pH alcalino (Douglas & Frederick 1995; Ramalho 1986). As moléculas de Hb S, na sua forma desoxigenada, têm uma forte tendência a polimerizarem, formando múltiplos microtúbulos

de moléculas de Hb. Esta polimerização, e a conseqüente formação de fibras, converte a Hb de um líquido de fluxo livre em um gel viscoso e termina por conduzir a uma distorção das hemácias, que adquirem um formato falciforme (Rodgers 1997).

O afoiçamento da hemácia é primeiramente um fenômeno reversível, ou seja, com a oxigenação a Hb S retorna ao estado despolimerizado. Então, com episódios repetidos de oxigenação e desoxigenação, as lesões de membrana se acumulam e a célula se torna irreversivelmente falcizada (CIF). Essas lesões determinam perda de água por parte da hemácia, com aumento da concentração intracelular de Hb S e, conseqüentemente, aumento da tendência à falciformação (Costa 2001). Alguns estudos mostram, no entanto, que as CIF permanecem deformadas mesmo na ausência de polimerização intracelular de Hb S (Hellerstein & Bunthrarungroj 1974). Existe também, um excessivo acúmulo de cálcio nessas células, além de alterações da sua permeabilidade a íons (Costa 2001). De acordo com Eaton e col.(1979), as CIF resultam de seqüestros prolongados em áreas de baixa tensão de oxigênio.

A Hb S ocorre com maior prevalência na população africana, onde a freqüência dos heterozigotos pode chegar a 40%, dependendo da região (Serjeant 1992). Entre os negros americanos, a freqüência do traço falciforme é de cerca de 7,8% (Beutler 2001).

No Brasil, a distribuição das alterações hereditárias da hemoglobina é heterogênea, sendo que nas populações negróides das regiões Sul e Sudeste, a freqüência estimada de heterozigotos da Hb S é de 6,6% (Ramalho & Beilguelman 1977; Salzano 1979).

A associação entre a Hb S e outras hemoglobinopatias também é relativamente comum. Assim, a Hb S pode se combinar com a Hb C, um outro tipo de alteração estrutural resultante da substituição do ácido glutâmico pela lisina na mesma posição 6 da cadeia  $\beta$  (Beutler 2001). A hemoglobinopatia SC ocupa o segundo lugar dentre as síndromes falcêmicas mais frequentes em nosso meio, perdendo apenas para a anemia falciforme (SS). As manifestações clínicas na hemoglobinopatia SC são menos graves do que no tipo SS. Como a hemólise é menos intensa nos indivíduos SC, o hematócrito, e, portanto, a viscosidade sangüínea, tendem a ser maiores do que na anemia falciforme.

Daí a predominância de certas complicações que estão relacionadas com a viscosidade sangüínea, como a necrose asséptica da cabeça do fêmur, hemorragias na retina, episódios pulmonares agudos e hematúria nos pacientes SC (Winslow & Anderson 1978). A freqüência de portadores de Hb C em negros americanos é de 2,3% (Beutler 2001). Em negróides das regiões Sul e Sudeste do Brasil, os heterozigotos da Hb C representam 1% da população (Ramalho 1986).

A interação entre a Hb S e a talassemia  $\beta$ , hemoglobinopatia oriunda de um defeito na síntese da cadeia  $\beta$ , é encontrada em algumas partes da África e na população mediterrânea, especialmente Grécia e Itália (Beutler 2001). No Brasil, devido à grande miscigenação entre descendentes negróides e italianos, a interação entre a Hb S e a talassemia  $\beta$  é bastante freqüente (Zago & Costa 1985).

As manifestações clínicas nas SF variam dependendo da composição da Hb. Entre as interações existentes, as principais são: SS,  $S\beta^0$  talassemia, SC e  $S\beta^+$  talassemia (Beutler 2001).

Pacientes com anemia falciforme apresentam períodos sem manifestações clínicas, com anemia moderada e níveis de Hb ao redor de 8g/dl, considerados como “fase estável” da doença, que pode ser interrompida por manifestações agudas.

Essas manifestações podem ser classificadas em 4 tipos principais:

1<sup>o</sup>) crise de seqüestração: relacionada com um repentino acúmulo maciço de hemácias e o rápido aumento do baço, resultando em choque hipovolêmico, e é responsável pela maioria das mortes nos primeiros anos de vida; 2<sup>o</sup>) crises vaso-oclusivas: resultam em dores abdominais, de ossos ou articulações, acompanhadas por febre, que são devidas à oclusão dos pequenos vasos sangüíneos por massas de células falciformes, levando à hipóxia e posterior necrose tecidual; 3<sup>o</sup>) crises aplásticas: geralmente estão associadas à infecções e podem ser acompanhadas de necrose medular. A falência medular pode também resultar da deficiência de ácido fólico, especialmente durante a gravidez, e é designada como crise megaloblástica; 4<sup>o</sup>) crises hemolíticas: que são caracterizadas por um aumento do grau de hemólise, com conseqüente diminuição da concentração de Hb e

reticulocitose, usualmente acompanhando uma crise dolorosa (Hoffbrand & Pettit 1995; Bunn 1997; Beutler 2001). Existem ainda complicações importantes que devam ser consideradas nas SF.

As principais são:

Complicações Cardíacas: as manifestações cardíacas são em geral relacionadas à circulação hiperdinâmica secundária aos mecanismos compensatórios da anemia. Os raios X de tórax mostram cardiomegalia global mesmo em pacientes jovens. Também são observadas artérias pulmonares proeminentes e aumento no padrão vascular pulmonar;

Complicações Pulmonares: as alterações pulmonares nas SF são provocadas pelos fenômenos vaso-oclusivos e infecções. Frequentemente ambas as manifestações ocorrem simultaneamente. O episódio agudo é denominado síndrome torácica aguda (STA) e é caracterizado por dor torácica, febre, hipóxia, dispnéia, infiltrado nos raios X de tórax e queda no nível de hemoglobina;

Complicações Neurológicas: no sistema nervoso, ao contrário de outras regiões, vasos maiores parecem ser os locais preferencialmente acometidos por vaso-oclusão. As complicações neurológicas são graves e podem ser fatais em até 15% dos casos;

Complicações Hepatobiliares: a excreção contínua e elevada de bilirrubinas provenientes das hemácias hemolisadas tem como consequência a formação de cálculos biliares. Embora tenham sido relatados cálculos em crianças de três ou quatro anos de idade, essa complicação é comum em pacientes adultos. A colecistectomia é reservada para pacientes que apresentam sintomas significativos (dois ou três episódios de dor no período de seis meses). As alterações na função hepática podem ser relacionadas à falcização intra-hepática, infecções adquiridas na transfusão ou hemossiderose transfusional (Costa 2001).

O tratamento das SF direciona-se para a tentativa de impedir a falcização. São descritos alguns mecanismos que poderiam interferir no processo de falcização e assim, promover uma melhor evolução clínica dos pacientes:

A) Inibição química da polimerização da Hb S: o desenvolvimento de um inibidor seguro e efetivo da polimerização da Hb S constitui um desafio para os pesquisadores. O agente ideal seria facilmente absorvido na passagem pelo trato gastrointestinal, circularia no plasma sem ligar-se firmemente às proteínas plasmáticas, facilmente penetraria na membrana dos eritrócitos, e se ligaria firmemente e especificamente à Hb S, de maneira a inibir a polimerização (Bunn 1997).

B) Redução da concentração da Hb eritrocitária (CHCM): devido à velocidade de polimerização da Hb S ser dependente da concentração intracelular de desoxi Hb S, um tratamento capaz de diminuir a CHCM teria um efeito clínico bastante benéfico (Rosa e col. 1980).

C) Indução farmacológica da síntese da Hb F: a presença de Hb F nas hemácias de pacientes com anemia falciforme protege a célula do processo de falcização, possibilitando uma melhor evolução clínica dos pacientes (Beutler 2001). A evidência bioquímica que a Hb F é um inibidor potente da polimerização da desoxi Hb S é amplamente sustentada por estudos feitos em vários grupos de pacientes com SF. Existem 2 observações clínicas que levaram à hipótese de que a Hb F poderia inibir a polimerização da desoxi Hb S: - em recém-nascidos com SF as manifestações apareciam à medida em que diminuía a concentração de Hb F; - adultos com dupla heterozigose (HbS-PHfF) (75% Hb S, 25% Hb F, 100% cels F), eram assintomáticos (Dover & Charache 1992).

O aumento da Hb F nas hemácias interfere no processo de falcização porque mantém uma maior saturação do oxigênio intracelular, além de diluir a concentração intracelular de Hb S. A formação de tetrâmeros “híbridos” de cadeias de globina  $\gamma$  e  $\beta^S$  bloqueia a polimerização da Hb S desoxigenada e, conseqüentemente, reduz o fenômeno de falcização. Não só o nível de Hb F deve ser considerado, mas também a distribuição da Hb F nas células eritróides. Assim, para um determinado nível de Hb F, sua eficiência clínica e biológica é maior, quanto maior o número de cels F (Marcus e col. 1997). Desse modo, a determinação da concentração de Hb F e do número de cels F no sangue periférico podem ser de valor prognóstico nas hemoglobinopatias e podem auxiliar na avaliação dos efeitos biológicos da estimulação da produção de Hb F com drogas como a hidroxiuréia.

A hidroxiuréia (HU) é atualmente a droga mais utilizada para estimular a produção da Hb F em pacientes com SF. Trata-se de um análogo da uréia, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de DNA. Exerce efeito letal sobre as células na fase S, inibindo a enzima ribonucleotídeo-redutase (enzima que converte ribonucleotídeo difosfato em desoxirribonucleotídeo), resultando na depleção do “pool” de desoxirribonucleotídeo trifosfato (Steinberg e col. 1997).

Células de pacientes com SF tratados com HU apresentam hemácias menos densas, quantidades menores de CIF e maior flexibilidade, sugerindo que fatores que induzem a desidratação de eritrócitos falcizados possam ser bloqueados pela terapia com HU (Goldberg e col. 1990).

Dover & Charache (1992) acompanharam 2 pacientes em tratamento com HU durante 7 anos. Na primeira metade do tratamento os pacientes receberam doses intercaladas da droga. Na segunda metade, os pacientes receberam doses de HU diariamente e, ao final dos 7 anos, foram observadas mudanças significativas nos parâmetros hemoglobínicos dos 2 pacientes. As porcentagens de Hb F e cels F, as concentrações de Hb F/cel F e hemoglobina corpuscular média (HCM) foram maiores do que os valores obtidos no período pré-tratamento.

Miller e col. (2001) apresentaram um estudo onde avaliaram a resposta clínica e laboratorial de pacientes pediátricos com doença SC grave em terapia com HU. Observaram uma diminuição significativa na concentração de leucócitos e também dos neutrófilos. O volume corpuscular médio das hemácias (VCM) aumentou significativamente após a terapia. Este estudo também mostrou um aumento significativo na porcentagem de Hb F e cels F sem alterar, no entanto, a concentração de Hb, a contagem de reticulócitos (RTC) e a medida da bilirrubina total. Através da terapia com HU, todos os pacientes tiveram um número menor de eventos vaso-oclusivos e também de menor gravidade. Os dias de internação diminuíram de uma média de 7,5 dias por ano antes da terapia para 0 dias por ano durante a terapia. Observaram também que não ocorreram episódios de STA durante o tratamento com HU.

O mecanismo pelo qual a HU aumenta a produção de Hb F em pacientes com SF ainda não é muito bem entendido. Alguns estudos propõem 2 mecanismos possíveis. O primeiro sugere que a HU é citotóxica para precursores eritróides mais tardios (Veith e col. 1984). Esta citotoxicidade seletiva induz ao recrutamento de precursores eritróides precoces, com demonstrada capacidade para produzir Hb F “in vitro”. O papel da citotoxicidade na produção de Hb F foi reforçado por observações em que níveis máximos de Hb F foram obtidos com doses de HU próximas à mielotoxicidade (Dover & Charache 1992). Outros estudos, entretanto, mostraram que a indução rápida e máxima da produção de Hb F pode ser obtida sem efeitos tóxicos associados, sugerindo que a HU pode agir diretamente nos progenitores eritróides tardios, reprogramando-os à produzir mais Hb F. Os autores sugerem que uma perturbação no ciclo celular poderia alterar a expressão gênica e, talvez, deleções reversíveis na divisão celular conduziriam ao acúmulo de proteínas instáveis. Estas proteínas poderiam agir como substâncias trans-funcionais que modulariam a expressão diferencial do gene da globina (Dover e col. 1986).

O segundo mecanismo possível seria através da ação de fatores reguladores da expressão do gene da globina. Estudos experimentais mostraram que fatores transcricionais podem ligar-se seletivamente às regiões promotoras ou às regiões de “enhancer” ao redor dos genes  $\gamma$ , resultando na produção de Hb F e Hb A (cels F), ou próximo aos genes da  $\beta$  globina, resultante somente na produção de Hb A e a ausência da produção de Hb F (células não-F). A competição entre as regiões promotoras e “enhancer” pelo mesmo fator de transcrição pode explicar porque, quando a Hb F está presente em células adultas, a Hb A está reciprocamente diminuída (Dover & Boyer 1987). Drogas citotóxicas como a HU, interferem na síntese de DNA e, conseqüentemente, na modulação dos fatores transcricionais, agindo diretamente nos progenitores eritróides, reprogramando-os à produzir Hb F (Dover & Boyer 1987; Dover & Charache 1992).

Xu & Zimmer (1998) estudando os efeitos da HU e butirato sobre os níveis de RNAm das cadeias  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  em células K562, observaram que com ambas as drogas há um aumento seletivo da expressão de  $\gamma^G$ , fenômeno que é também observado no desenvolvimento humano, onde aproximadamente 70% da Hb F total no feto é do tipo  $\gamma^G$ .

A administração da HU faz com que possa haver melhora clínica dos pacientes, o que pode ser comprovado através da análise de alguns parâmetros laboratoriais, tais como:

- aumento do VCM;
- uma pequena diminuição na CHCM;
- um aumento na concentração da Hb F;
- um aumento na concentração da Hb total;
- uma diminuição no número absoluto de RTC (Rodgers 1997).

A redução do número de RTC foi evidenciada por Steinberg e col. (1997) estudando pacientes com hemoglobinopatia SC em uso de HU. Os autores evidenciaram uma diminuição na proporção de RTC com alta intensidade de coloração, representantes da fração mais imatura dos RTC. Avaliando a relação entre a Hb contida nas hemácias maduras e a Hb dos RTC (rbcHb/retHb), constataram uma elevação nesse índice, sugerido como evidência indireta do prolongamento da sobrevivência das hemácias. Todos esses valores seriam provenientes de uma diminuição de hemólise e, conseqüente, diminuição da expansão eritróide aguda. Curiosamente não houve aumento significativo das concentrações de Hb F. Questiona-se, então, qual seria o mecanismo envolvido na redução da hemólise proporcionada pela HU. Os autores sugerem que a redução na densidade das células diminuiria a polimerização da Hb S. Além disso, a queda no número dos RTC de “stress” levaria a uma menor interação das hemácias com o endotélio, já que esses RTC expressam ligantes que facilitam a adesão.

A maturação típica dos RTC ocorre em torno de 3,5 a 4 dias, ainda na medula óssea. Nas 24 horas seguintes o RTC permanece na circulação onde se transforma em hemácia madura. Os RTC de “stress” são aqueles produzidos em condições de atividade eritropoiética aumentada. Eles contêm mais RNA residual do que RTC normais e se coram mais intensamente pelos corantes vitais habituais. Macro-RTC produzidos durante a expansão eritróide repentina são também caracterizados pela co-expressão de Hb A e Hb F



(denominados de RTC F). Em estados de rápida expansão medular, a maturação acelerada de precursores eritróides precoces originam células que ainda preservam a capacidade de expressão da globina primitiva (Blau e col. 1993; Brugnara 1998).

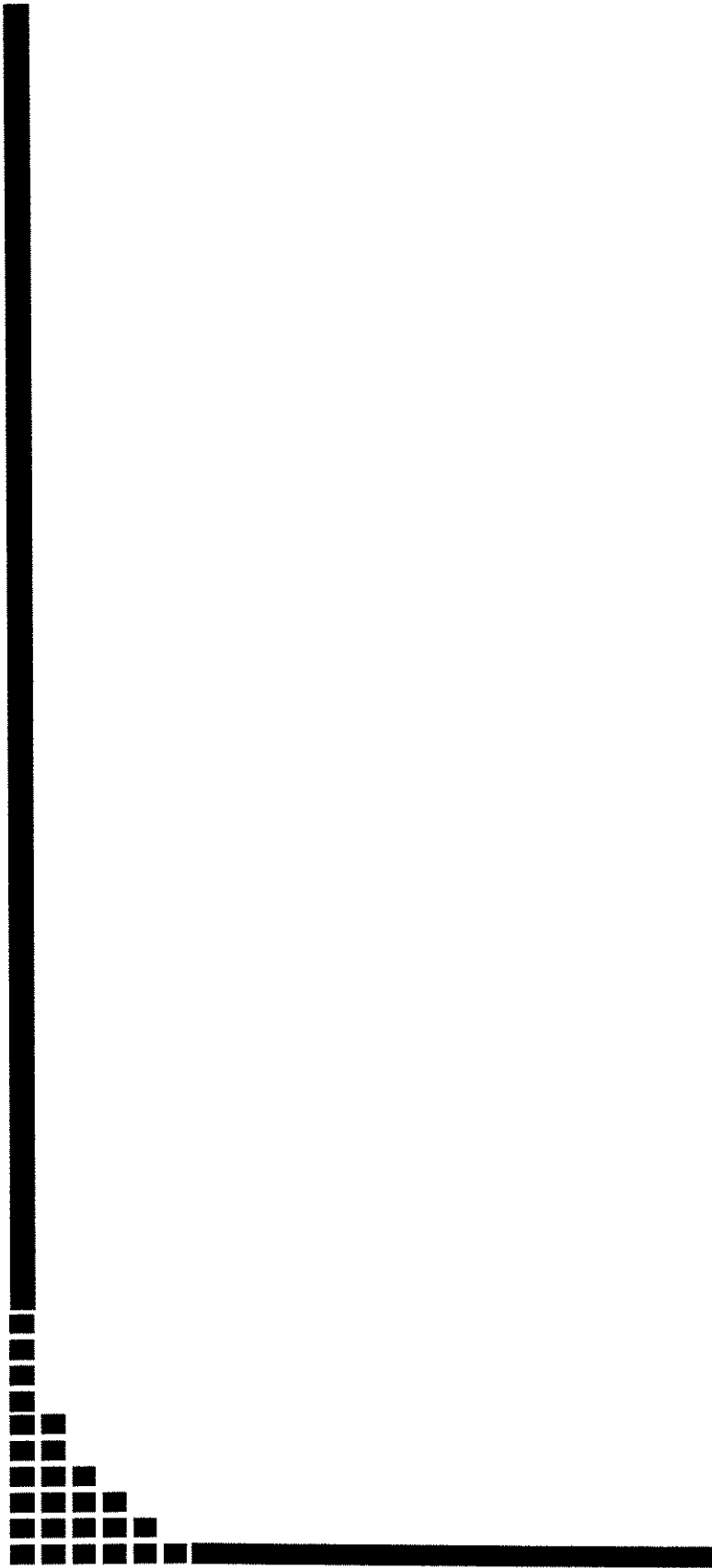
A avaliação de RTC imaturos tem sido proposta como um possível indicador de atividade eritropoiética na medula óssea (Davis e col. 1995; Corberand 1996; Dalal e col. 1996).

