

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Adaptação e avaliação da técnica de citometria de fluxo para detecção de corpos de
Heinz**

Letícia Terres Rodrigues

Porto Alegre, junho de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Adaptação e avaliação da técnica de citometria de fluxo para detecção de corpos de
Heinz**

Letícia Terres Rodrigues

Prof. Dra. Simone Martins de Castro

Orientadora

Dra. Mariela Granero Farias

Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2019.

Este manuscrito foi elaborado segundo as normas da *International Journal of Laboratory Hematology* na qualidade de “Artigo Original” (Anexo I). A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca avaliadora.

Adaptação e avaliação da técnica de citometria de fluxo para detecção de corpos de Heinz

Letícia Terres Rodrigues¹, Mariela Granero Farias², Suzane Dal Bó², Simone Martins de Castro¹

¹Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil

Autor correspondente:

Prof^a Dra. Simone Martins de Castro

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Ipiranga, 2752, sala 304B, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90.610-000

E-mail: simonecastro13@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION: Heinz bodies are inclusions present in red blood cells, which is the result of precipitated unstable hemoglobins. It can be found in samples of patients who have hemoglobinopathies. The currently method for Heinz bodies visualization use optical microscopes which has lack of sensitivity and is rarely used. The compound acetylphenylhydrazine induce the production of fluorescents Heinz bodies. The main aim of the current study was to evaluate and adapt the flow cytometry technique to detect the fluorescent Heinz bodies induced *in vitro* by acetylphenylhydrazine.

METHODS: Whole blood-samples from normal controls, patients with alpha thalassemia and syckle cell disease were incubated with acetylphenylhydrazine and examined by flow cytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) was compared with the results of hemogram and hemoglobin eletrophoresis.

RESULTS: It was standardize the stability and the amount of sample needed to perform this technique. Amongst the hematologic parameters, it was found positive correlation between MFI and VCM, HCM and CHCM. The patients with syckle cell disease had significantly higher MFI than controls and alpha thalassemic patients. Also, we found positive correlation between MFI and HbS. In the alpha thalassemia group, no significantly difference in MFI was found when compared to control samples.

CONCLUSION: It was possible to detect fluorescent Heinz bodies induced by acetylphenylhydrazine by flow cytometry in alpha thalassemic and sickle cell disease patients. Further analyses are necessary to evaluate the correlation between Heinz bodies and the severity of oxidative crisis in alpha thalassemic patients and between MFI with the mechanism of Heinz bodies production by acetylphenylhydrazine.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Corpos de Heinz são inclusões presentes nos eritrócitos, resultado de hemoglobinas instáveis e podem estar presentes em amostras de pacientes portadores de hemoglobinopatias. O método usado atualmente utiliza microscopia óptica, é pouco sensível e raramente utilizado. O composto acetilfenilhidrazina induz a produção de corpos de Heinz fluorescentes. O objetivo deste trabalho foi adaptar e avaliar a técnica de citometria de fluxo para detectar os corpos de Heinz induzidos *in vitro* por acetilfenilhidrazina.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram utilizadas amostras de sangue de controles normais, alfa-talassêmicos e portadores de síndromes falciformes que foram incubadas com acetilfenilhidrazina e analisadas por citometria de fluxo. As emissões médias de fluorescência (*mean fluorescence intensity* – MFI) foram comparadas com os resultados obtidos na eletroforese de hemoglobina e no hemograma.

RESULTADOS: Foram padronizadas a estabilidade das amostras e a quantidade de amostra necessária para a realização da técnica. Dentre os índices hematológicos, houve correlação positiva entre MFI e VCM, HCM e CHCM. Os pacientes portadores de síndromes falciformes obtiveram emissões médias de fluorescência significativamente mais altas que os controles e os alfa-talassêmicos e houve correlação positiva entre o aumento da emissão de fluorescência e a presença de HbS. Para os alfa-talassêmicos, não foi encontrada diferença significativa na emissão de fluorescência com relação aos controles normais.

CONCLUSÃO: Foi possível padronizar a técnica de citometria de fluxo para detecção dos corpos de Heinz induzidos por acetilfenilhidrazina em pacientes alfa-talassêmicos e portadores de síndromes falciformes. Futuras análises precisam esclarecer a correlação entre a produção de corpos de Heinz e a severidade de crises oxidativas em pacientes alfa-talassêmicos e a relação entre a emissão média de fluorescência obtida na citometria com o mecanismo de formação de corpos de Heinz pela acetilfenilhidrazina.

Palavras-chave: Corpos de Heinz, acetilfenilhidrazina, citometria de fluxo, alfa-talassemia, síndrome falciforme.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CORPOS DE HEINZ

Corpos de Heinz são inclusões presentes na membrana plasmática do eritrócito, resultado de precipitação de hemoglobinas instáveis. Normalmente, a instabilidade ocorre devido à oxidação da hemoglobina e afeta ligações entre aminoácidos, principalmente os da formação do grupo heme.¹ No início, achava-se que a presença de corpos de Heinz era indicativa de envenenamento causado por diversos compostos químicos. Hoje, já se sabe que eles podem estar presentes em amostras de pacientes com anemias hemolíticas,² portadores de talassemias, deficientes da enzima G6PD, na deficiência de NADPH, anemia falciforme e também nos pacientes intoxicados. O mecanismo fisiológico de remoção dos corpos de Heinz é pela hemólise dos eritrócitos por macrófagos esplênicos e, por esta razão, pacientes esplenectomizados também podem apresentar corpos de Heinz em suas células.