A contagem automatizada de RTC obtida através de contadores que utilizam citometria de fluxo e identificação dos RTC através de corantes específicos para RNA, tem possibilitado o estudo mais aprimorado do comportamento dos RTC em diversas situações clínicas. A subdivisão dessas células em diferentes estágios de maturação pode ser útil na avaliação da atividade eritropoiética da medula óssea, na distinção de diferentes tipos de anemia e no monitoramento de transplantes de medula óssea (Tsuda & Tatsumi 1989; Kuse 1993; Brugnara 1998).

Contadores hematológicos de última geração incorporaram às determinações hematimétricas habituais a contagem automatizada de RTC, usando um marcador específico para RNA, e determinam o número e o grau de maturidade celular por citometria de fluxo. Eles apresentam a vantagem de fornecer os resultados a partir da mesma amostra de sangue e concomitantemente à realização do hemograma, sendo, portanto, muito mais rápido e menos dispendioso, o que possibilita a sua utilização em laboratórios de rotina.

Há poucos relatos na literatura sobre os efeitos da HU sobre os novos parâmetros referentes aos RTC, em pacientes com SF em uso de HU. Steinberg e col. (1997) estudaram 10 pacientes com hemoglobinopatia SC e relataram um maior volume e menor concentração de Hb nos RTC. Os autores sugeriram que a célula estando mais hidratada e, portanto, menos densa, teria menor tendência de polimerização, explicando a melhora clínica dos pacientes.

Três pacientes com Hb SS tratados com HU foram estudados por Brugnara e col. (1997), onde mostraram que a relação Hb/Hb RTC poderia ser utilizada como estimativa da redução da sobrevivência das hemácias e da gravidade da hemólise.

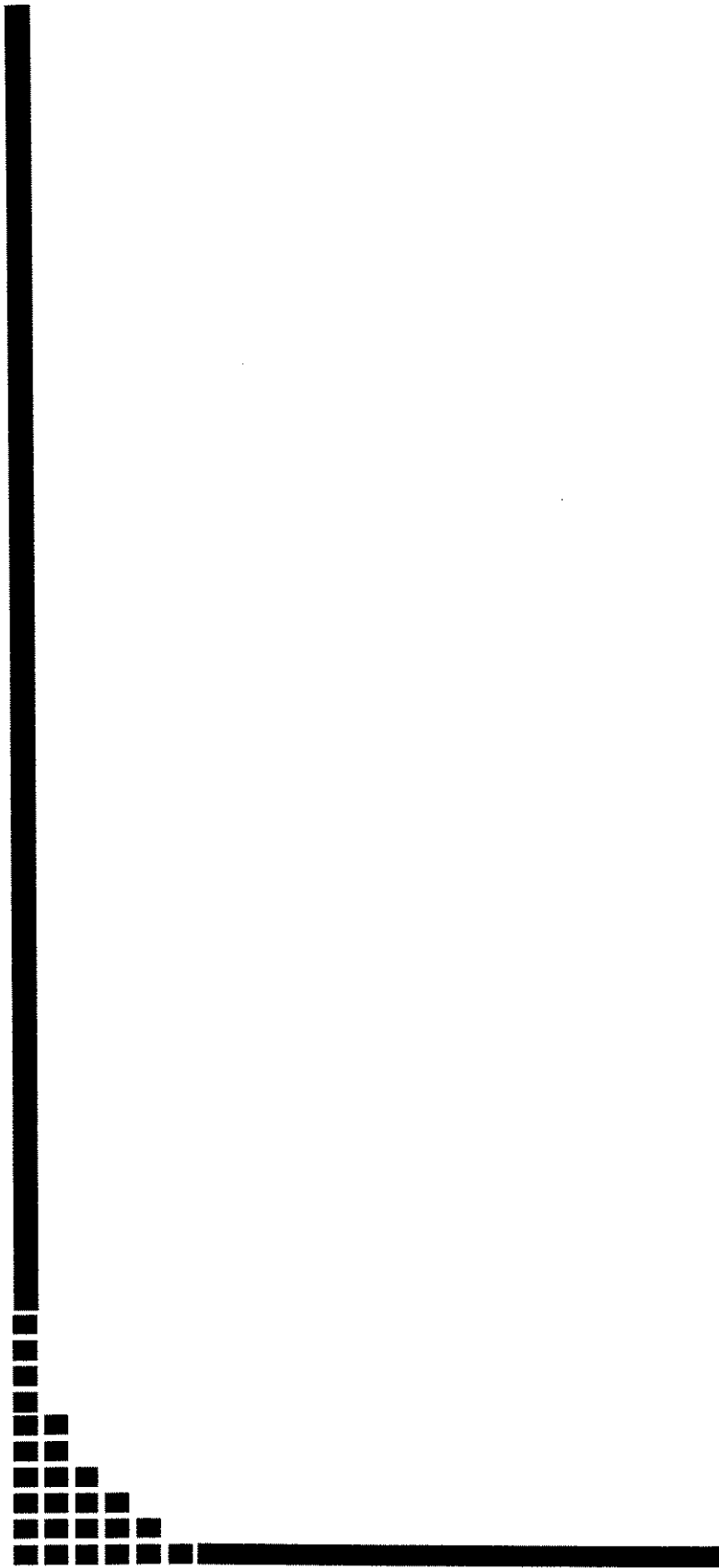


## ***2. OBJETIVOS***

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Quantificar os RTC, avaliar os parâmetros referentes ao volume e grau de imaturidade dos RTC em pacientes com SF que recebem HU, comparando-os aos obtidos em pacientes sem a administração da HU.

2. Avaliar a concentração de HbF, quantificar as celsF nos dois grupos de pacientes, e correlacionar esses dados com os diversos parâmetros reticulocitários, para verificar a possibilidade de tais parâmetros serem úteis no acompanhamento clínico de pacientes sob uso da HU.



### ***3. CASUÍSTICA***

### 3.1. GRUPOS DE ESTUDO

**I: Controle:** 33 pacientes com SF, sem uso de HU, sendo 25 homocigotos da Hb S (SS), 3 heterocigotos da  $S\beta^0$  talassemia ( $S\beta^0$  tal), 3  $S\beta^+$  tal, 1 heterocigoto SC (SC) e 1 SC com  $\alpha$  talassemia ( $_{\alpha}/_{\alpha}$ ).

**II: Grupo HU:** 13 pacientes com SF que já tomavam HU, sendo 11 SS, 1 SC e 1  $S\beta^0$  tal.

Tratamento com HU: no momento da coleta, as dosagens de HU que os pacientes estavam recebendo variaram de 500 a 1.500 mg/dia, e o período de tratamento variou entre 7 e 72 meses (média de 26,4 meses).

Esses pacientes foram atendidos no Hemocentro-UNICAMP. O Termo de Consentimento foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética da FCM/UNICAMP. Os critérios de inclusão, exclusão e esquema de tratamento são os adotados pelo Hemocentro-UNICAMP.

### 3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE PACIENTES NO ESTUDO

- Concentração de hemoglobina < 6,0 g/dl
- Frequência de ocorrência de crises dolorosas de difícil controle  $\geq 3$  por ano
- Acidente vascular cerebral isquêmico
- Priapismo pós puberal

### 3.3. EXAMES LABORATORIAIS PRÉVIOS AO TRATAMENTO

- Hemograma completo com contagem de RTC
- Quantificação da Hb F
- Provas de função hepática: AST, ALT, eletroforese de proteínas
- Provas de hemólise: bilirrubinas (indireta, direta e total), haptoglobina e urobilinogênio
- Provas de função renal: uréia e creatinina
- Teste de gravidez

### **3.4. ESQUEMA DE TRATAMENTO COM HU**

- HU: 10 a 20 mg/Kg/dia

Iniciar com 500 mg/dia e aumentar 250 mg/dia a cada 8 semanas até a dose máxima de 2 g/dia

- Apresentação: HYDREA: cápsulas de 500 mg

### **3.5. EFEITOS COLATERAIS**

- Irritabilidade gastro-intestinal
- Rash cutâneo
- Queda de cabelo

### **3.6. CONTROLE DA TERAPÊUTICA E DA TOXICIDADE**

- Hemograma com RTC a cada 2 semanas por 4 semanas, após aumentar a dose da HU
- Hemograma com RTC a cada 4 semanas, quando a dose da HU estiver mantida
- Testes de função hepática e renal a cada 4 semanas

### **3.7. CRITÉRIOS E MANEJO DA TOXICIDADE**

- Suspender o medicamento na presença de um dos critérios:

Neutrófilos < 2.000/mm<sup>3</sup>

Plaquetas < 100.000/ mm<sup>3</sup>

Reticulócitos < 125.000/mm<sup>3</sup>

Redução da Hb em 20% ou Hb < 4,5 g/dl

Aumento de 100% nos níveis de ALT

Aumento de 50% nos níveis da creatinina

- Após a resolução completa da toxicidade:

Retornar com a dose anterior a que estava sendo utilizada. No entanto, se houver recidiva da toxicidade reduzir a dose em 250 mg/dia

### **3.8. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO**

- Os pacientes serão reavaliados após 12 meses de terapêutica

### **3.9. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DE PACIENTES**

- Gestação
- Hepatopatia grave: AST ou ALT > 100 IU/l
- Insuficiência renal: creatinina > 1,0 mg/dl ou

clearance de creatinina < 100 ml/min por 1,73m<sup>2</sup>



## ***4. METODOLOGI***



#### **4.1. DIAGNÓSTICO DAS HEMOGLOBINOPATIAS:**

- hematimetria completa de sangue colhido com EDTA feita no aparelho automatizado Pentra 120 Retic (ABX-Horiba);
- eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em tampão TRIS – EDTA – BORATO, pH = 8,9, e em gel de ágar pH = 5,9, para confirmação das alterações estruturais (Dacie & Lewis 1996; Wheatherall & Clegg 1981).
- teste de solubilidade da HbS em tampão fosfato 2,35M (Zago e col. 1982)
- dosagem de Hb A<sub>2</sub> pelo método de eluição (Wheatherall & Clegg 1981)

#### **4.2. QUANTIFICAÇÃO DOS RETICULÓCITOS E SEUS PARÂMETROS:**

Pentra 120 Retic (ABX-Horiba, França) - aparelho hematológico automatizado que identifica os RTC usando “Thiazole orange” em citometria de fluxo. Parâmetros analisados:

- RTC em números percentuais, absolutos e contagem corrigida de acordo com o grau de anemia.
- valores das frações de alta (HFR), média (MFR) e baixa (LFR) fluorescência de RTC, volume corpuscular médio (VCMr) e intensidade média de fluorescência (MFI).

Este equipamento encontra-se no setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

#### **4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HbF, PELO MÉTODO DE DESNATURAÇÃO ALCALINA (DACIE & LEWIS 1996, PEMBREY E COL. 1972)**

#### 4.4. IDENTIFICAÇÃO DAS CELS F POR CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO 2 ANTICORPOS:

- anticorpo monoclonal para Glicoforina A, conjugado com R-Ficoeritrina (Caltag Laboratories- Burlingame, CA-USA): marcador de membrana de hemácias.
- anticorpo monoclonal para HbF, conjugado com FITC (Caltag Laboratories- Burlingame, CA-USA): marcador de citoplasma de hemácias que contêm Hb F.

Outros reagentes utilizados nesta técnica foram:

- Glutaraldeído 25% sol. Aquosa (Sigma Chemical CO.- St. Louis,USA)
- Triton x-100 (Reagen Indústria Química S.A.- Rio de Janeiro,BR)

O procedimento para esta identificação foi o seguinte:

- 1º: Contar o número hemácias;
- 2º: Fixar 10µl de sangue total em 1ml de glutaraldeído 0,05% gelado por 10min. à temperatura ambiente. Verter após adicionar as células;
- 3º: Lavar 3 vezes com 2ml de PBS com 0,1%BSA(Albumin Bovine, Sigma Chemical CO.- St. Louis, MO-USA);
- 4º: Ressuspender o “pellet” de células em 0,5ml de triton x-100 0,1%. Incubar por 3-5 min à temperatura ambiente;
- 5º: Lavar 1 vez com 2ml de PBS-0,1%BSA;
- 6º: Ressuspender o “pellet” de células em 0,5ml de PBS-BSA;
- 7º: Adicionar 10µl dessa suspensão a 5µl de glicoforina, 5µl de anti-HbF e 70µl de PBS-BSA. Incubar a T.A. no escuro por 15min;

8º: Lavar 2 vezes com 2ml de PBS-BSA;

9º: Ressuspender o “pellet” de células em 0,5ml de formaldeído 1%;

10º: Estocar os tubos no escuro, em geladeira, antes de adquirir no citômetro de fluxo.

As células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, USA); foram coletados 50.000 eventos para cada amostra e os dados foram analisados usando o software Cell Quest (Becton Dickinson). Este equipamento encontra-se no Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro-UNICAMP.

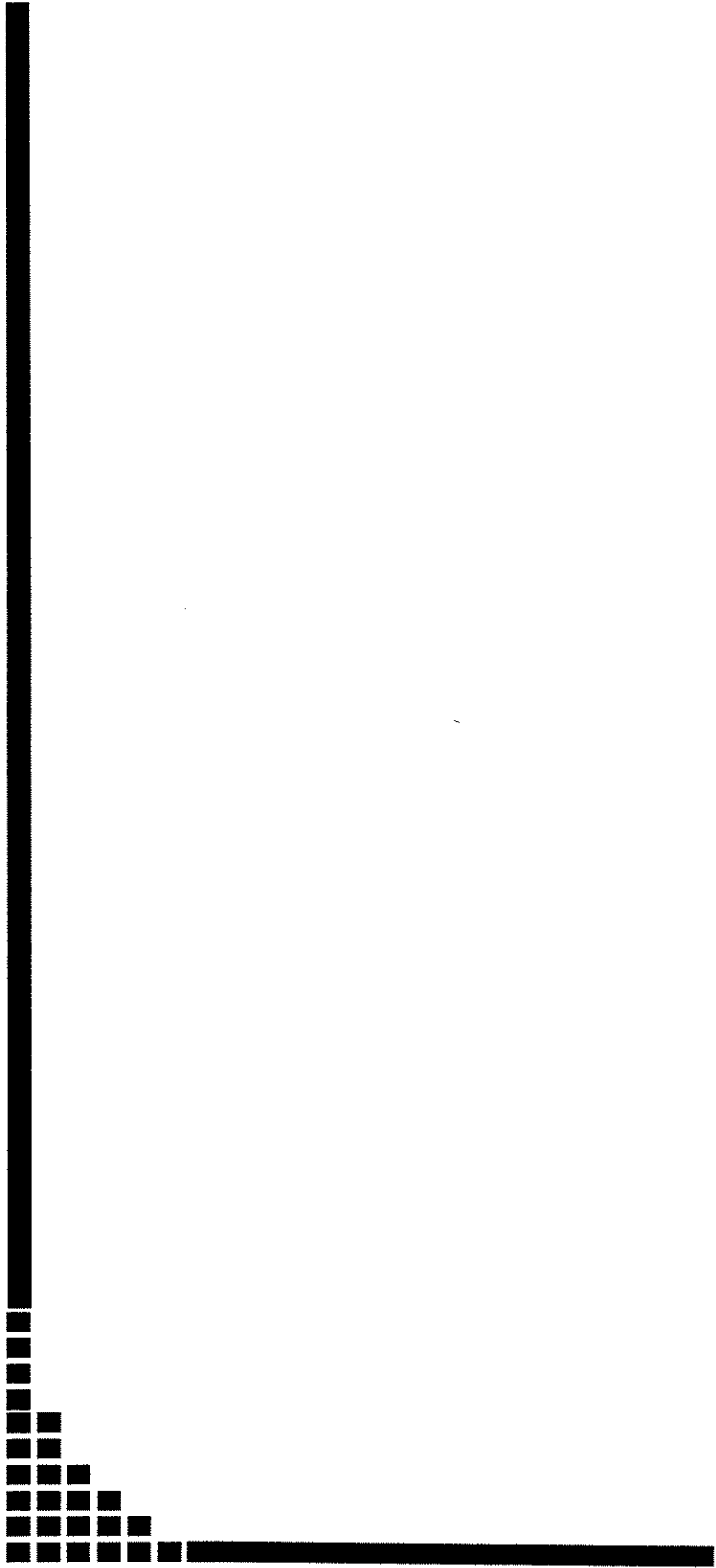
A quantidade de Hb F em picogramas (pg) por cel F foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{HbF/celF pg} = (\text{HCM} \times \% \text{Hb F}) / \% \text{cel F} \text{ (Marcus \& Ware 1999)}$$

#### **4.5.METODOLOGIA ESTATÍSTICA**

Análise descritiva através de medidas de posição e dispersão das variáveis em cada grupo. Para comparação de medidas contínuas entre 2 grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para verificar a relação entre 2 variáveis contínuas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5%, e a apresentação gráfica foi representada através de diagramas de dispersão e “boxplots”.