Alguns compostos são sabidamente capazes de produzir hemólise, entre eles estão a fenilhidrazina e seus derivados. Esta capacidade é conhecida desde o século XIX e até hoje é utilizada como modelo de estudos para fenômenos hemolíticos.^{3,4,5} Robert Heinz explorou a capacidade deste grupo de moléculas e descobriu as alterações eritrocitárias precursoras da lise celular. Em seu trabalho, usando amostras de diversos animais e um método específico de coloração, ele viu grânulos nos eritrócitos que Heinz representou, em desenhos, como estruturas redondas ou ovais, únicas ou em mais de uma, dentro de uma mesma célula e normalmente encontrados nas margens da membrana. Quase que ao mesmo tempo, Erlich também descreveu os mesmos grânulos em eritrócitos de animais envenenados e em amostras de indivíduos anêmicos. Por ter assinado prioridade sobre esta descoberta, ainda hoje os corpos de Heinz também são conhecidos como corpos de Ehrlich-Heinz.⁶

A acetilfenilhidrazina é um derivado de fenilhidrazina capaz de produzir corpos de Heinz *in vivo*. Os mecanismos de formação de corpos de Heinz e posteriores danos celulares causados pela administração da acetilfenilhidrazina parecem seguir os mesmos passos de outras drogas que produzem espécies oxidativas. São formados peróxido de hidrogênio, superóxido^{1,7,8} e outros intermediários como metemoglobina e hemicromo⁹ durante a reação entre a hemoglobina e o composto, que levam à peroxidação lipídica e de proteínas e degradação oxidativa de espectrina do citoesqueleto.⁸ Pasawan *et al.* descreveram a capacidade da acetilfenilhidrazina em estimular a produção de corpos de Heinz *in vitro* que, quando excitados por um laser, emitem fluorescência em um comprimento de onda detectável por microscópios de fluorescência e citometria de fluxo,¹⁰ sugerindo assim, um potencial método para análise de corpos de Heinz em amostras clínicas.

1.2 VISUALIZAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM LÂMINA

Para a visualização dos corpos de Heinz, a técnica considerada padrão ouro é a coloração com corantes supravitais como o azul de cresil brilhante e observação por microscopia óptica. Esta técnica exige trabalho manual e demanda algumas horas de incubação com o corante. Raramente tem sido utilizada na rotina dos laboratórios de análises clínicas por ser trabalhosa e pouco sensível. Portanto, o desenvolvimento de uma técnica de visualização utilizando a citometria de fluxo, que se mostre mais moderna e

rápida torna-se interessante para uma maior sensibilidade na detecção dos corpos de Heinz.

1.3 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica baseada na análise celular multiparamétrica, onde as células em suspensão são carregadas, uma-a-uma, até uma célula de fluxo onde serão interceptadas por uma fonte luminosa, normalmente emitida por um laser. A detecção dos parâmetros celulares a serem analisados se dá pela dispersão da luz, resultado das características físicas da célula como tamanho e complexidade ou pela excitação de componentes celulares ou corantes que emitirão fluorescência em um comprimento de onda mais alto que o de excitação do laser. Adicionalmente, pode-se utilizar anticorpos monoclonais ligados a moléculas fluorescentes (fluorocromos) para uma análise detalhada da população de interesse.¹¹

Através da citometria de fluxo é possível estudar mecanismos de morte celular, ciclo celular, produção de espécies reativas de hidrogênio, entre outros. Na clínica, seu princípio está incorporado nos analisadores automatizados de hemograma e já existem protocolos em uso para avaliação de doenças que afetam os eritrócitos. Assim, a técnica de citometria de fluxo se mostra um potencial método para a observação dos corpos de Heinz, visto que a metodologia usada na sua visualização não é trabalhosa, utiliza pouca amostra e não necessita de reagentes caros. Neste trabalho temos como objetivo principal adaptar e avaliar a técnica de detecção de corpos de Heinz por citometria de fluxo, pela emissão de fluorescência induzida por acetilfenilhidrazina, em amostras de pacientes portadores de anemias hemolíticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 170332. Foram utilizadas amostras de 21 pacientes ao todo e o sangue periférico foi coletado em tubo contendo EDTA-K3 como anticoagulante. As amostras foram mantidas refrigeradas até o momento das análises e o processamento foi realizado em até 24 horas após a coleta.

Para a realização deste trabalho, os pacientes foram divididos em três grupos, conforme resultados obtidos por eletroforese de hemoglobina ou biologia molecular. No grupo 1 (n=8) foram incluídos os pacientes controles normais, cujo critério de seleção foi o hemograma não apresentar alterações e o histórico médico descartar hemoglobinopatias ou doenças hematológicas. No grupo 2 (n=6) foram selecionados pacientes alfa-talassêmicos e no grupo 3 (n=7) os pacientes portadores de síndromes falciformes.

2.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ACETILFENILHIDRAZINA

A preparação da solução de acetilfenilhidrazina foi realizada conforme descrito previamente por Palaswan *et al.*¹² A solução foi preparada imediatamente antes da preparação das amostras na concentração de 1 mg/mL.

2.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Para esta padronização foi utilizado o citômetro de fluxo BD FACSVerser™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), equipado com um laser azul com excitação em 488 nm. A fluorescência emitida pelos corpos de Heinz foi detectada no canal FL-3 (cujo comprimento de onda de emissão máximo gira em torno de 568/575 nm, na mesma região do fluorocromo ficoeritrina (PE). O *software* utilizado na análise dos dados foi o FACSuite™ versão 1.0.6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para a seleção de eritrócitos e diminuição de debris, o *threshold* utilizado foi 200 e a escala logarítmica foi utilizada em todos os parâmetros analisados: *forward scatter* (FSC), *side scatter* (SSC) e canal de fluorescência (PE). O controle da performance do equipamento foi realizado conforme as orientações do fabricante utilizando as *CS&T Research Beads*. Foi definida como padrão a aquisição de 50 mil eventos no *gate* dos eritrócitos.

O protocolo de preparação das amostras utilizado como base foi o sugerido por Palaswan *et al.* em 2016.¹⁰ Foram feitas adequações nos volumes de amostra e tempos de centrifugação, baseado em protocolos já existentes para a análise de eritrócitos por citometria de fluxo.¹³ Após a coleta em tubo contendo EDTA-K3, homogeneizou-se a amostra e 1 mL do sangue total foi centrifugado por 3 minutos a 930g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Sucederam-se então, três lavagens com PBS (foram adicionados 500 uL de PBS, homogeneizou-se por inversão e foram feitas centrifugações a 930 g por 3 minutos, descartando-se o sobrenadante e repetindo o procedimento mais duas vezes). Após as três lavagens e a realização de testes com relação ao volume de hemácias lavadas a serem utilizados, definiu-se que 2 uL seria o volume

incubado com 1 mL da solução previamente preparada de acetilfenilhidrazina. A incubação foi realizada por 1 hora em banho-maria a 37°C.

Para cada uma das amostras analisadas, incluindo os controles normais, foi preparado um tubo controle de células não marcadas (controle PBS), utilizando o mesmo procedimento descrito acima, com a exceção da incubação com acetilfenilhidrazina, onde em seu lugar foi adicionado 1 mL de PBS. A fluorescência obtida no controle com PBS foi utilizada como *background* a fim de verificar se havia autofluorescência nas amostras.

As amostras dos pacientes alfa-talassêmicos e síndromes falciformes foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-Bio-Rad *β-Thalassemia Short Program™*) a fim de determinar o perfil qualitativo e quantitativo das frações hemoglobínicas. A investigação das alfa-talasseмии foi realizada através de um PCR-Multiplex, contemplando as principais formas deletionais ($-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $-\alpha^{20,5}$, $--^{SEA}$ e $--^{MED}$).^{14,15}

2.4 ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA

Para a adaptação da técnica de citometria de fluxo foi determinada a quantidade adequada de amostra a ser utilizada para as preparações. Para tanto, foram pipetadas 2uL, 5 uL, 10 uL e 20 uL de hemácias após as lavagens com PBS e incubadas com 1 mL de solução de acetilfenilhidrazina.

Em relação a estabilidade, as amostras foram analisadas após a incubação com acetilfenilhidrazina. A amostra foi preparada no dia 0 após a coleta e reanalisada após 24 horas e 48 horas. Para tanto, as amostras pós incubação foram armazenadas sob refrigeração (0 a 8°C) e ao abrigo da luz entre as análises.

Após a padronização do volume e estabilidade, as amostras incubadas com acetilfenilhidrazina foram avaliadas com relação as emissões médias de fluorescência (*mean fluorescence intensity* – MFI) e aumento percentual da emissão de fluorescência em relação ao controle normal (Delta%), que foi calculado conforme a equação a seguir:

$$\text{Delta\%} = \frac{\text{MFI amostra} - \text{MFI controle}}{\text{MFI controle}} \times 100$$

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão. Para comparar médias de FMI entre os grupos, a Análise de Variância (ANOVA) complementada por Tukey foi aplicada. Devido a assimetria do Delta% entre pacientes e controles normais, o teste da correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a associação com os índices hematológicos do hemograma e eletroforese de hemoglobina. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e as análises foram realizadas no software SPSS versão 21.0.

3. RESULTADOS

Na tabela 1, estão descritos os perfis hemoglobínicos encontrados nas eletroforeses dos pacientes do grupo talassêmico e das síndromes falciformes, a contagem de reticulócitos e o Delta%.

Tabela 1. Perfil hemoglobínico, contagem de reticulócitos e Delta% encontrado nos pacientes com talassemia e síndromes falciformes obtidos por HPLC.

Perfil dos pacientes dos grupos 2 e 3	Percentagens das cadeias hemoglobínicas				Delta (%)	Reticulócitos (%)
	HbA (%)	HbA2 (%)	HbF (%)	HbS (%)		
1. HbAA	96,60	3,10	0,30	0,00	-15,39	NR
2. HbAA	94,30	2,80	2,90	0,00	-10,62	NR
3. HbAS	65,80	3,50	0,20	30,50	36,60	NR
4. HbAA	96,10	2,90	1,00	0,00	-19,46	0,93
5. Hb SF	0,00	4,60	17,10	78,30	13,91	NR
6. HbASF*	28,20	3,50	12,20	56,00	37,97	8,93
7. HbAS*	56,20	3,60	0,40	39,80	7,52	23,7
8. HbSF	0,00	3,60	22,50	79,30	33,08	6,09
9. HbSS	0,00	3,70	0,90	95,40	1,08	NR
10. HbSS	0,00	3,20	11,20	85,60	48,31	NR

Legenda: NR - Não realizado. *Pacientes que receberam transfusão sanguínea.