## ***5. RESULTADOS***

## 5.1. ANÁLISE DESCRITIVA/COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ESTUDADOS EM AMBOS OS GRUPOS: OS RESULTADOS DA ANÁLISE CONSTAM DA TABELA 1.

Analisando, inicialmente, os dados hematimétricos, foi observado que os números de leucócitos foram menores nos pacientes em tratamento com HU do que no grupo controle (mediana=  $7,6 \times 10^9/L$  versus  $10,5 \times 10^9/L$ ,  $P= 0,0035$ ), o mesmo valendo para os números de neutrófilos (mediana=  $3,5 \times 10^9/L$  versus  $5,4 \times 10^9/L$ ,  $P= 0,0097$ ). Quanto à série vermelha, não apresentaram diferença significativa a contagem de hemácias, o valor de hematócrito e a CHCM. Entretanto, a concentração de Hb apresentou-se mais elevada no grupo recebendo tratamento (mediana= 9,1 g/dl) do que no grupo controle (mediana= 8,1 g/dl,  $P = 0,0490$ ). Além desta, foram significativas as diferenças observadas entre os grupos, quando estudados o VCM das hemácias e o seu conteúdo hemoglobínico, já que ambos os parâmetros apresentaram valores maiores ( $P= 0,001$ ) no grupo de pacientes submetidos ao tratamento com HU (medianas: VCM= 110,0 fl e HCM= 35,7 pg) quando comparados ao grupo controle (medianas: VCM= 91,0 fl e HCM= 28,8 pg). Pacientes com SF sem uso de HU apresentaram maior heterogeneidade na distribuição das hemácias de acordo com o tamanho, constatada através do valor de RDW, mais elevado nesse grupo (mediana= 23,5%) em relação ao grupo tratado com HU (mediana= 16,4%,  $P= 0,0002$ ). Não houve diferença nas contagens de plaquetas entre os grupos.

Quanto às variáveis referentes à Hb F, os resultados mostraram que as dosagens de Hb F foram superiores no grupo tomando HU (mediana= 14,2%), quando comparadas ao grupo controle (mediana= 5,6%,  $P= 0,0003$ ), assim como a porcentagem de cels F (medianas= 57,0% no grupo com HU e 25,6% no grupo controle,  $P= 0,0008$ ) (Figuras 3 e 4, e Tabela 1). A concentração de Hb F/cel F igualmente foi maior nos pacientes tratados com HU (mediana= 7,9 pg/cel) quando comparados ao grupo controle (mediana= 5,9 pg/cel,  $P= 0,0003$ ) (Tabela 1 e Figura 5).

Em relação aos parâmetros reticulocitários, os valores percentuais dos RTC, foram significativamente menores no grupo em tratamento (mediana= 2,4%) do que no grupo controle (mediana= 8,4%,  $P= 0,0058$ ). Acompanhando a contagem em porcentagem, a quantificação dos RTC em números absolutos foi inferior nos pacientes tratados com HU

(mediana=  $74,9 \times 10^9/L$ ) quando comparados ao grupo controle (mediana=  $174,5 \times 10^9/L$ ,  $P= 0,0015$ ) (Figura 6). O volume dos RTC apresentou valores significativamente maiores no grupo tratado (mediana= 125,0 fl) em relação ao controle (mediana= 110,0 fl,  $P= 0,0003$ ). Foram observados ainda que, embora o grau de imaturidade dos reticulócitos, representado por MFI%, tenha sido similar em pacientes de ambos os grupos estudados, o MFI relacionado ao número absoluto de RTC, foi maior no grupo controle (mediana=  $29,4 \times 10^9/L$ ) do que nos pacientes em tratamento com HU (mediana=  $13,8 \times 10^9/L$ ,  $P= 0,0128$ ) (Figura 7).

Constatou-se ainda que, as dosagens de bilirrubina total (BT), indireta (BI) e urobilinogênio apresentaram valores semelhantes nos 2 grupos (Tabela 1).

## 5.2. ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS:

Como pode ser observado na Tabela 2, constatou-se que a maior concentração de Hb nos pacientes tratados com HU não esteve relacionada com um menor processo hemolítico, representado pelos valores de RTC e pelos níveis de bilirrubinas. Do mesmo modo, a maior concentração de Hb não foi determinada pela maior concentração de Hb F, sugerindo tratar-se de eventos independentes. Os nossos dados indicam que a maior concentração de Hb F está diretamente relacionada ao aumento do volume das hemácias maduras ( $r=0,6437$ ,  $P= 0,0176$ ) e dos RTC ( $r= 0,5777$ ,  $P= 0,0387$ ) no grupo em tratamento com HU, mas no grupo controle houve uma correlação fraca somente entre HbF e VCM ( $r= 0,4053$ ,  $P= 0,0214$ ). Uma correlação moderada entre VCMr e porcentagem de cels F em ambos os grupos, a princípio, sugeriu que essas células pudessem tratar-se de RTC com uma maior quantidade de Hb F no seu interior, reconhecidos como cels F à citometria de fluxo. Entretanto, não houve correlação entre nenhum dos parâmetros relacionados com os números e imaturidade dos RTC e a quantificação de cels F.

A correlação entre a concentração de Hb F e os números das cels F foi positiva no grupo de pacientes em tratamento ( $r= 0,7582$ ,  $P= 0,0027$ ), e mais forte no grupo controle ( $r= 0,9342$ ,  $P<0,0001$ ), indicando que ambos métodos são adequados para se avaliar a concentração de Hb F (Tabela 2 e Figura 8). Não houve correlação entre o número de cels F e a concentração de Hb F/cel F, em ambos os grupos (Tabela 2), sugerindo uma heterogeneidade de distribuição de Hb F no interior das células que a produzem.

Para verificar se a dosagem de HU interferiu na produção de RTC e síntese de Hb F, testou-se a correlação entre estas variáveis. Os resultados mostraram que a dosagem de HU não tem correlação com o número de RTC ( $r = -0,1426$ ,  $P = 0,6419$ ), com MFI# ( $r = 0,0931$ ,  $P = 0,7621$ ) ou com HbF% ( $r = 0,2911$ ,  $P = 0,3344$ ).

**Tabela 1:** Dados hematológicos em pacientes com síndromes falciformes

Variáveis	com HU		controle		Valor de P
	N	mediana (intervalo)	N	mediana (intervalo)	
WBC x10 <sup>9</sup> /l	13	7,6 (3,3-12,5)	33	10,5 (5,4-21,4)	<b>0,0035</b>
Neut x10 <sup>9</sup> /l	13	3,5 (1,5-7,8)	33	5,4 (1,9-17,1)	<b>0,0097</b>
RBC x10 <sup>12</sup> /l	13	2,7 (1,8-3,5)	33	3,0 (1,8-5,5)	0,1500
Hb g/dl	13	9,1 (7,3-11,7)	33	8,1 (6,3-11,1)	<b>0,0490</b>
Ht %	13	27,4 (22,5-35,5)	33	26,1 (18,6-35,2)	0,1334
VCM fl	13	110,0 (91,0-128,0)	33	91,0 (64,0-109,0)	<b>&lt; 0,0001</b>
HCM pg	13	35,7 (28,7-44,1)	33	28,8 (19,4-36,7)	<b>0,0001</b>
CHCM g/dl	13	32,3 (30,8-34,4)	33	31,6 (29,7-34,2)	0,3222
RDW %	13	16,4 (15,0-24,7)	33	23,5 (16,3-29,6)	<b>0,0002</b>
PLT x10 <sup>9</sup> /l	13	301,0 (144,0-625,0)	33	374,0 (100,0-605,0)	0,0923
RTC%	13	2,4 (1,1-7,8)	33	6,5 (0,32-11,2)	<b>0,0058</b>
CRC%	13	1,9 (0,7-5,13)	33	3,7 (0,2-7,1)	<b>0,0180</b>
RTC# x10 <sup>9</sup> /l	13	74,9 (26,5-216,7)	33	174,5 (11,3-397,8)	<b>0,0015</b>
MFI%	13	17,4 (5,77-26,60)	33	17,4 (9,0-31,2)	0,4207
MFI# x10 <sup>9</sup> /l	13	13,8 (1,89-43,97)	33	29,4 (1,9-97,4)	<b>0,0128</b>
VCMr fl	13	125 (108-142)	33	110,0 (78,0-137,0)	<b>0,0003</b>
HbF %	13	14,2 (5,1-20,2)	32	5,6 (0,8-16,6)	<b>0,0003</b>
celsF %	13	57,0 (27,4-94,3)	32	25,6 (2,6-73,0)	<b>0,0008</b>
HbF/celF pg/cel	13	7,9 (5,3-13,4)	32	5,9 (2,6-13,1)	<b>0,0003</b>
Urob	13	20,0 (20,0-80,0)	28	20,0 (20,0-160,0)	0,4759
BI mg/dl	13	1,40 (0,50-2,80)	28	2,35 (0,70-10,30)	0,2326
BT mg/dl	13	2,0 (0,9-3,3)	28	3,1 (1,0-10,9)	0,1372

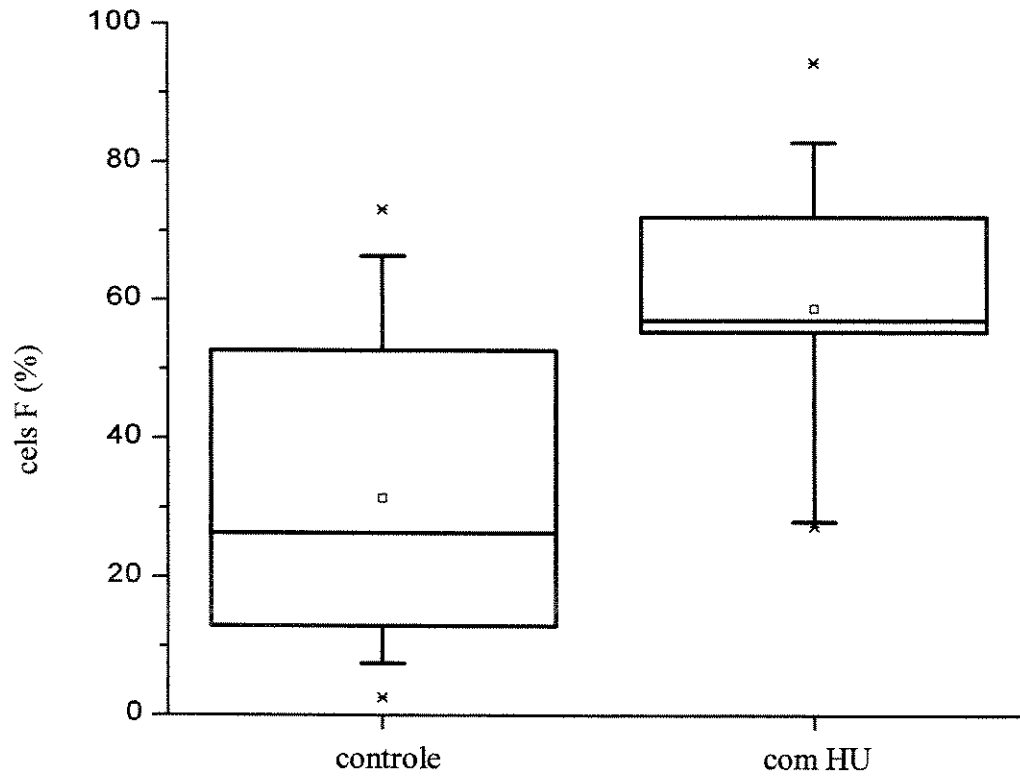
WBC: leucócitos, Neut: número de neutrófilos, RBC: hemácias, Hb: hemoglobina, Ht: hematócrito, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de Hb corpuscular média, RDW: variação de tamanho dos eritrócitos, PLT: número de plaquetas, RTC: reticulócitos, CRC: contagem de reticulócitos corrigida, MFI: índice médio de fluorescência, VCMr: volume corpuscular médio dos reticulócitos, Hb F: concentração de hemoglobina fetal, cels F: número de células F, Hb F/cel F: concentração de hemoglobina fetal por célula F, Urob: urobilinogênio, BI: bilirrubina indireta, BT: bilirrubina total

**Tabela 2:** Coeficientes de Correlação de Spearman entre as variáveis estudadas

Variáveis	com HU		Controle	
	R	valor P	R	valor P
Hb x HbF	0,0247	0,9359	0,2277	0,2099
Hb x VCM	-0,0013	0,9964	-0,1812	0,3127
VCM x HbF	<b>0,6437</b>	<b>0,0176</b>	<b>0,4053</b>	<b>0,0214</b>
VCMr x HbF	<b>0,5777</b>	<b>0,0387</b>	0,2739	0,1292
VCMr x MFI#	0,1210	0,6936	0,0620	0,7316
VCMr x celsF	<b>0,5667</b>	<b>0,0434</b>	<b>0,4046</b>	<b>0,0216</b>
HbF x celsF	<b>0,7582</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,9342</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
HbF x RTC%	-0,3438	0,2500	0,1644	0,3684
HbF x RTC#	-0,5109	0,0743	0,2742	0,1287
HbF x MFI%	0,0054	0,9858	-0,2273	0,2108
HbF x MFI#	-0,3296	0,2713	-0,0170	0,9262
HbF x BT	-0,4696	0,1054	-0,1147	0,5687
Hb x MFI%	-0,0165	0,9573	0,1348	0,4542
Hb x MFI#	0,1349	0,6602	0,1949	0,2769
Hb x RTC%	0,0979	0,7503	-0,1401	0,4367
Hb x RTC#	0,2644	0,3826	0,2021	0,2592
Hb x BT	0,1080	0,7254	-0,3204	0,0965
celsF x RTC%	-0,0412	0,8935	0,2489	0,1695
celsF x RTC#	-0,1758	0,5656	0,2562	0,1569
celsF x MFI%	0,3351	0,2629	-0,2168	0,2332
celsF x MFI#	0,0274	0,9290	-0,0113	0,9508
celsF x HbF/celF	0,0494	0,8725	0,2895	0,1079
celsF x BT	-0,1547	0,6138	-0,0106	0,9578

Hb: hemoglobina, VCM: volume corpuscular médio das hemácias, Hb F: concentração de hemoglobina fetal, VCMr: volume corpuscular médio dos reticulócitos, MFI: índice médio de fluorescência, cels F: número de células F, RTC: reticulócitos, Hb F/cel F: concentração de hemoglobina fetal por célula F, BT: bilirrubina total

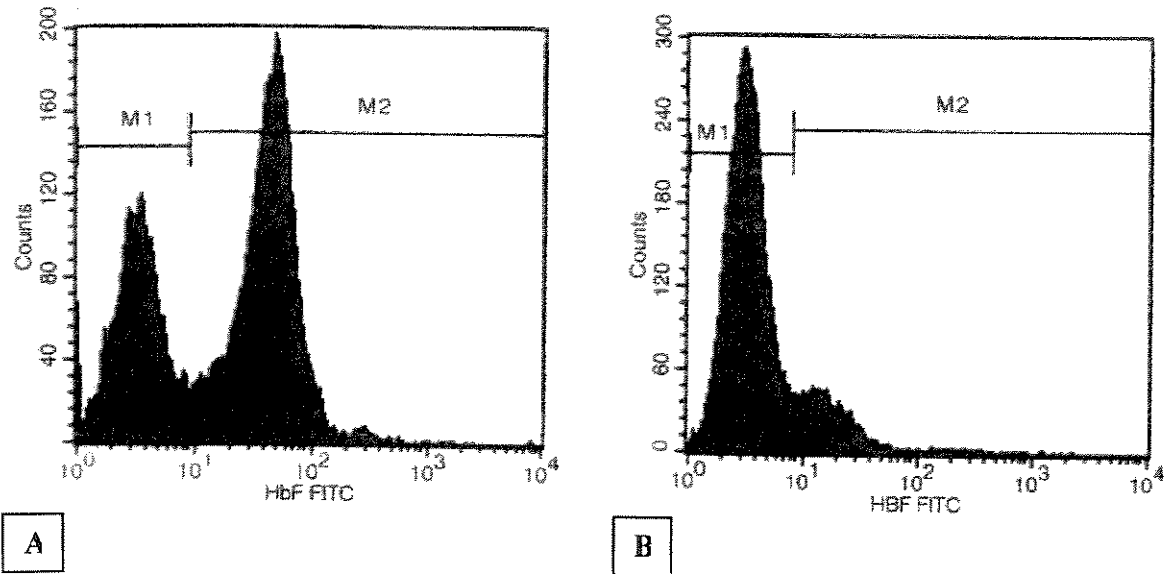




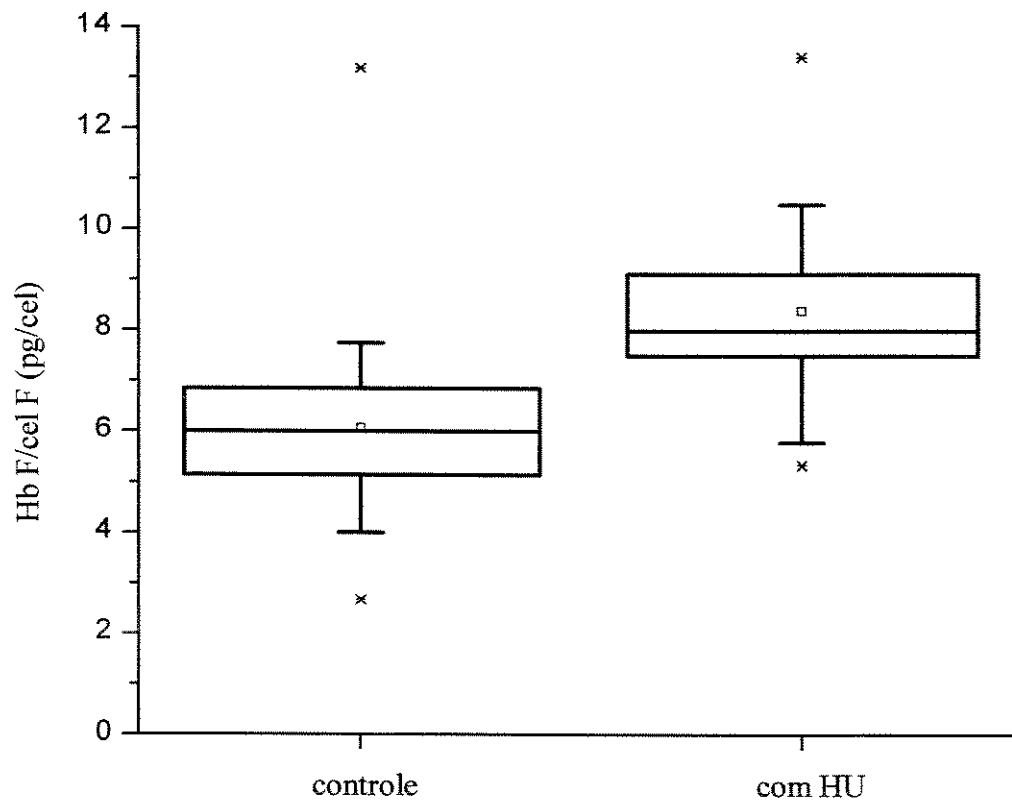
**Figura 3:** Boxplots relacionados às porcentagens de células F em pacientes com síndromes falciformes.