O *gate* de aquisição representativo dos eritrócitos (FSCxSSC) foi semelhante para todos os grupos e está apresentado na Figura 1.

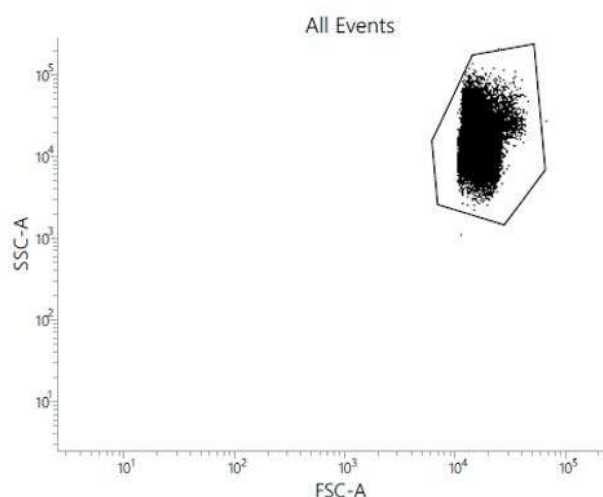


Figura 1. Dot plot de tamanho (FSC) versus complexidade (SSC) demonstrando o *gate* de aquisição para os eritrócitos.

Para a avaliação da emissão média de fluorescência (MFI) no canal FL-3 (PE), a melhor separação entre o pico do controle de hemácias incubadas com PBS e com acetilfenilhidrazina foi obtida com 2 uL (Figura 2).

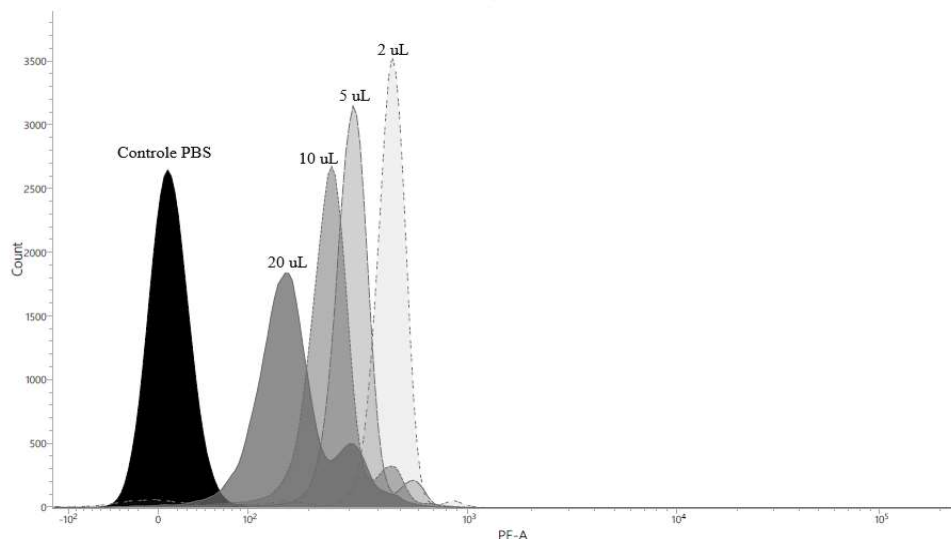


Figura 2. Histograma de paciente alfa-talassêmico no canal de fluorescência FL-3 (PE). Histograma representativo de três diferentes experimentos.

A estabilidade das amostras preparadas foi testada após 24 e 48 horas da preparação utilizando 2 uL das hemácias após as lavagens (Figura 3). Entre as análises, o material foi mantido refrigerado em entre 0° a 8°C.

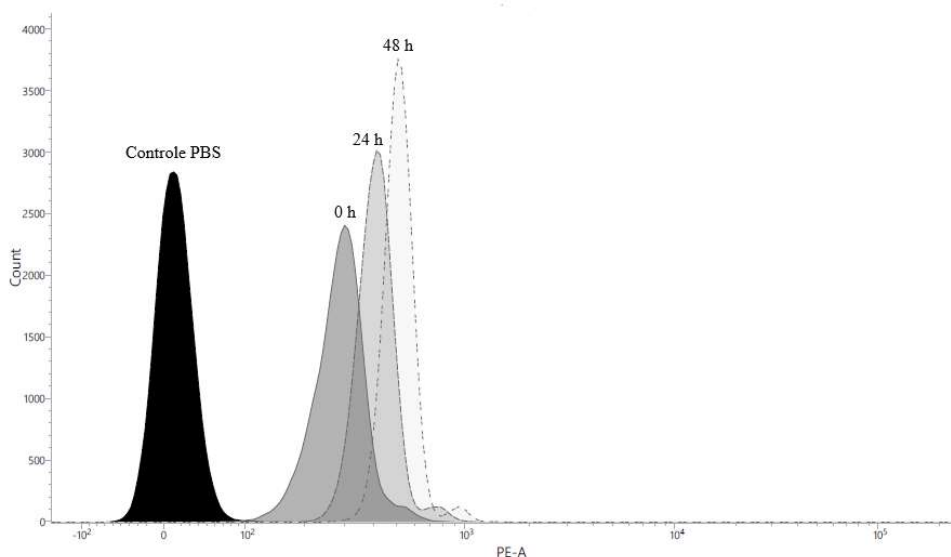


Figura 3. Histograma de paciente alfa-talassêmico. A emissão média de fluorescência aumentou após 24h e 48h. Histograma representativo de três diferentes experimentos.