x = valores mínimo e máximo

□ = média



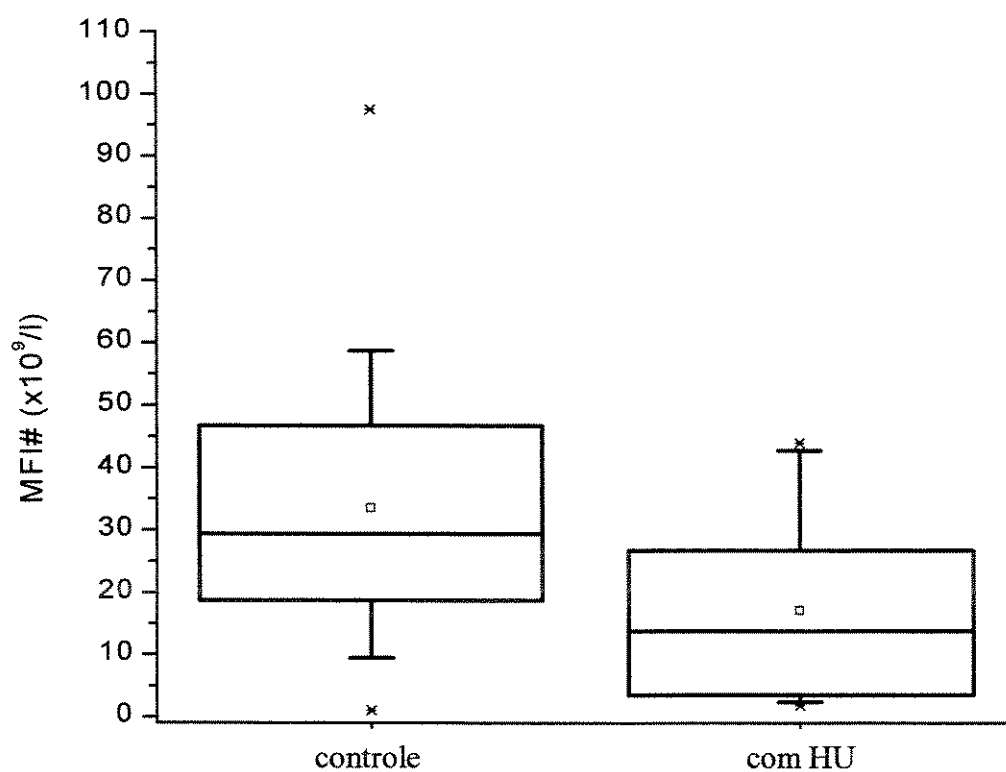
**Figura 4:** Número de hemácias e células F obtida pelo citômetro de fluxo FACSCalibur usando Ac anti-hemoglobina fetal humana conjugada a FITC (HbF FITC). A: paciente com síndrome falciforme durante tratamento mostrando hemácias que não contém HbF (M1) e contendo 65% HbF (M2) e B: paciente com síndrome falciforme que não recebe HU mostrando hemácias que não contém HbF (M1) e hemácias contendo 16% HbF (M2).



**Figura 5:** Boxplots relacionados à Hb F/cel F em pacientes com síndromes falciformes.

x = valores mínimo e máximo

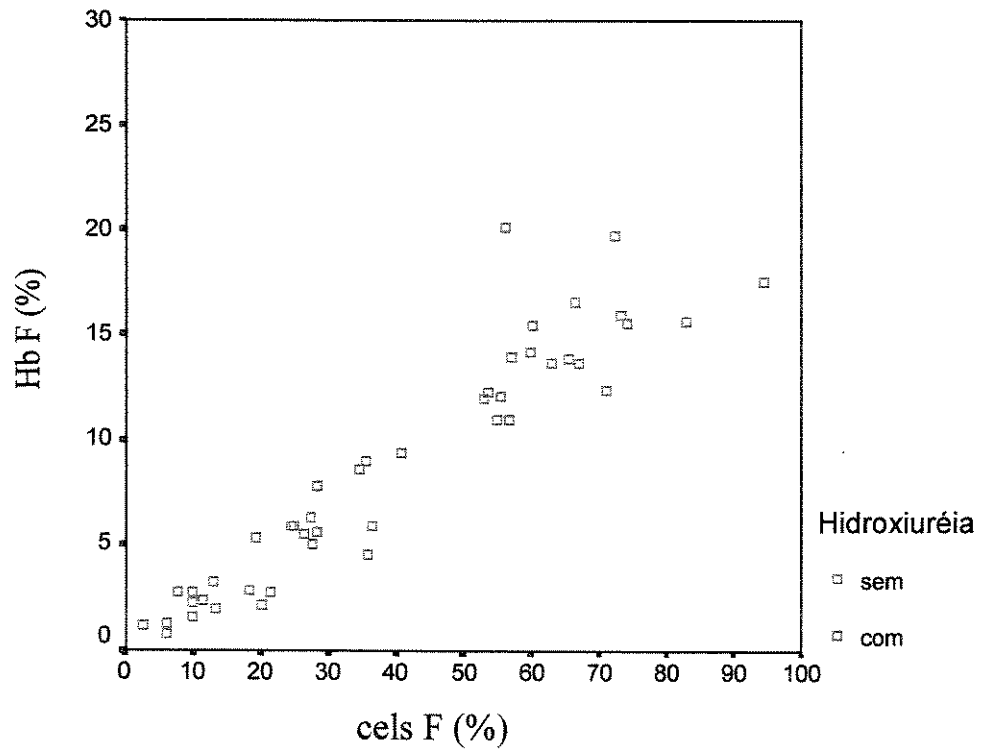
□ = média



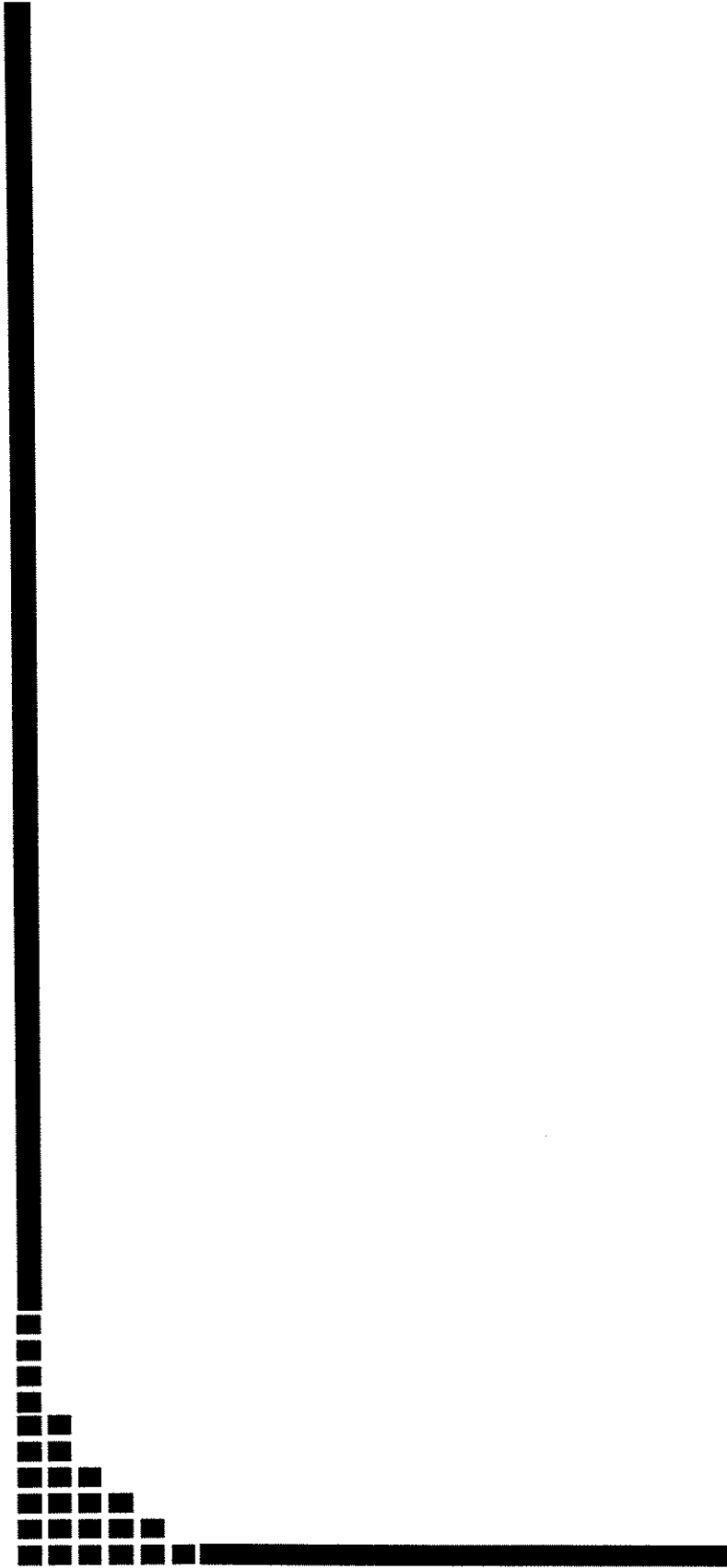
**Figura 6:** Boxplots relacionados ao índice médio de fluorescência (MFI) # em pacientes com síndromes falciformes.

x = valores mínimo e máximo

□ = média



**Figura 7:** Correlação entre as porcentagens de Hb F e cels F nos dois grupos de pacientes estudados (com HU:  $r=0.7582$  e sem HU:  $r=0.9342$ )



## ***6. DISCUSSÃO***

Os níveis de Hb F nas SF dependem de três processos: da produção das cels F, da biosíntese de Hb F no interior das hemácias e da sobrevivência preferencial das cels F em relação às células desprovidas de Hb F. O nível de produção de cels F é o resultado da combinação e do grau de equilíbrio entre estes três processos (Dover e col. 1978). Atualmente já se sabe que a produção de cels F, assim como os níveis de Hb, número de hemácias, leucócitos e plaquetas, são geneticamente determinados (Garner e col. 2000).

A concentração de Hb F influencia nas manifestações clínicas e laboratoriais das SF, porque reduz a polimerização da desoxi Hb S. A polimerização no interior dos eritrócitos causa deformação da célula, torna-a rígida, causando obstrução no fluxo sanguíneo, com conseqüente lesão tecidual (Platt 2000). Estudos recentes sugerem que as alterações de perfusão no local lesado contribuem significativamente para a fisiopatologia da falcização, uma vez que a presença de oxigênio nos tecidos isquêmicos forma radicais livres que vão causar a inflamação no endotélio e lesão tecidual (Kaul & Hebbel 2000). Células contendo concentrações aumentadas de Hb F sofrem menos essas alterações. Conseqüentemente, pacientes com níveis aumentados de Hb F tem uma redução nos episódios vaso-oclusivos e uma evolução clínica mais benigna (Rodgers 1997).

A determinação de cels F é um importante parâmetro laboratorial na avaliação da produção de Hb F nas SF (Maier-Redelsperger e col. 1998b). Wood e col. (1975), usando anticorpos anti-Hb F conjugados com FITC em esfregaços de sangue fixados, determinaram que a distribuição de células contendo HbF em pessoas normais foi de  $2,7\% \pm 1,4\%$  e entre 30% e 59% em 5 pacientes SS. Recentemente, a porcentagem de cels F foi quantificada usando citômetro de fluxo, em um grupo grande de crianças com SF (Marcus & Ware 1999). Os resultados das % de cels F foram similares aos observados em nosso grupo de pacientes adultos em tratamento com HU ( $x = 55,9 \pm 19,9$  e  $x = 58,75 \pm 19,46$ , respectivamente).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a quantidade de Hb F/cel F foi maior no grupo de pacientes usando HU do que no grupo controle. Entretanto, nenhum dos pacientes alcançou o valor limite de 15 pg de Hb F/cel F, sugerido como adequado para interferir no processo de falcização (Marcus & Ware 1999). Nosso valor médio de Hb F/cel

F foi menor do que o observado em outros estudos (Goldberg e col. 1990; Dover e col. 1978), mas foi próximo ao descrito em 2 pacientes tratados com HU ao longo de 7 anos (Dover & Charache 1992). Não foi obtida correlação entre a quantidade de Hb F/cel F e a contagem de cels F. Estes dados sustentam a hipótese de que ambas variáveis, Hb F/cel F e contagem de cels F, são independentes e possivelmente reguladas por fatores genéticos diferentes (Meier-Redelsperger e col. 1994, Steinberg e col. 1997).

Nesse estudo foi observado uma maior concentração de Hb em pacientes que receberam HU do que naqueles sem a medicação. Foi observado ainda que a maior concentração de Hb no grupo que recebeu tratamento, não pareceu resultar de menor hemólise. Também não foi determinada apenas por uma maior concentração de Hb F, uma vez que não foi observada correlação entre Hb e Hb F. Não foi possível definir com exatidão o que poderia ter contribuído para a maior concentração da Hb nestes pacientes.

Como foi observada uma correlação forte entre as concentrações de Hb F e cels F, e que a quantificação de Hb F/cels F e cels F são variáveis independentes, não nos pareceu vantajoso quantificar cels F por citometria de fluxo em avaliações rotineiras de pacientes durante tratamento com HU.

A hidroxiuréia é uma droga que inativa a enzima ribonucleotídeo difosfatase, resultando na inibição da divisão celular (Pearson 1996). Primeiramente, a HU mostrou ser eficaz no tratamento de leucemias mielóides crônicas e, posteriormente, sua atividade foi reportada no tratamento da psoríase, policitemia vera e uma variedade de tumores (Yarbro 1992). Os efeitos da HU sobre a produção de Hb F em pacientes com SF tem sido relatado em vários estudos. Os benefícios clínicos não são devidos somente ao aumento na concentração de Hb F, mas também a uma variedade de outros efeitos, como o aumento do volume das hemácias, a alteração no grau de hidratação celular e à redução na contagem de leucócitos. Estes fatores podem ter papel importante na redução do número de crises dolorosas (Ballas e col. 1989; Olivieri & Weatherall 1998). Outras alterações hematológicas observadas foram aumento nos níveis de hemoglobina total e diminuição na contagem de reticulócitos. Estas alterações sugerem uma redução na intensidade de hemólise e, provavelmente, na falcização intravascular (Pearson 1996).



O mecanismo exato envolvido no aumento da produção de HbF pela HU não está completamente elucidado. É sugerido que durante a expansão eritróide aguda, novas células progenitoras são recrutadas e essas células tem a capacidade de ainda expressar o gene da globina  $\gamma$  (Yarbro 1992). Foi demonstrado que uma redução na densidade celular promovido pelo tratamento com HU em pacientes com Hb SC diminuiria a tendência à polimerização (Steinberg e col. 1997b). Embora a HU pareça ter um efeito supressivo na eritropoiese efetiva, ela aumenta a sobrevivência das hemácias, conforme o demonstrado em estudo de sobrevivência de hemácias através de técnicas de avaliação da cinética do ferro em pacientes SS. Quando o aumento na sobrevivência das hemácias é maior que a diminuição na sua produção, é verificado um aumento nos níveis de Hb F (Ballas e col. 1999). Nossos pacientes tratados com HU mostraram maior nível de Hb F do que pacientes que não receberam a droga.

Assim como relatado por outros autores (Charache e col. 1992; Miller e col. 2001), observa-se uma diminuição nas contagens de leucócitos e também de neutrófilos em pacientes que foram submetidos ao tratamento com HU. A diminuição na contagem de neutrófilos devido à administração de HU provavelmente teria um papel na melhor evolução clínica em pacientes com doença falciforme. O número de neutrófilos diminuído pode limitar a dimensão da destruição dos tecidos e a gravidade da dor após vaso-oclusão e infarto (Charache 1997).