Após a estimulação com acetilfenilhidrazina a MFI encontrada para o grupo 1 (controle normal) foi de 284,50 (n=8) com desvio padrão de 43,63. Para o grupo 2 (alfa-talassemia) foi 272,17 (n=6) com desvio padrão de 53,30 e para o grupo 3 (síndromes falciformes) foi 355,29 (n=7) com desvio padrão de 45,38. Houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,009$). O grupo com Síndromes Falciforme apresentou valores de FMI significativamente mais elevados que o controle ($p=0,024$) e talassêmicos ($p=0,014$).

Entre o grupo controle e os talassêmicos, a diferença não foi significativa ($p=0,879$) (Figura 4).

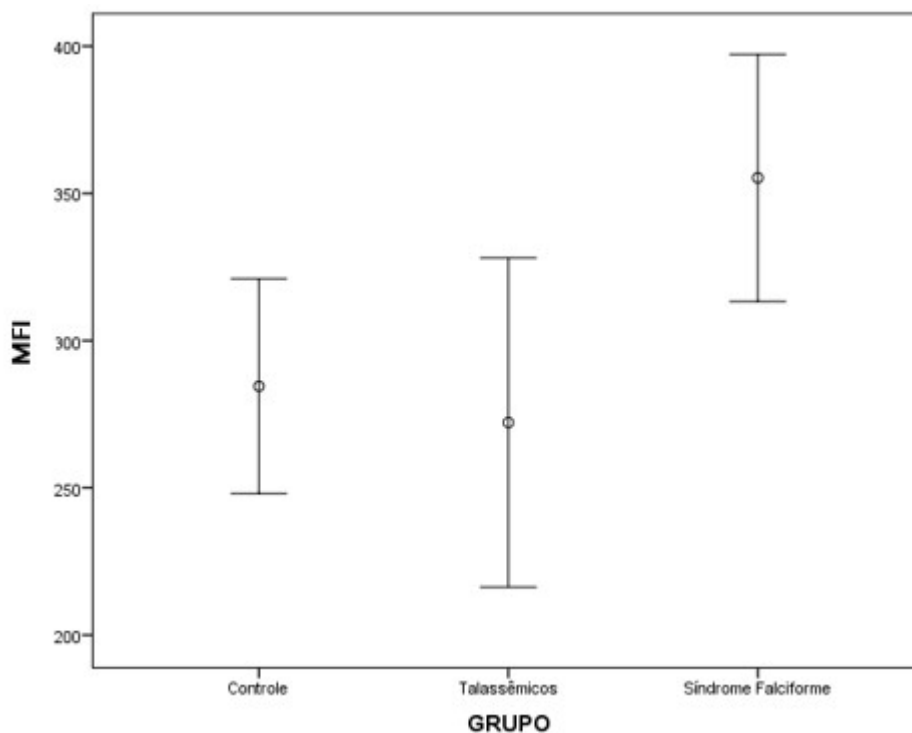


Figura 4. Os pacientes com síndrome falciforme obtiveram MFI significativamente mais elevadas do que os pacientes controles ($p=0,024$) e talassêmicos ($p=0,014$).

Dentre os índices hematológicos avaliados, houve correlação positiva entre Delta% e os valores de VCM ($p=0,014$), HCM ($p=0,018$) e CHCM ($p=0,035$) (Tabela 2). Com relação aos resultados da eletroforese de hemoglobina, houve correlação positiva entre Delta% e a percentagem de HbS ($p=0,044$) (Figura 5).

Tabela 2. Correlação entre o Delta% e os índices hematológicos na amostra total.

Índices Hematológicos	Percentual de aumento de MFI (Delta%)	
	Coefficiente de correlação de Spearman	<i>p</i>
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,099	0,748
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	-0,319	0,289
HB (g/dL)	-0,127	0,680
HT (%)	-0,159	0,603
VCM (fL)	0,659	0,014
HCM (pg)	0,643	0,018
CHCM (g/dL)	0,586	0,035
RDW (%)	0,440	0,133
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	-0,038	0,901
HbA (%)	-0,298	0,374
HbA ₂ (%)	0,146	0,667
HbF (%)	0,137	0,689
HbS (%)	0,644	0,044

Legenda: HB - hemoglobina, HT - hematócrito, VCM - Volume Corpuscular Médio, HCM - Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média, RDW - Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos, PLT - Plaquetas.