O aumento do conteúdo de Hb parece ser responsável pela expansão do volume das células (Milner e col. 1986; Charache e col. 1992;). Nossos pacientes tomando HU mostraram valores de VCM significativamente maiores do que pacientes sem HU, como relatado por outros autores (Charache e col. 1992; Ballas e col. 1999; Miller e col. 2001). Uma vez que a porcentagem de pacientes com outras hemoglobinopatias, que cursam com microcitose, foi maior no grupo controle, foi analisado o VCM somente em pacientes SS. Observou-se que 78% dos controles, apresentaram VCM abaixo de 100 fl e 81.8% dos pacientes recebendo HU mostraram um VCM acima de 100 fl. Então, a diferença estatística no VCM entre os grupos provavelmente é devido ao efeito da HU em pacientes SS. A correlação observada entre VCM e HbF reforça esse conceito, já relatado por outros autores (Charache e col. 1992). É ainda possível que tenha sido determinada por maior hidratação da célula (Olivieri & Weatherall 1998).

A diminuição na contagem do número absoluto de reticulócitos e no número de reticulócitos imaturos sugere uma redução na hemólise. Embora o nível de HbF tenha sido maior e a contagem de reticulócitos menor no grupo com HU do que no grupo controle, a diminuição no nível de bilirrubina não foi estatisticamente significativa entre os grupos. Estes dados não permitem afirmar que houve um aumento na sobrevivência das hemácias, de acordo com as sugestões feitas por outros autores (Ballas e col. 1989; Charache e col. 1992; Ballas e col. 1999).

Parâmetros reticulocitários tem sido usados para avaliar a atividade eritropoiética da medula óssea, no diagnóstico diferencial de anemia, no monitoramento da resposta ao tratamento em anemia e como detector precoce da recuperação no transplante de medula óssea (Davies e col. 1992; Dalal e col. 1996; Brugnara 1998; Brugnara e col. 1999; Grotto e col. 1999). Pacientes SS tratados com HU mostraram diminuição acentuada no conteúdo de Hb dos reticulócitos, aumento no VCMr e aumento significativo na relação RBCHb/RTCHb, sugerindo uma maior sobrevivência dos eritrócitos (Brugnara e col. 1997).

Neste trabalho foi introduzido um novo parâmetro na investigação das hemoglobinopatias: o MFI. Este é um parâmetro preciso que quantifica a intensidade de fluorescência global da população de RTC imaturos e que mostrou ser útil como um preditor de recuperação no transplante de medula óssea (Torres e col. 2001). Chang & Kass (1997), em um estudo sobre o significado clínico da fração de RTC imaturos (IRF), sugerem que a integração do IRF e RTC em número, pode indicar a resposta eritróide na anemia. Uma diminuição no IRF em pacientes com anemia reflete uma medula não-responsiva ou sub-responsiva.

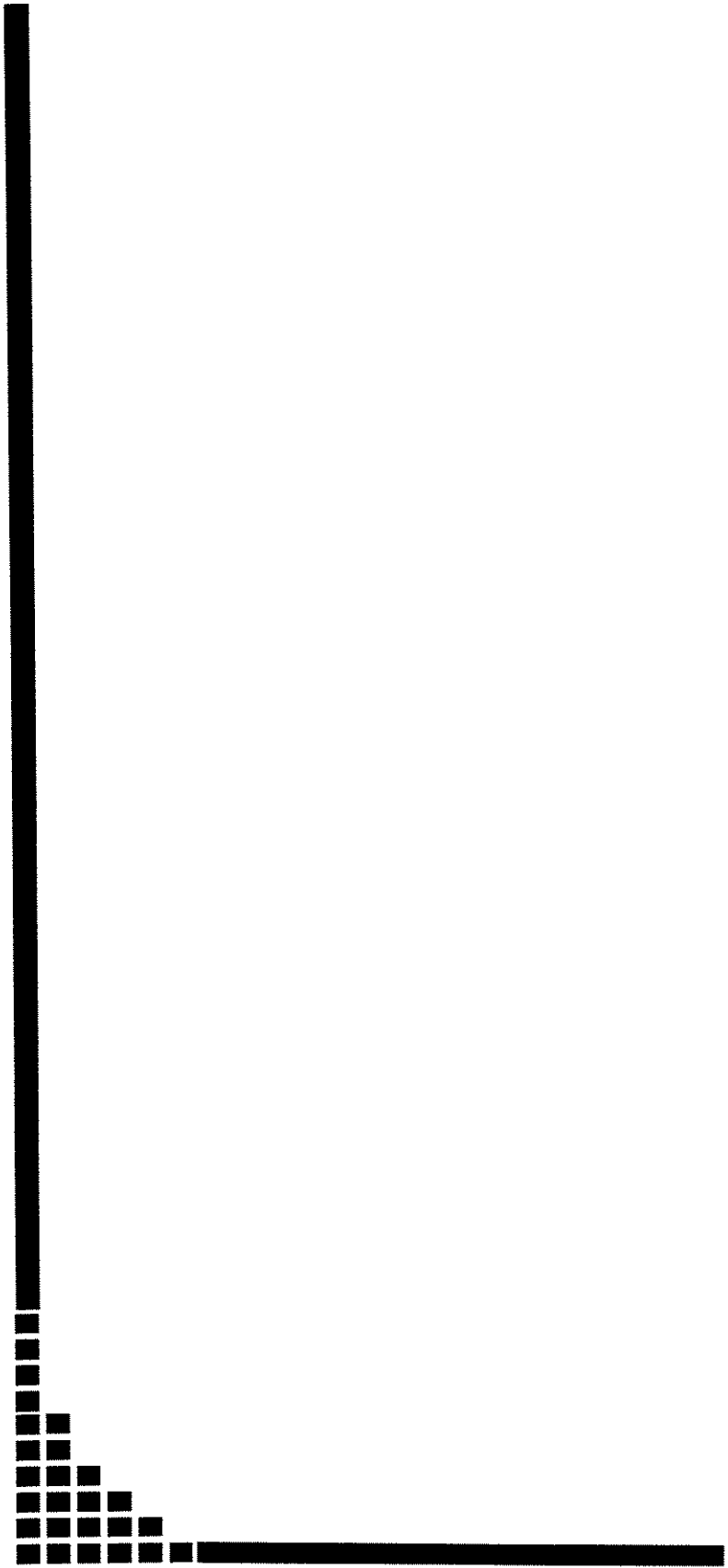
No presente estudo todos os pacientes tratados com HU mostraram MFI% dentro do intervalo de referência (média  $\pm$  DP= 16.26  $\pm$  3.99). Sessenta e três por cento dos pacientes apresentaram valores de RTC# normais e 23% dos pacientes mostraram valores de RTC# ligeiramente acima dos valores normais, de acordo com o intervalo de referência para nossa população normal, determinado pelo equipamento Pentra 120Retic (Grotto & Noronha 2000). A maioria dos pacientes (78%) sem tratamento com HU

apresentou valores de RTC maiores do que o limite normal. Embora a porcentagem de MFI tenha sido similar em ambos os grupos, a contagem do MFI absoluto indicou que um número elevado de RTC imaturos estava sendo liberado da medula óssea para a circulação, em pacientes que não estavam tomando a medicação. O menor número de RTC# e RTC imaturos observados no grupo usando HU, poderia a princípio, sugerir uma redução no processo hemolítico. No entanto, tal fato não pôde ser confirmado através das determinações de BI e urobilinogênio. Portanto, não é possível excluir o efeito tóxico da HU como responsável pela diminuição na contagem de RTC. Steinberg e col.(1997b) sugeriram a possibilidade da mielossupressão ser um pré-requisito para a HU aumentar a HbF. De acordo com Ohene-Frempong & Smith-Whitley (1997), alguns parâmetros de toxicidade da droga são um número de neutrófilos menor que 2.000/ $\mu$ l e um número absolutos de RTC menor que 80.000/ $\mu$ l. Os resultados mostraram que pacientes tomando HU apresentaram uma diminuição significativa na contagem de RTC e neutrófilos, mas nenhum paciente alcançou valores indicativos de toxicidade medular. Em um estudo para avaliar a adequação de doses de HU ao tratamento da doença falciforme, foi observada uma diminuição significativa nos valores de RTC na vigência de doses altas da medicação. Conforme relatado, a diminuição no número de RTC não teve correlação com o aumento na concentração de Hb ou com a diminuição no número de neutrófilos (Lima e col. 1997).

As correlações significantes entre VCMr e níveis de Hb F e VCMr e cels F observadas em pacientes que tomam HU sugerem que esses macro-RTC correspondem aos chamados RTC F. Estes RTC co-expressam as hemoglobinas fetal e adulta e são produzidos sob estimulação eritróide aguda (Blau e col. 1993). Em doenças com componente hemolítico, como a anemia falciforme, é provável que as cels F sobrevivam mais do que cels não-F. Assim, o parâmetro mais confiável para se avaliar a produção de cels F seria a contagem dos RTC F (Maier-Redelsperger e col. 1998a). Valores maiores do VCMr com o uso de HU, como aqui demonstrado, podem refletir indiretamente uma maior produção de RTC F, sendo útil no acompanhamento do tratamento com drogas que estimulam a síntese de Hb F.

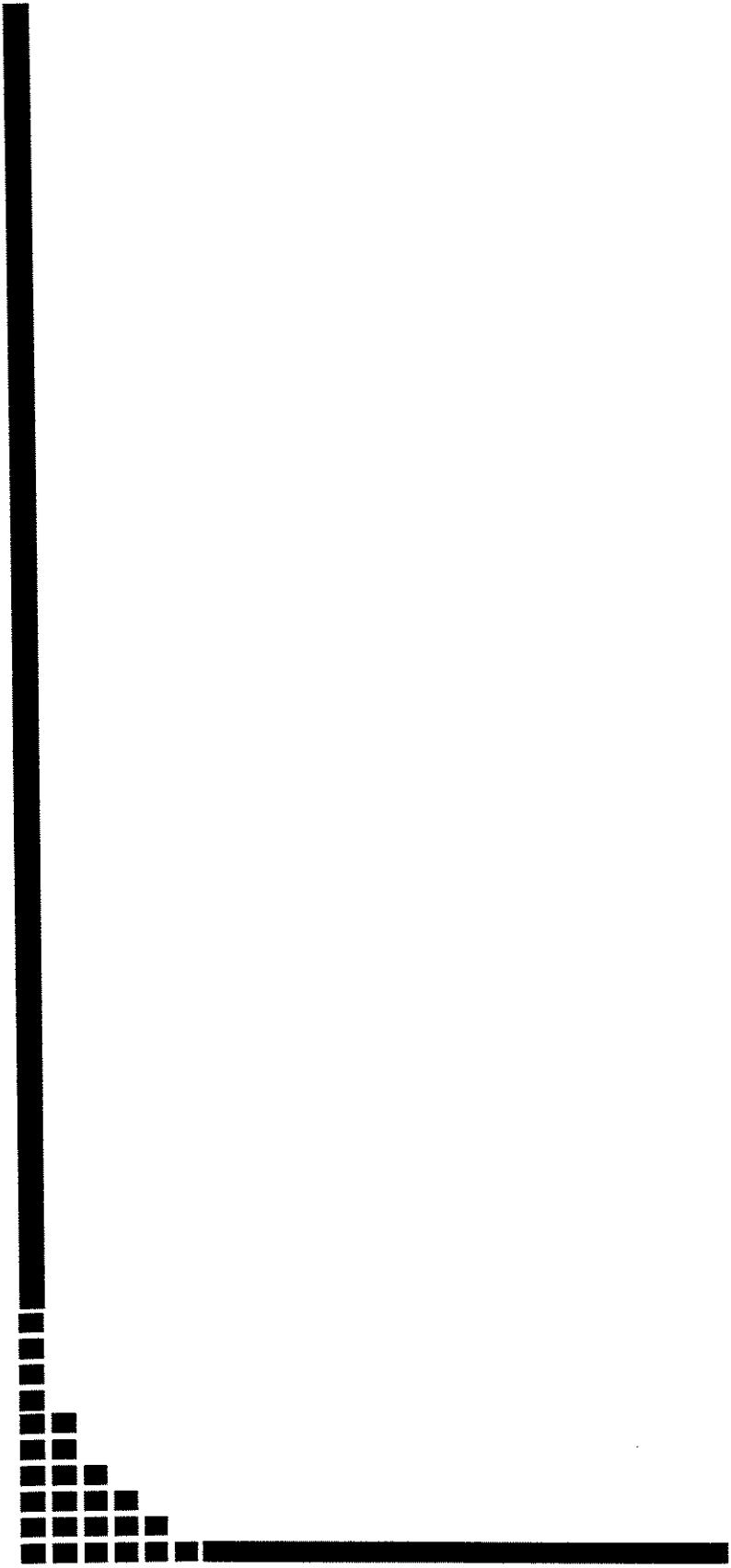
RTC são particularmente ativos na adesão de células falciformes à células endoteliais. RTC jovens aderidos ao endotélio aprisionam temporariamente hemácias maduras desoxigenadas, obstruindo o fluxo sanguíneo (Hebbel 2000). O processo de isquemia localizada e reperfusão podem causar um estado de inflamação crônica (Platt 2000). Nesse processo os leucócitos também participam, e altas contagens de leucócitos tem sido consideradas fatores de risco no desenvolvimento de síndromes dolorosas e em infartos (Castro e col. 1994; Kinney e col. 1999).

Uma redução no processo de adesão facilitaria o movimento de eritrócitos, através do fluxo capilar antes do processo de falcização. Assim, a redução no número de RTC após terapia com HU poderia melhorar o curso clínico de pacientes com doença falciforme, independente da indução da síntese de Hb F (Bridges e col. 1996). Nossos resultados apoiam estas evidências conseqüentes à terapia com HU. A imaturidade dos RTC e a mudança no volume dos RTC, podem fornecer dados interessantes sobre os efeitos da HU na produção de Hb F e sobre a cinética eritróide nas SF.



## ***7. CONCLUSÕES***

1. Pacientes com SF durante tratamento com HU apresentaram maiores concentrações de Hb, Hb F, Hb F/cel F e porcentagem de cels F do que o grupo sem HU.
2. Os números de RTC%, RTC# e MFI# foram inferiores e o VCMr foi superior nos pacientes tratados com HU.
3. Valores de BI e urobilinogênio semelhantes nos grupos com e sem HU, sugerem que o menor número de RTC nos pacientes tratados não foi determinado pela redução no processo hemolítico.
4. A forte correlação entre Hb F e cels F sugere que somente a determinação da Hb F é suficiente para avaliar a sua produção nos pacientes usando HU.
5. Maiores volumes das hemácias e dos RTC provavelmente advém da maior concentração de Hb, embora não possa ser descartada a possibilidade de uma maior hidratação das células ter contribuído para a elevação do volume celular.
6. O VCMr pode ser utilizado como um parâmetro laboratorial adicional na avaliação da resposta ao tratamento com HU em pacientes com SF.
7. O pequeno número de pacientes analisados reforça a importância de estudos multicêntricos, que permitiria uma casuística mais abrangente e a possibilidade de resultados mais consistentes.

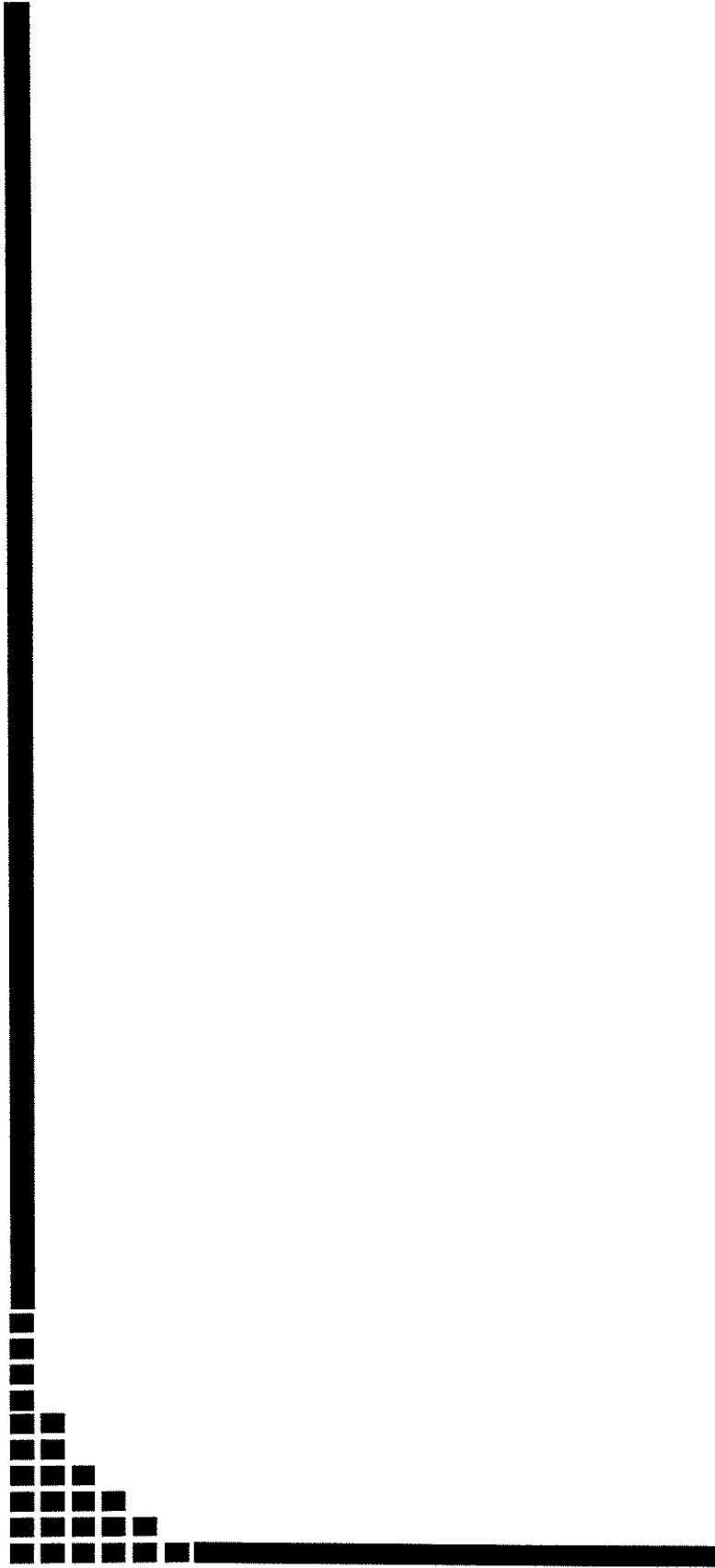


**8. SUMMARY**

Haemoglobin F (HbF) is an effective inhibitor of HbS polymerisation. Hydroxyurea (HU) is used to increase HbF synthesis and to improve the clinical course of the sickle cell disease (SCD) patients. We studied a series of laboratorial parameters concerning to HbF production and reticulocyte response and compared the data between 2 groups: 13 SCD patients treated with HU and 33 SCD patients without treatment. Higher Hb concentration, mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean reticulocyte volume (MRV), HbF concentration, percentage of Fcell and proportion of HbF/Fcell were observed in the treated group of patients. There was no correlation between Hb and HbF increase. Reticulocyte count, immature reticulocyte count, mean fluorescence index (MFI) and neutrophil count were significantly lower in treated patients. These findings taken together suggest that a milder hemolytic process occurred in patients under HU treatment. There was significant correlation between MCV and HbF, MRV and HbF, and between MRV and Fcell in patients taking HU. These data suggest that macroreticulocytes correspond to Freticulocytes, and that the increased MRV in SCD patients using HU may be an indirect evidence of Fcell production. Concentration of HbF/Fcell was higher in patients treated with HU, but it is apparently independent Fcell production. RTC parameters provided by hematological analysers may be useful to follow erythropoietic changes in patients using HU and can, indirectly, indicate HbF and Fcell production induced by HU therapy.

Keywords: sickle cell diseases, reticulocyte, hydroxyurea, HbF, reticulocyte immaturity.





***9. REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

1. Ballas SK, Marcolina MJ, Dover GJ & Barton FB and the Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea Sickle Cell Anemia (1999). Erythropoietic activity in patients with sickle cell anemia before and after treatment with hydroxyurea. *British Journal of Haematology* **105**: 491-496.
2. Ballas SK, Dover GJ & Charache S (1989). Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. *American Journal of Hematology* **32**: 104-111.
3. Blau C, Constantoulakis P, Al-Khatti A, Spadaccino E, Goldwasser E, Papayannopoulou T & Stamatoyannopoulos G (1993). Fetal hemoglobin in acute and chronic states of erythroid expansion. *Blood* **81**: 227-233.
4. Beutler E (2001). The sickle cell diseases and related disorders. In: Williams WJ, Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ, Seligsohn U (eds). Hematology, 6<sup>a</sup> ed. New York- McGraw Hill Companies.
5. Bridges KR, Barabino GD, Brugnara C et al (1996). A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing Hydroxyurea therapy. *Blood* **88**: 4701-4710.
6. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T & Platt O (1999). Reticulocyte content to diagnose iron deficiency in children. *Journal of American Medical Association* **16**: 2225-2230.
7. Brugnara C (1998). Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *International Journal of Clinical Laboratory Research* **28**: 1-11.
8. Brugnara C, Zelmanovic D, Sorette M, Ballas SK & Platt O (1997). Reticulocyte hemoglobin. An integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity. *American Journal of Clinical Pathology* **108**: 133-142.
9. Bunn HF (1997). Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine* **337**: 762-769.

10. Bunn HF & Forget BG (1986). Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects. Philadelphia- WB Saunders Company.
11. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B et al (1994). The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* **84**: 643-649.
12. Chang CC & Kass L (1997). Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *American Journal of Clinical Pathology* **108**: 69-73.
13. Charache S (1997). Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Seminars in Hematology* **34**: 15-21.
14. Charache S, Dover GJ Moore RD et al (1992). Hydroxyurea : effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood* **79**: 2555-2565.
15. Corberand JX (1996). Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematology Cell Therapy* **38**:487-494.
16. Costa FF (2001). Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R (eds). Hematologia: Fundamentos e Prática, 1ª ed. São Paulo- Atheneu.
17. Dacie JV & Lewis SM (1996). Practical Haematology, 8ª ed. Edinburgh- Churchill Livingstone.
18. Dalal BI, Stockford GR, Naiman SC, Spinelli JJ & Philips GL (1996). Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index conventional parameters. *Bone Marrow Transplantation* **17**:91-92.
19. Davies SV, Cavill I, Bentley N, Fegan CD, Poyton CH & Whittaker JA (1992). Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting. *British Journal of Haematology* **81**: 12-17.
20. Davis BH, Ornvolo K & Bigelow NA (1995). Flow cytometric reticulocyte maturity index: a useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. *Cytometry* **22**: 35-39.

21. Douglas NA & Frederick RD (1995). Doenças dos eritrócitos. In: Henry JB (ed). *Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais*, 18° ed. São Paulo-Manole.
22. Dover GJ & Charache S (1992). Hydroxyurea induction of fetal hemoglobin synthesis in sickle cell disease. *Seminars in Oncology* **19**: 61-66.
23. Dover GJ & Boyer SH (1987). Fetal hemoglobin-containing cells have the same mean corpuscular hemoglobin as cells without fetal hemoglobin levels among sickle cell individuals with two, three, and four  $\alpha$ -globin genes. *Blood* **69**: 341-344.
24. Dover GJ, Humphries RK, Moore JG, et al (1986). Hydroxyurea induction of hemoglobin F production in sickle cell disease: Relationship between cytotoxicity and F cell production. *Blood* **67**: 735-738.
25. Dover GJ, Boyer SH, Charache S & Heintzelman K (1978). Individual variation in the production and survival of F Cells in sickle-cell disease. *The New England Journal of Medicine* **299**: 1428-1435.
26. Eaton JW, Jacob HS & White JG (1979). Membrane abnormalities of irreversibly sickled cells. *Seminars in Hematology* **16**: 52.
27. Garner C, Tatu T, Reittie JE et al (2000). Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood* **95**: 342-346.
28. Goldberg MA, Brugnara C, Dover GJ, Schapira L, Charache S & Bunn HF (1990). Treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea and erythropoietin. *The New England Journal of Medicine* **323**: 366-372.
29. Grosveld F, Dillon N & Higgs D (1993). The regulation of human globin gene expression. *Clinical Haematology* **6**: 31-55.
30. Grotto HZW & Noronha JFA (2000). Evaluation of reticulocyte counting using the Pentra 120 Retic automated haematology analyzer: clinical application of mean fluorescence index (MFI) in bone marrow transplantation. *Jornal Brasileiro de Patologia* **36**: 234-240.

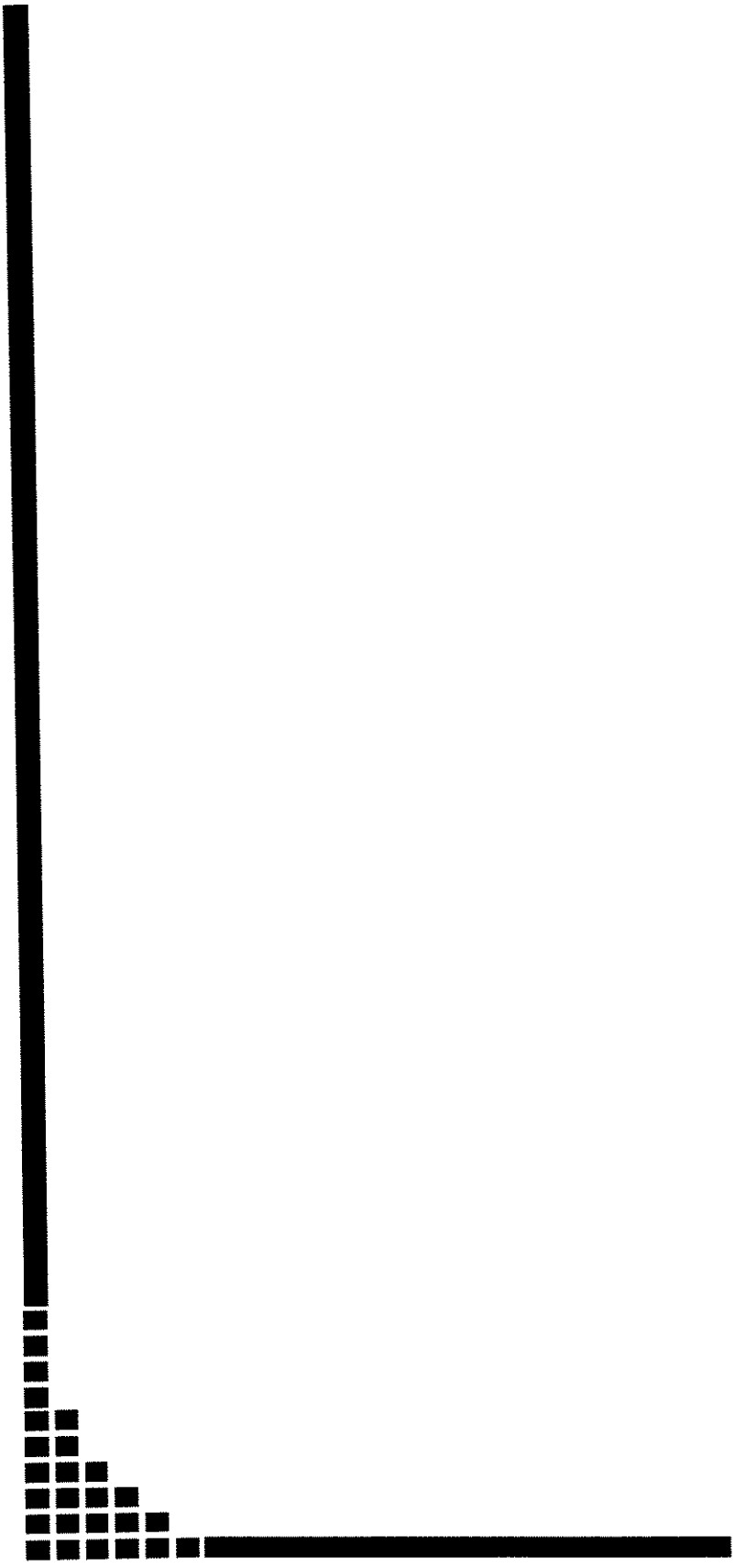
31. Grotto HZW, Vigoritto AC, Noronha JFA & Lima GALM (1999). Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clinical and Laboratory Haematology* **21**: 285-287.
32. Hebbel RP (2000). Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. *New England Journal of Medicine* **342**: 1910-1912.
33. Hellerstein S & Buntharungroj T (1974). Erythrocyte composition in sickle cell anemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **83**: 611.
34. Hoffbrand AV & Pettit JE (2001). Atlas colorido de Hematologia Clínica, 3ª ed. São Paulo- Editora Manole.
35. Hoffbrand AV & Pettit JE (1995). Genetic defects of haemoglobin. In: Hoffbrand AV et Pettit JE (eds). *Essential Haematology*, 3ª ed. Massachusetts- BlackWell Science.
36. Kaul DK & Hebbel RP (2000). Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *Journal of Clinical Investigation* **106**: 411-420.
37. Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC et al (1999). Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics* **103**: 640-645.
38. Kuse R (1993). The appearance of reticulocyte with medium or high RNA content is a sensitive indicator of beginning granulocyte recovery after aplasiogenic cytostatic drug therapy in patients with AML. *Annals of Hematology* **66**:213-214.
39. Lima CSP, Arruda VR, Costa FF & Saad STO (1997). Minimal doses of hydroxyurea for sickle cell disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **30**: 933-940.
40. Maier-Redelsperger M, Elion J & Girot R (1998a). F reticulocytes assay: a method to evaluate fetal hemoglobin production. *Hemoglobin* **22**: 419-425.

41. Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Flahault A et al (1998b). Fetal hemoglobin and F-cell responses to long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. *Blood* **91**: 4472-4479.
42. Maier-Redelsperger M, Noguchi CT, de Montalembert M et al (1994). Variation in fetal hemoglobin parameters and predicted hemoglobin S polymerization in sickle cell children in the first two years of life: Parisian prospective study on sickle cell disease. *Blood* **84**: 3182-3188.
43. Marcus SJ & Ware RE (1999). Physiologic decline in fetal hemoglobin parameters in infants with sickle cell disease: implications for pharmacological intervention. *Journal of Pediatric/Oncology* **21**: 407-411.
44. Marcus SJ, Kinney TR, Schuetz WH, O'Branki EE, Ware RE (1997). Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin ( F cells ) in children with sickle cell disease. *American Journal of Hematology* **54**:40-46.
45. Miller MK, Zimmerman SA, Schultz WH & Ware RE (2001). Hydroxyurea therapy for pediatric patients with hemoglobin SC disease. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* **23(5)**: 306-308.
46. Milner PF, Garbutt GJ, Nolan-Davis LV, Jonah F, Wilson LB & Wilson JT (1986). The effect of HbF and alpha-thalassemia on the red cell indices in sickle-cell anemia. *American Journal of Hematology* **21**: 383.
47. Ohene-Frempong K & Smith-Whitley K (1997). Use of Hydroxyurea in children with sickle cell disease: what comes next? *Seminars in Hematology* **34**: 30-41.
48. Olivieri NF & Weatherall DJ (1998). The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. *Human Molecular Genetics* **7**: 1655-1658.
49. Pearson HA (1996). Pharmacologic manipulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell diseases and thalassemia: promise and reality. *Advances in Pediatrics* **43**: 309-334.

50. Pembrey ME, Mac Wade P & Weatherall DJ (1972). Reliable routine estimation of small amounts of fetal haemoglobin by alkali denaturation. *Journal of Clinical Pathology* **25**:738-740.
51. Platt OS (2000). Sickle cell anemias as an inflammatory disease. *Journal of Clinical Investigation* **106**: 337-338.
52. Ramalho AS (1986). As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil. *Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto*.
53. Ramalho AS & Beilguelman B (1977). Sickle cell trait and tuberculosis. *Ciência e Cultura* **29**:1149.
54. Rodgers GP (1997). Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. *Seminars in Hematology* **34**:2-7.
55. Rosa RM, Bierer BE, Thomas R et al (1980). A study of induced hyponatremia in the prevention and treatment of sickle-cell crisis. *New England Journal of Medicine* **303**: 1138-43.
56. Salzano FM (1979). Abnormal hemoglobin studies and counseling in Brasil. In: Scott RB (ed). *International aspects of sickle cell disease*. Washington, Howard University Center for Cell Disease, 67-69.
57. Serjeant GR (1992). *Sickle Cell Disease*, 2<sup>a</sup> ed. Oxford- University Press.
58. Steinberg MH, Lu Z, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ and the Multicenter Study of Hydroxyurea (1997a). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. *Blood* **89**: 1078-1088.
59. Steinberg MH, Nagel RL & Brugnara C (1997b). Cellular effects of hydroxyurea in Hb SC disease. *British Journal of Haematology* **98**: 838-844.
60. Torres A, Sánchez J, Lakomsky D et al (2001). Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* **86**: 24-29.

61. Tsuda I & Tatsumi N (1989). Maturity of reticulocytes in various hematological disorders. *European Journal of Haematology* **43**:252-254.
62. Wheatherall DJ (2001). The thalasseмии. In: Willians WJ, Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ, Seligsohn U (eds). *Hematology*, 6<sup>a</sup> ed. New York- McGraw Hill Companies.
63. Wheatherall DJ & Clegg JB (1981). *The thalassemia syndromes*, 4<sup>a</sup> ed. Oxford- BlackWell Scientific Plub.
64. Winslow RM & Anderson WF (1978). The hemoglobinopathies. In: Stanbury JB, Wyngarden JB, Friedrickson DS (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill.
65. Wood WG (1993). Increased HbF in adult life. *Clinical Haematology* **6**: 177-213.
66. Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G & Nute PE (1975). F-cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of HbF. *Blood* **46**: 671-682.
67. Veith R, Galanello R, Papayannopoulou T et al (1984). Stimulation of F-cell production in patients with sickle cell anemia trated with cytarabine or hidroxyurea. *New England Journal of Medicine* **313**: 1571-1575.
68. Xu J & Zimmer DB (1998). Differential regulation of A gamma and G gamma fetal hemoglobin mRNA levels by hydroxyurea and butyrate. *Experimental Hematology* **26**(3): 265-272.
69. Yarbro JW (1992). Mechanism of action of Hydroxyurea. *Seminars in Oncology* **19**: 1-10.
70. Zago MA, Costa FF & Bothera C (1982). Teste de solubilidade quantitativo modificado em hemolisados e em variantes da hemoglobina. *Revista Paulista de Medicina* **100**:15-17.
71. Zago MA & Costa FF (1985). Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. *Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* **79**(3): 385-8.





## *10. APÊNDICE*

**EFFECTS OF HYDROXYUREA ON HAEMOGLOBIN, RETICULOCYTE AND  
FETAL HEMOGLOBIN IN SICKLE CELL DISEASE**

Borba, R.

Lima, CSP

Grotto, HZW

Department of Clinical Pathology and HEMOCENTRO

State University of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil

Correspondence address:

Helena Zerlotti Wolf Grotto

Departamento de Patologia Clínica

Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP

Caixa Postal 6111, CEP 13083-970

Campinas, São Paulo, Brasil

Fax 55 19 3788 9434

Email: [grotto@fcm.unicamp.br](mailto:grotto@fcm.unicamp.br)

Running title: Reticulocyte and HbF in SCD patients under HU treatment

## INTRODUCTION

High haemoglobin F (HbF) level may improve the clinical course of sickle cell disease (SCD) patients. HbF is an effective inhibitor of polymerisation of deoxyhemoglobin S and, consequently, diminishes the sickling process (Goldberg, Husson & Bunn 1977). Hydroxyurea (HU), a S-phase cytotoxic agent, is widely used in the treatment of chronic myeloproliferative disorders. HU interferes in DNA synthesis by inhibition of the ribonucleoside diphosphate reductase, an enzyme that participates in the transformation of the deoxyribonucleotides in DNA synthesis (Yarbro 1992). The increase in the synthesis of HbF is associated with hypomethylation of the  $\gamma$ -globin gene promoter. Although the exact mechanism by which HU increases HbF is not completely understood, it is clear that HU has therapeutic value in sickle cell anaemia (Charache *et al* 1992, Lima *et al* 1997). Immature and larger reticulocytes are released from bone marrow during erythroid expansion in response to hemolysis. These reticulocytes coexpress adult and fetal globin (F reticulocytes) (Blau *et al* 1993, Nagel *et al* 1993). Patients with SC disease using HU showed a decrease in immature reticulocytes number and in cell density, but there was no statistically significant increase in percent HbF or absolute HbF levels (Steinberg, Nagel & Brugnara 1997). Immature reticulocytes can be identified by automated haematological analysers, according to fluorescent RNA content evaluated by flow cytometry. Parameters as mean corpuscular volume of reticulocytes (MRV) and mean fluorescence index (MFI) have been used in monitoring bone marrow transplantation and diagnosis and treatment of anaemia (Brugnara 1998, Tsuda & Tatsumi 1989, d'Onofrio *et al* 1996, Cavill 1993, Davies *et al* 1992).