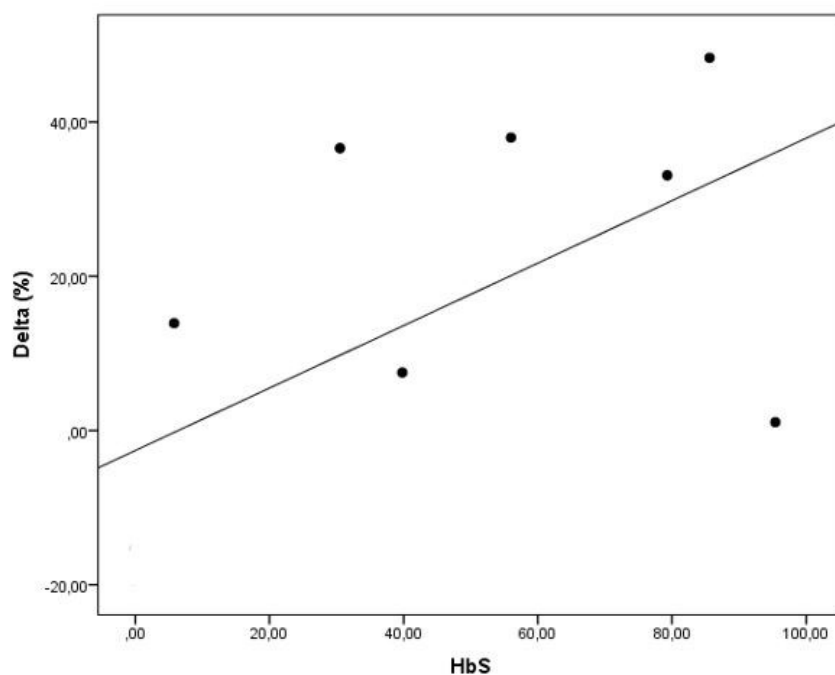


Figura 5. Gráfico de correlação mostrando correlação positiva entre o Delta% e a concentração de HbS encontrada na eletroforese de hemoglobina (coeficiente de correlação de Spearman=0,644).

4. DISCUSSÃO

Os corpos de Heinz (também chamados de "corpos Ehrlich-Heinz") são inclusões, compostas de hemoglobinas desnaturadas, encontradas dentro dos eritrócitos. Estão presentes em amostras de pacientes com condições que levam à instabilidade e precipitação da molécula de hemoglobina. Em geral, o grau de instabilidade da hemoglobina está relacionado com a produção de corpos de Heinz e com a gravidade da anemia.

A formação dos corpos de Heinz e posterior hemólise é resultado de mecanismos oxidativos que se iniciam na transformação da oxiemoglobina em metemoglobina.⁷ Na metemoglobina, o ferro do grupo heme encontra-se na forma Fe^{3+} , o que impede a ligação da molécula de oxigênio. Nas hemoglobinopatias, ocorre o aumento da metemoglobina e a capacidade de reversão pela metemoglobina redutase é prejudicada, causando desequilíbrio entre a concentração de oxihemoglobina e metemoglobina. Com isso, há geração de hemicromos e perda do grupo heme, que resultarão em precipitação da hemoglobina na forma de corpos de Heinz.¹⁶

A acetilfenilhidrazina é um derivado de fenilhidrazina conhecida por causar hemólise através da indução da produção de corpos de Heinz, sendo amplamente utilizada no estudo de fenômenos oxidativos e hemolíticos nos eritrócitos. A possibilidade da acetilfenilhidrazina induzir a formação de corpos de Heinz fluorescentes, habilita a citometria de fluxo como uma ferramenta auxiliar de diagnóstico no dia a dia do laboratório de análises clínicas.

Com relação à quantidade de amostra necessária para a realização da técnica, Palaswan *et al.*¹⁰ sugeriu um protocolo para visualização de corpos de Heinz por citometria utilizando 2 mL de sangue total coletados com ACD como anticoagulante. Nossos resultados demonstraram que 1 mL de sangue total foi suficiente para as análises. Com relação à estabilidade, a análise dos corpos de Heinz por citometria de fluxo deve ser realizada em até 24 horas após a incubação visto que há aumento na emissão de fluorescência após 24 horas e 48 horas.

Nossos resultados demonstraram uma correlação positiva entre a concentração da HbS e o aumento da emissão média de fluorescência., concordando com os achados por Naoum P.C. *et al.* que demonstraram uma percentagem maior de células apresentando corpos de Heinz em pacientes portadores do genótipo SS do que o encontrado em pacientes com fenótipos menos severos de síndromes falciformes.⁹ Também estão de acordo com os estudos de Chaves M. *et al.* que demonstraram que o aumento dos produtos da degradação oxidativa (incluindo corpos de Heinz e metemoglobina) acompanhou o genótipo da síndrome falciforme, sendo maiores em pacientes SS, seguidos pelos pacientes AS e tendo seu menor número no genótipo AA.¹⁶

Apesar da literatura descrever a presença de corpos de Heinz em pacientes talassêmicos, no nosso estudo não foi possível detectar uma diferença significativa na emissão média de fluorescência dos pacientes alfa-talassêmicos em relação aos controles normais, resultados que coincidem com os já encontrados por Palaswan *et al.*¹⁰ em pacientes portadores de deficiência de G6PD. É preciso considerar que os corpos de Heinz não são encontrados nos eritrócitos circulantes de pacientes portadores de hemoglobinopatias a todo momento (exceto nos pacientes esplenectomizados, uma vez

que o mecanismo da sua remoção se dá pelo reconhecimento destes corpos e posterior hemólise por macrófagos esplênicos). Além disso, todos os pacientes alfa-talassêmicos avaliados neste trabalho apresentavam hemogramas normais ou levemente alterados no momento das análises, não podendo ser excluída a possibilidade de que a produção dos corpos de Heinz esteja aumentada somente em pacientes que estejam passando por processos oxidativos, cuja avaliação não foi realizada neste trabalho.

Para elucidar a correlação positiva encontrada entre o aumento da emissão de fluorescência e o VCM, mostra-se necessária uma futura avaliação da técnica em um número amostral maior de pacientes com contagens conhecidas de reticulócitos, a fim de avaliar uma possível influência da policromatofilia na emissão de fluorescência encontrada neste trabalho.