We have studied the effect of HU administration on HbF production and on reticulocyte parameters in SCD patients.

## PATIENTS AND METHODS

### Eligibility requirements

Adult SCD patients seen at the University Hospital of Campinas and undergoing HU treatment were eligible for the study. The control group consisted of adult patients with SCD, who did not receive HU as part of the treatment. Transfusion-dependent individuals were excluded from the study. The diagnosis of sickle cell disease was based on clinical, familial, and laboratorial data, including cellulose acetate and acid agar gel electrophoresis and the estimation of A2 haemoglobin by elution (Wheatherall 81).

Informed consent for the study was obtained from all individuals included in the study, consistent with Ethic Committee recommendation.

### HU dose

The initial dose of HU (Bristol, Regensburg, Germany) was 10 mg/kg/day and was increased by 5 mg/kg/day every 8 weeks, unless toxicity was present, to a maximum dose of 20 mg/kg/day. Toxicity was defined by the presence of at least one of the following characteristics: reticulocyte count  $< 50.0 \times 10^9/l$ , neutrophil count  $< 2.0 \times 10^9/l$ , platelet count  $< 100.0 \times 10^9/l$  or decreased in Hb concentration.

### Laboratory studies:

#### *Complete blood count (CBC)*

CBC was carried out using Pentra 120 Retic (ABX-Horiba, France).

#### *Reticulocytes*

The analysis were performed flow cytometry using thiazole orange as fluorescent in two systems:

1. Pentra 120 Retic: after 25 seconds incubation time the following parameters were provided: number of reticulocytes in percentage (RTC%) and absolute counts (RTC#), three different reticulocyte maturity classes (Low – LFR, medium – MFR and high – HFR) according to RNA content, mean fluorescence index (MFI), mean reticulocyte volume (MRV) and corrected reticulocyte count according to anaemia degree (CRC).

2. FACSCalibur Flow Cytometer provided the number of reticulocytes in percentage (RTC-FC), using Retic-COUNT™ Reagent (Becton Dickinson Immunocytometry Systems - USA). For each sample 50,000 events were collected using CellQuest software and analysed by Retic-Count software (Becton Dickinson, USA).

#### **Hb F and Fcell measurement:**

HbF was quantified by alkali denaturation method (Pembrey, Mac Wade & Weatherall 1972). Fcell count was performed by fixing cells using glutaraldehyde 25% (Sigma Chemical Co, USA). The cells were permeabilized with Triton X-100 (Reagen Indústria Química SA, Brazil) and immunostained with mouse monoclonal antibody to human glycophorin and conjugated with R-Phycoerythrin (Caltag Laboratories, USA) and mouse monoclonal antibody to human fetal hemoglobin FITC (Caltag Laboratories, USA). Cells were analysed on a FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, USA). For each sample 50,000 events were collected and data were analysed by CellQuest software (Becton Dickinson, USA).

The amount of HbF in picograms per Fcell (HbF/Fcell) was calculated according to the formula (MHCx%HbF)/%Fcell (Marcus & Ware 1999).

#### *Statistical analysis*

The Mann-Whitney test was used to compare differences between groups. The association between variables was tested using the Spearman correlation coefficient. It was considered as significant the  $p$ -value  $\leq 0.05$ . All the calculations were made in SAS System for Windows, version 8.1, from SAS Institute Inc. 1999-2000 (Cary, NC, USA).

## **RESULTS**

Thirteen adult SCD patients (11 sickle cell anaemia, 1 S $\beta$  thalassemia and 1 haemoglobin SC) undergoing HU treatment and 33 controls (25 sickle cell anaemia, 6 S $\beta$  thalassemia, and 2 haemoglobin SC) were enrolled in the study.

HU dosage varied from 500 to 1500 mg/day (mean  $\pm$  SD: 910.0  $\pm$  319.36) and treatment periods varied between 7 and 72 months (mean  $\pm$  SD: 26,4  $\pm$  21.7) at the moment of blood collection for the study. No haematologic toxicity was observed in patients under HU treatment.

The haematologic data in SCD patients undergoing HU treatment and controls are shown in Table 1. The Hb, MCV and mean cell haemoglobin (MCH) were higher in patients under HU when compared with those observed in controls. Reticulocyte counts in percentage and absolute numbers were significantly lower in patients taken HU than in controls (Figure 1). Also the absolute number of immature reticulocytes represented by MFI# was lower in treated patients than in controls (Figure 2). On the other hand, the MRV values, percentages of HbF and Fcell, and HbF/Fcell amount were higher in patients under HU treatment than in controls (Figures 3 and 4).

The correlation coefficient data comparing haematologic parameters observed in SCD patients enrolled in the study are presented in Table 2.

There was no correlation among Hb values and HbF levels in patients taken HU and controls. There was a moderate correlation between MCV and HbF in patients treated with HU and this correlation was weak, but significant in controls. There was not correlation between MCV and Hb in both groups. MRV showed moderate correlation with Fcells count in both group and the correlation between MRV and HbF was significant only in group of patients using HU (Table 2). No correlation was observed among Hb values and RTC# count in both groups of patients.

In order to verify if HU dosage interfered with reticulocyte count and HbF levels, we tested the correlation between these variables. The results showed that the HU dosage was neither correlated with reticulocyte count ( $r = -0.1426$ ,  $p = 0.6419$ ), nor with MFI # ( $r = 0.0931$ ,  $p = 0.7621$ ) and with HbF % ( $r = 0.2911$ ,  $p = 0.3344$ ).

A good correlation was observed among HbF levels and Fcell numbers in both group of patients enrolled in the study. No correlations were observed among HbF values and RTC#, HbF values and MFI# and, HbF/Fcell and Fcell values in treated patients and controls.

Comparing two systems to quantify reticulocyte, we observed that values provided by FACSCalibur Flow Citometer (RTC-FC) are higher than values obtained from Pentra 120 Retic (Table 1). The correlation between them was good in a group of 29 tested samples ( $r= 0.7446, p < 0.0001$ ).

## DISCUSSION

The concentration of HbF influences clinical and laboratory features of SCD. HbF reduces polymerisation of deoxy HbS because hybrids of HbF and HbS do not enter the polymer. Consequently, SCD patients with the highest HbF levels have a decreased clinical and laboratory severity (Rodgers 1997).

HU is a chemotherapeutic drug that inactivates the ribonucleoside diphosphatase enzyme, thereby resulting in inhibition of cell division (Pearson 1996). It was found to be effective for the treatment of chronic myeloproliferative disorders (Yarbro 1992). The effects of HU on HbF production in patients with SCD have been related in several studies. The exact mechanism involved in increasing HbF production is not completely understood. It is suggested that during haematological stress, new stem cells are recruited and such progenitor cells have not yet had their gamma globin gene expression turned off (Yarbro 1992). However, the clinical and laboratory benefits of HU in SCD patients are not only due to a rise in HbF concentration, but also a variety of other effects, as increasing the red cell size, an improvement in deformability and cellular hydration (Olivieri & Weatherall 1998). Other haematology changes observed in patients under treatment were an increase in total haemoglobin level and a decrease in reticulocyte count, which suggest a reduction of hemolysis or a suppressive effect on effective erythropoiesis, as demonstrated by erythrocyte survival and ferrokinetics studies (Pearson 1996).

1992). When the increase in red blood cells survival is greater than the decrease of the production, an increase in Hb level is noted (Ballas *et al* 1999). In this study, the patients under HU treatment showed higher Hb level than controls.

Reticulocytes parameters have been used to evaluate bone marrow erythropoietic activity, in differential diagnosis of anaemia, in monitoring response in anaemia treatment and as early detector of engraftment in bone marrow transplantation (Brugnara 1998, Brugnara *et al* 1999, Dalal *et al* 1996, Davies *et al* 1992, Grotto *et al* 1999). Patients with sickle cell anaemia disease treated with HU showed a markedly decrease in Hb content of reticulocyte, an increase in MRV and a significant increase in the RBCHb/RTCHb ratio, suggesting an improved red blood cell survival (Brugnara *et al* 1997).

We introduced a new parameter in hemoglobinopathies investigation: the MFI. This is a precise parameter which quantifies global fluorescence intensity of the immature reticulocyte population and that showed to be useful as a predictor of engraftment in bone marrow transplantation (Torres *et al* 2001). Chang & Kass (1997) in a study of the clinical significance of immature reticulocyte fraction (IRF), suggest that the integration of IRF and the reticulocyte enumeration may indicate the erythroid response to anaemia. A decrease in IRF in patients with anaemia reflects a non-responsive or underresponsive marrow.

In the present study all patients treated with HU showed MFI% within reference range. Sixty-three % of patients presented normal RTC# value and 23% of patients showed RTC# values slightly above normal values, according to reference range for normal population, determined by using Pentra 120 Retic equipment (Grotto & Noronha 2000). The majority of controls (78%) presented RTC# values higher than normal limit. Although the percentage of MFI was similar in both groups, MFI in absolute count indicated that an elevated number of immature reticulocytes were being released from bone marrow to circulation in controls.

Steinberg *et al* (1997) hypothesized that myelosuppression might be a prerequisite for HU to increase HbF. According to Ohene-Frempong & Smith-Whitley (1997) some of the toxicity parameters are absolute neutrophil counts less than 2,000/ $\mu$ l and absolute reticulocyte count less than 80,000/ $\mu$ l. Our results showed that patients taking HU had a lower neutrophil and reticulocyte counts than controls, but no patients in this study reached values indicative of marrow toxicity according to the used criteria.



We found higher Hb levels and lower mature and immature reticulocyte numbers in patients under HU treatment than in controls, and therefore, we supposed that reduced hemolysis occurred in treated patients, according to suggestion made by other authors (Charache *et al* 1992, Ballas, Dover & Charache 1989, Ballas *et al* 1999). However, as we did not find difference in total bilirubin levels in both groups of patients enrolled in the study and we did not perform erythrocyte survival or ferrokinetics studies, it was not possible for us to exclude the myelosuppressive effect of the HU in our cases.

In a study to evaluate the adequacy of low doses of HU in the treatment of SCD was observed significant lower reticulocyte values in high HU dosages. As we could observe, the decrease in reticulocyte counts was not correlated with the increase in Hb concentration or with the decrease in neutrophil counts (Lima *et al* 1997).

Our patients taking HU showed MCV values higher than controls, as related previously (Charache *et al* 1992, Ballas *et al* 1999). Because the percentage of patients with other hemoglobinopathies that course with microcytosis was higher in group without HU, we analysed MCV only in SS patients. We could observe that 78% of controls presented MCV below 100 fl and 81,8% of patients receiving HU showed MCV above 100 fl. Then, the difference in MCV between groups probably was determined by HU effect in patients under treatment. The correlation between MCV and HbF reinforces this concept, as noted by others (Charache *et al* 1992). Changes in cellular hydration may be indicated by the high MHC (Charache *et al* 1992) and can explain the high median value observed in group receiving HU. The high Hb content seems to be responsible for the expanding volume of cells more than an effect of chemotherapy (Charache *et al* 1992, Milner 1986)

A study that evaluated the laboratorial and clinical responses in paediatric patients with severe SC disease to HU therapy showed a significant increase in HbF and Fcell percentages, without changes in haemoglobin concentrations, reticulocyte counts and total bilirubin measurements. All patients improved clinically and the increase in HbF parameters was much higher than in the adult pilot trial, probably because adult with HbSC disease are subjects to a long-term genetic silencing of  $\gamma$  globin genes (Miller *et al* 2001).

The Hb F levels in sickle cell disease depend on three processes: F cell production, Hb F biosynthesis within Fcell and preferential Fcell survival. HbF production response is the result of a combination and degree of equilibrium among these three processes (Dover *et al* 1978). Then, the quantification of Fcell is an important laboratorial parameter in evaluating HbF production in SCD (Maier-Redelsperger, Eliot & Girot 1998). Wood *et al* (1975), using anti-HbF antibodies conjugated with FITC in fixed smears determined that the distribution of HbF-containing cells in normal persons was  $2.7\% \pm 1.4\%$  and ranged from 30% to 59% in five patients with sickle cell anaemia. More recently the percentage of Fcell was quantified using a flow cytometer in a large group of SCD children. The results of quantitation of % Fcell were similar to the observed in our adult patients group under HU treatment (  $\bar{x} = 55.9 \pm 19.9$  and  $\bar{x} = 58.75 \pm 19.46$ , respectively) (Marcus *et al* 1997). Although the amount of HbF/Fcell was higher in patients taking HU than in controls, none of the patients reached the threshold value of 15 pg of HbF/Fcell, suggested as adequate to interfere in sickling process (Marcus & Ware, 1999). Our median value of HbF/Fcell was lower than those observed in other studies (Goldberg *et al* 1990, Dover *et al* 1978), but it was near to reported in two patients treated with HU for longer than 7 years (Dover & Charache 1992). There was no correlation between the amount of HbF/Fcell and Fcell count. These data support the idea that both variations of HbF/Fcell and Fcell count are independent and possibly regulated by different genetic factors (Maier-Redelsperger *et al* 1994, Steinberg, Nagel & Brugnara 1997).

Significant correlations between MRV and HbF levels and between MRV and Fcell observed in patients who took HU suggest that macroreticulocytes contain higher HbF concentration than oldest erythroid cells and correspond to so-called F reticulocytes. These reticulocytes coexpress adult and fetal globin and are produced with acute erythroid stimulation (Blau *et al* 1993). Fcell number is the result of Fcell production and selective peripheral lysis of non-Fcells. On the other hand, F reticulocytes directly reflect changes in F cell production (Maier-Redelsperger, Eliot & Girot 1998).

RTC are particularly active in adhesion of sickle cells to endothelial cells. A reduction in the adhesive process would facilitate movement of erythrocytes through the capillary bed before sickling occurs. Thus, the reduction in RTC number after HU therapy

could account for improving the clinical course of SCD patients, independent of HbF synthesis induction (Bridges *et al* 1996). The decreased neutrophil counts due to HU administration probably play a role in producing clinical benefit in SCD patients. Lower neutrophil number may limit the extent of tissue destruction and the severity of pain after vaso-occlusion and infarction (Charache 1997). Our results support these laboratorial evidences consequent to HU therapy. RTC immaturity and changes in RTC volume associated to HbF synthesis may provide interesting data about the effect of HU in HbF production and erythroid kinetics in SCD patients.

**Table I:** Haematologic data in 13 SCD patients under hydroxyurea treatment and 33 controls. Values in median and range.

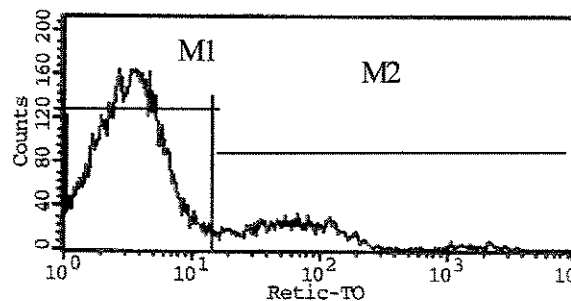
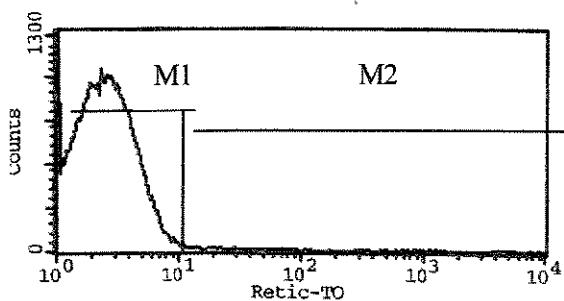
Variable	Patients under HU	Controls	P value
WBC (X10 <sup>9</sup> /l)	7.6 (3.3-12.5)	10.5 (5.4-21.4)	<b>0.0035</b>
Neut (X10 <sup>9</sup> /l)	3.53 (1.5-7.8)	5.45 (1.9-17.1)	<b>0.0097</b>
PLT (X10 <sup>9</sup> /l)	301.0 (144.0-625.0)	374.0 (100.0-605.0)	<b>0.09235</b>
Hb (g/dl)	9.1 (7.3-11.7)	8.1 (6.3-11.1)	<b>0.0490</b>
MCV (fl)	110.0 (91.0-128.0)	91.0 (64.0-109.0)	<b>&lt; 0.0001</b>
MCH (pg)	35.7 (28.7-44.1)	28.8 (19.4-36.7)	<b>0.0001</b>
RDW (%)	16.4 (15.0-24.7)	23.5 (16.3-29.6)	<b>0.0002</b>
RTC(%)	2.4 (1.1-7.8)	6.59 (0.32-11.2)	<b>0.0058</b>
RTC% (FC)	5.4 (2.9-14.0)	8.4 (1.5-15.6)	<b>0.0564</b>
CRC(%)	1.97 (0.7-5.13)	3.7 (0.2-7.1)	<b>0.0180</b>
RTC# (X10 <sup>9</sup> /l)	74.9 (26.5-216.7)	174.5 (11.3-397.8)	<b>0.0015</b>
MFI(%)	17.4 (5.77-26.60)	17.4 (9.0-31.2)	0.4207
MFI# (X10 <sup>9</sup> /l)	13.86 (1.89-43.97)	29.4 (1.9-97.4)	<b>0.0128</b>
MRV (fl)	125 (108-142)	110.0 (78.0-137.0)	<b>0.0003</b>
HbF (%)	14.2 (5.1-20.2)	5.6 (0.8-16.6)	<b>0.0003</b>
Fcell (%)	57.0 (27.4-94.3)	25.6 (2.6-73.0)	<b>0.0008</b>
HbF/Fcell (pg/cell)	7.9 (5.3-13.4)	5.9 (2.6-13.1)	<b>0.0003</b>
Tbil (mg/dl)	2.0 (0.9-3.3)	3.1 (1.0-10.9)	0.1372

WBC: white blood cells count, Neut: neutrophil count, PLT: platelet count, Hb: haemoglobin concentration, MCV: mean cell volume, MCH: mean cell haemoglobin, RDW: red cell distribution width, RTC: reticulocyte count measured by Pentra 120 Retic, RTC-FC: reticulocyte count measured by FACSCalibur Flow Cytometer, CRC: corrected reticulocyte count, RTC#: reticulocyte absolute count, MFI: mean fluorescence index, MRV: mean reticulocyte volume, HbF: haemoglobin F concentration measured by alkali denaturation method, Fcell: Fcell count measured by FACSCalibur Flow Cytometer, HbF/Fcell: amount of HbF per Fcell, TBil: total bilirubin.

**Table 2:** Correlation coefficient data comparing haematologic parameters observed in 13 patients under hydroxyurea treatment and 33 controls.

Variables	With HU		Controls	
	R	P value	R	P value
Hb x HbF	0.0247	0.9359	0.2277	0.2099
MCV x HbF	<b>0.6437</b>	<b>0.0176</b>	<b>0.4053</b>	<b>0.0214</b>
MCV x Hb	-0.0013	0.6936	-0.1812	0.3127
MRV x HbF	<b>0.5777</b>	<b>0.0387</b>	0.2739	0.1292
MRV x MFI#	0.1210	0.6936	0.0620	0.7316
MRV x Fcell	<b>0.5667</b>	<b>0.0434</b>	<b>0.4046</b>	<b>0.0216</b>
HbF x Fcell	<b>0.7582</b>	<b>0.0027</b>	<b>0.9342</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
HbF x RTC#	-0.5109	0.0743	0.2742	0.1287
HbF x MFI#	-0.3296	0.2713	-0.0170	0.9262
Hb x RTC#	0.2644	0.3826	0.2021	0.2592
HbF/Fcell x Fcell	0.0494	0.8725	0.2895	0.1079

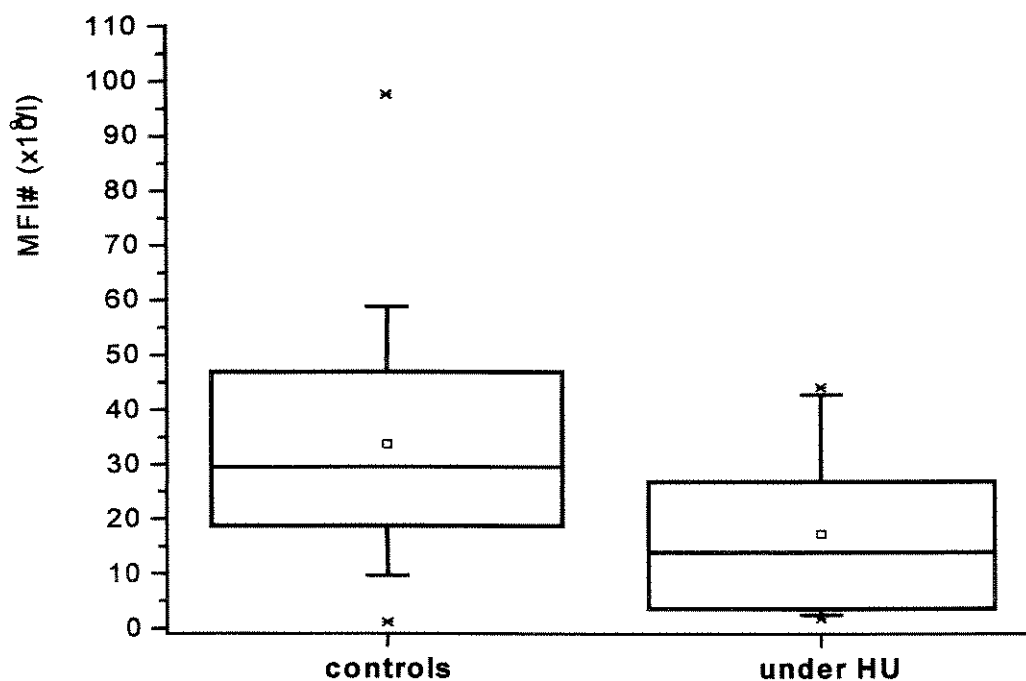
Hb: haemoglobin concentration, HbF: haemoglobin F concentration, MCV: mean cell volume, MRV: mean reticulocyte volume, MFI: mean fluorescence index, RTC #: reticulocyte absolute count, Fcell: Fcell count, HbF/Fcell: amount of HbF per Fcell.



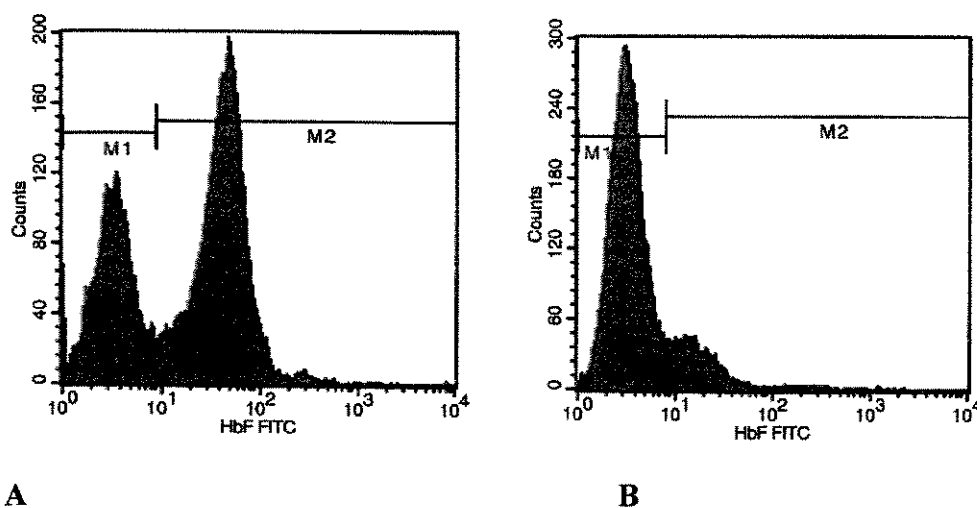
A

B

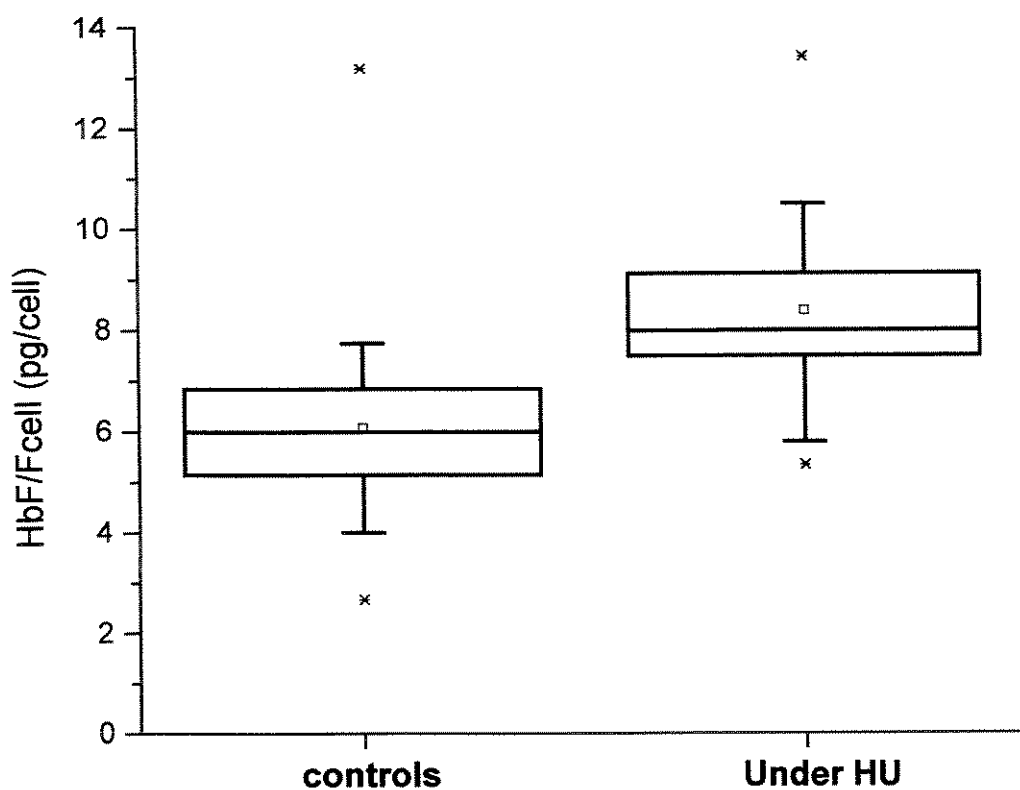
**Figure 1:** Erythrocyte and reticulocyte counts measured by FACSCalibur Flow Cytometer, using thiazole orange as fluorochrome (Retic-TO) in A: a SCD patient under HU treatment showing erythrocytes (M1) and 1.5% reticulocytes (M2) and B: a control showing erythrocytes (M1) and 18.0% reticulocytes (M2)



**Figure 2:** Boxplots related to Mean Fluorescence Index (MFI) # in 33 controls and 13 SCD patients under hydroxyurea treatment.



**Figure 3:** Erythrocytes and F cell counts measured by FACSCalibur Flow Cytometer using human fetal haemoglobin FITC as fluorochrome (HbF FITC) in A: a SCD patient under HU treatment showing: erythrocytes that not contain HbF (M1) and containing 65% HbF (M2) and B: a control showing erythrocytes that not contain HbF (M1) and erythrocytes containing 16% HbF (M2)



**Figure 4:** Boxplots related to HbF/Fcell in 33 controls and 13 SCD patients under hydroxyurea treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS: This study was supported by FAEP (UNICAMP) (No 0303/01) and CNPq. We are thankful to the Statistical Committee, FCM, UNICAMP, especially Ms. Cleide A. Moreira Silva, and Ms. Fernanda G. Pereira (HEMOCENTRO/UNICAMP) and Ms. Elza M. Kimura for technical assistance.

## REFERENCES

- Ballas S.K., Dover G.J. & Charache S. (1989). Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. *American Journal of Hematology* **32**, 104-111.
- Ballas S.K., Marcolina M.J., Dover G.J. & Barton F.B and the Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea Sickle Cell Anemia (1999). Erythropoietic activity in patients with sickle cell anaemai before and after treatment with hydroxyurea. *British Journal of Haematology* **105**, 491-496.
- Blau C., Constantoulakis P., Al-Khatti A., Spadaccino E., Goldwasser E., Papayannopoulou T. & Stamatoyannopoulos G. (1993). Fetal hemoglobin in acute and chronic states of erythroid expansion. *Blood* **81**, 227-233.
- Bridges K.R., Barabino G.D., Brugnara C. et al (1996). A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing Hydroxyurea therapy. *Blood* **88**, 4701-4710.
- Brugnara C. (1998). Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* **28**, 1-11.
- Brugnara C., Zelmanovic D., Sorette M., Ballas S.K. & Platt O. (1997). Reticulocyte hemoglobin. An integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity. *American Journal of Clinical Pathology* **108**, 133-142.
- Brugnara C., Zurakowski D., DiCanzio J., Boyd T. & Platt O. (1999). Reticulocyte content to diagnose iron deficiency in children. *Journal of American Medical Association* **16**, 2225-2230.
- Cavill I. (1993). Annotation. The rejected reticulocyte. *British Journal of Haematology* **84**, 563-565.
- Chang C-C. & Kass L. (1997). Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *American Journal of Clinical Pathology* **108**, 69-73.

- Charache S. (1997). Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Seminars in Hematology* **34**, 15-21.
- Charache S., Dover G.J. Moore R.D. et al. (1992). Hydroxyurea : effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood* **79**, 2555-2565.
- D'Onofrio G., Tichelli A., Foures C. & Theodorsen L. (1996). Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. *Clinical and Laboratory Haematology* **18**, 45-53.
- Dalal B.I., Stockford G.R., Naiman S.C., Spinelli J.J. & Phillips G.L. (1996). Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplantation* **17**, 91-92.
- Davies S.V., Cavill I., Bentley N., fegan C.D., Poyton C.H. & Whittaker J.A. (1992). Evaluaiton of erythropoiesis after bone marrow transplantatio: quantitative reticulocyte counting. *British Journal of Haematology* **81**, 12-17.
- Dover G. G. & Charache S. (1992). Hydroxyurea induction of fetal hemoglobin synthesis in sickle-cell disease. *Seminars in Oncology* **19**, 61-66.
- Dover G.J., Boyer S.H., Charache S. & Heintzelman K. (1978). Individual variation in the production and survival of F Cells in sickle-cell disease. *The New England Journal of Medicine* **299**, 1428-1435.
- Goldberg M.A., Brugnara C., Dover G.J., Schapira L., Charache S. & Bunn H.F. (1990). Treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea and erythropoietin. *The New England Journal of Medicine* **323**, 366-372.
- Goldberg M.A., Husson M.A. & Bunn H.F. (1977). The participation of hemoglobins A and F in the polymerization of sickle hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 3414-3421.
- Grotto H.Z.W. & Noronha J.F.A. (2000). Evaluation of reticulocyte counting using the Pentra 120 Retic automated haematology analyzer: clinical application of mean fluorescence index (MFI) in bone marrow transplantation. *Jornal Brasileiro de Patologia* **36**, 234-240.



- Grotto H.Z.W., Vigoritto A.C., Noronha J.F.A. & Lima G.A.L.M. (1999). Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clinical and Laboratory Haematology* **21**, 285-287.
- Lima C.S.P., Arruda V.R., Costa F.F. & Saad S.T.O. (1997). Minimal doses of hydroxyurea for sickle cell disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **30**, 933-940.
- Maier-Redelsperger M., Elion J. & Girot R. (1998). F reticulocytes assay: a method to evaluate fetal hemoglobin production. *Hemoglobin* **22**, 419-425.
- Maier-Redelsperger M, Noguchi C.T., de Montalembert M. *et al* (1994). Variation in fetal hemoglobin parameters and predicted hemoglobin S polymerization in sickle cell children in the first two years of life: Parisian prospective study on sickle cell disease. *Blood* **84**, 3182-3188.
- Marcus S.T., Kinney T.R., Schultz W.H., O'Branski E.E. & Ware R.E. (1997). Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (f cells) in children with sickle cell disease. *American Journal of Hematology* **54**, 40-46.
- Marcus S.J. & Ware R.E. (1999). Physiologic decline in fetal hemoglobin parameters in infants with sickle cell disease: implications for pharmacological intervention. *Journal of Pediatric/Oncology* **21**, 407-411.
- Miller M.K., Zimmerman S.A., Schultz W.H., Ware, R.E. (2001). Hydroxyurea therapy for pediatric patients with hemoglobin SC disease. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* **23**, 306-308.
- Milner P.F., Garbutt G.J., Nolan-Davis L.V., Jonah F., Wilson L.B., Wilson J.T. (1986). The effect of HbF and alpha-thalassemia on the red cell indices in sickle-cell anemia. *American Journal of Hematology* **21**, 383.

- Nagel R.L., Vichhinsky E., Shah M. et al. (1993). F reticulocyte response in sickle cell anemia treated with recombinant human erythropoietin: a double-blind study. *Blood* **81**, 9-14.
- Ohene-Frempong K. & Smith-Whitley K. (1997). Use of Hydroxyurea in children with sickle cell disease: what comes next? *Seminars in Hematology* **34**, 30-41.
- Olivieri N.F. & Weatherall D.J. (1998). The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. *Human Molecular Genetics* **7**, 1655-1658.
- Pearson H.A. (1996). Pharmacologic manipulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell diseases and thalassemia: promise and reality. *Advances in Pediatrics* **43**, 309-334.
- Pembrey M.E., Mac Wade P. & Weatherall D.J. (1972). Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. *Journal of Clinical Pathology* **25**, 738-740.
- Rodgers G.P. (1997). Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. *Seminars in Hematology* **34**, 2-7.
- Steinberg M.H., Lu Z., Barton F.B., Terrin M.L., Charache S., Dover G.J., and the Multicenter Study of Hydroxyurea (1997). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. *Blood* **89**, 1078-1088.
- Steinberg M.H., Nagel R.L. & Brugnara C. (1997). Cellular effects of hydroxyurea in Hb SC disease. *British Journal of Haematology* **98**, 838-844.
- Torres A., Sánchez J., Lakomsky D. et al. (2001). Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* **86**, 24-29.
- Tsuda I. & Tatsumi N. (1989). Maturity of reticulocytes in various hematological disorders. *European Journal of Haematology* **43**, 252-254.
- Weatherall D.J. & Clegg J.B. (1972). *The thalassemia Syndrome*. 2<sup>nd</sup> edn.. Blackwell Scientific Publish, Oxford.

Wood W.G., Stamatoyannopoulos G. , Lim G. & Nute P.E. (1975). F-cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of HbF. *Blood* **46**, 671-682.

Yarbro J.W. (1992). Mechanism of action of Hydroxyurea. *Seminars in Oncology***19**, 1-10.