Com o número amostral obtido com este trabalho, não foi possível correlacionar os dados encontrados pela técnica de citometria de fluxo com a técnica considerada padrão ouro, que é a visualização dos corpos de Heinz em lâmina, visto a falta de sensibilidade e subjetividade da visualização das estruturas nas distensões sanguíneas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível reproduzir, com adaptações, a técnica de detecção por citometria de fluxo da emissão de fluorescência decorrente dos corpos de Heinz induzidos por acetilfenilhidrazina em pacientes alfa-talassêmicos e portadores de síndromes falciformes. Os pacientes portadores de síndromes falciformes obtiveram emissões médias de fluorescência significativamente mais altas que os controles e os alfa-talassêmicos e houve correlação positiva entre o aumento da emissão de fluorescência e a presença de HbS. Para os alfa-talassêmicos, não foi encontrada diferença significativa na emissão de fluorescência em relação aos controles normais.

Para os resultados encontrados, mostra-se necessária a validação da técnica utilizada em relação à visualização dos corpos de Heinz por microscopia ótica, assim como outros testes se mostram necessários com um número amostral maior na tentativa de esclarecer a correlação entre a produção de corpos de Heinz e a severidade de crises oxidativas em pacientes alfa-talassêmicos. Além disso, é necessária uma avaliação mais detalhada da relação entre a emissão média de fluorescência obtida na citometria com o mecanismo de formação de corpos de Heinz pela acetilfenilhidrazina.

6. CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

7. REFERÊNCIAS

1. Winterbourn CC, Carrell RW. Studies of hemoglobin denaturation and Heinz body formation in the unstable hemoglobins. *J Clin Invest.* 1974;54(3):678-689.
2. Greenberg MS. Heinz Body Hemolytic Anemia: “Bite Cells”—A Clue to Diagnosis. *Arch Intern Med.* 1976;136(2):153-155.
3. Reinhart WH, Sung LP, Chien S. Quantitative relationship between Heinz body formation and red blood cell. *Blood.* 1986;68: 1376-1383.
4. Orringer EP. A further characterization of the selective K movements observed in human red blood cells following acetylphenylhydrazine exposure. *Am J Hematol.* 1984 May;16(4):355-66.
5. Winterbourn CC. Protection by Ascorbate against Acetylphenylhydrazine-Induced Heinz Body Formation in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Erythrocytes. *Br J Haematol.* 1979;41(2):245-252.
6. Stewart HW. Heinz Bodies phenomenon in erythrocytes: a review. *Blood.* 2018;74(4):1360-1367.
7. French JK, Winterbourn CC, Carrel RM. Mechanism of oxyhaemoglobin breakdown on reaction with acetylphenylhydrazine. *Biochem J.* 1978;173:19-26.
8. Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed.* 2019;5(3):125-130.
9. Naoum PC, De Souza PC. Evaluation of the products from oxidative damage of Hb S in SS, SF (S/β 0 thalassemia) and AS genotypes compared to normal hemoglobins. *Bras Patol Med Lab.* 2004:249-259.
10. Palasuwan D, Palasuwan A, Charoensappakit A, Noulsri E. A novel flow cytometry-based method of analyzing Heinz bodies. *Int J Lab Hematol.* 2017;39(1):68-75.
11. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-176.
12. Palasuwan A, Soogarun S, Lertlum T, Pradniwat P, Wiwanitkit V. Inhibition of Heinz body induction in an in vitro model and total antioxidant activity of medicinal Thai plants. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2005;6(4):458-463.
13. Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, Baumann E, Linss W. Flow Cytometry as a Diagnostic Tool for Hereditary Spherocytosis. *Acta Haematol.* 2006;116:186–191.
14. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of -α3.7 thalassaemia and αααanti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol.* 1993;83(1):105-111.
15. Wagner SC, de Castro SM, Gonzalez TP, et al. Prevalence of common α-thalassaemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. *Genet Mol Biol.* 2010;33(4):641-645.

16. Chaves MAF, Leonart MSS, do Nascimento AJ. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology*. 2008;13(3):187-192.

ANEXO I

Normas para publicação da Revista "*International Journal of Laboratory Hematology*"

1.1 MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

Original Articles
 Articles should be no longer than 4000 words, contain no more than 40 references, not more than five figures/tables and include a structured abstract. *The International Journal of Laboratory Hematology* requires all manuscripts to be submitted electronically at <https://mc.manuscriptcentral.com/ijlh>. Login or click the "Create Account" option if you are a first-time user of the ScholarOne system. Full instructions and support for authors (and reviewers) are available on the site. Support can be contacted by email at support@scholarone.com or at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/journal.asp>. If you have trouble submitting online, IJLH's Editorial Assistant (IJLHoffice@wiley.com) will be able to assist.

Review Articles
 These are normally invited contributions, but suitable papers may be submitted to the Editor for consideration for this purpose. Articles should be no longer than 5000 words, contain no more than 60 references, not more than six figures/tables and include a non-structured summary of up to 250 words.

Letters to the Editor
 Correspondence which relates to papers which have recently appeared in the journal may be published. The Editor reserves the right to invite response from the original authors for publication alongside. In addition, letters dealing with more general scientific matters of interest to haematologists will be considered; such letters will be published online only and will not appear in the printed edition of the journal, although they will be listed in the Table of Contents. Letters should be as short as possible (but no more than 1,500 words of text, three figures or tables, and up to 12 references).

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licenses the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Case Reports will not be accepted unless they are of exceptional interest and may be submitted as letters.

1.2 PREPARING YOUR SUBMISSION

Cover Letters
 Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion.

Presentation of Manuscripts
 The manuscript should be double-spaced with 30mm margins. Manuscripts must be numbered consecutively in the following sequence: Title Page; Abstract (if required); Main Body of Text; Acknowledgments; Reference List; Tables and Figure caption List. The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Title page
 The title page should contain the authors name(s), initials and place of work. In addition, the name and full postal address including e-mail, of the author who will deal with correspondence and proofs should be supplied. The full title should be accompanied by a short running title where the title exceeds 47 letters and spaces. In the top right-hand corner, the number of manuscript pages and illustrations should be marked. Five keywords should be supplied after the Summary.

Title

The title should be short and informative, containing major keywords related to the content. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips).

Abstract

A structured abstract of no more than 250 words is required for original articles, subdivided into the following sequential sections: Introduction; Methods; Results; Conclusion.

Main body of text The text of original and review articles should be divided into the following sections: Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Tables, Footnotes and Figure legends (including magnifications).

Authorship

Please refer to the journal's Authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on author listing eligibility.

Acknowledgments

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

References

References should be in American Medical Association Manual (AMA) of Style 10th Edition format and numbered consecutively in order of appearance. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals and should be listed numerically in the reference list at the end of the article. Format references as below, using standard (Medline) abbreviations for journal titles. If more than six authors, include the first three authors followed by et al. Sample references follow:

1. *Journal* *article*
Young A, Chapman O, Connor C, Poole C, Kakkar AK. Thrombosis and cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012; 9:437-449.
2. *Book*
The Institute of Medicine. A Population-based Policy and Systems Change Approach to Prevent and Control Hypertension. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2010.
3. *Edited* *Book*
Namey E, Guest G, Thairu L, Johnson L. Data reduction techniques for large qualitative data sets. In: Guest G, MacQueen KM, eds. *Handbook for Team-Based Qualitative Research*. Lanham, MD: AltaMira Press; 2008:137-161.
4. *Website* *Reference*
Salvatore S. Study links lupus to Epstein Barr virus. [CNN website]. December 15, 1997. <http://cnn.com/HEALTH/9712/15/lupus.discovery/>. Accessed August 31, 1998.

For more information about AMA reference style - AMA Manual of Style.

Tables *and* *figures*
The preferred position of figures and tables in the text should be indicated in the left-hand margin. Tables should include only essential data. Each table should be typewritten on a separate sheet and must be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. Vertical rules should not be used. Units should appear in

parentheses in the column headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote.

All tables and figures that are reproduced from a previously published source must be accompanied by a letter of permission from the publisher or copyright owner.

Illustrations

Figure

Legends

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

Figures

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

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

Colour

figures

Figures submitted in colour may be reproduced in color online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If an author would prefer to have figures printed in colour in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher.

Units

and

Spelling

Spelling should conform to The Concise Oxford Dictionary of Current English and units of measurement, symbols and abbreviations with those in Units, Symbols and Abbreviations published and supplied by the Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE. Units should follow the SI system except where earlier conventions persist (e.g. Hb in g/dl).

Fractions of unity and thousands The traditional and scientific method for indicating the breakpoint between unity and fractions of unity has been the decimal point. Recently the market trader conversion of using a comma to divide whole monetary units from fractions thereof has begun to pervade some scientific literature. International Journal of Laboratory Hematology will continue to use the scientific convention of a decimal point to indicate the break between unity and decimal fractions.

International Journal of Laboratory Hematology will use the well-established scientific convention of the thin space as a means of dividing large numbers into groups of thousands. Authors should adopt this scientific convention in all manuscripts.

Keywords

Please provide fine keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at www.nlm.nih.gov/mesh.

Conflict

of

Interest

Statement

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

Data

Citation

In recognition of the significance of data as an output of research effort, Wiley has

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

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

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

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

Additional Files

Appendices

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

Supporting

Information

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

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

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

General

Style

Points

The following points provide general advice on formatting and style.

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

Wiley Author Resources

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

Editing, Translation, and Formatting Support: Wiley Editing Services can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

Video

Abstracts

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it by clicking here. If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

1.3 EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

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

Wiley's policy on confidentiality of the review process is available here.

Human Studies and Subjects
For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: Declaration of Helsinki; US Federal Policy for the Protection of Human Subjects; or European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice. It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. When detailed descriptions, photographs, or videos of faces or identifiable body parts are used that may allow identification, authors should obtain the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a standard patient consent form available for use. Where photographs are used they need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized; black eye bars should not be used as they do not sufficiently protect an individual's identity).

Animal Studies
A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, and the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. We encourage authors to adhere to animal research reporting standards, for example the ARRIVE reporting guidelines for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

- UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).
- European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

Clinical Trial Registration

We require that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Please include the name of the trial register and your clinical trial registration number at the end of your abstract. If your trial is not registered, or was registered retrospectively, please explain the reasons for this.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to recognised research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- Randomised trials: CONSORT
- Observational studies: STROBE
- Systematic reviews: PRISMA
- Case reports: CARE
- Qualitative research: SRQR
- Diagnostic / prognostic studies: STARD
- Quality improvement studies: SQUIRE
- Economic evaluations: CHEERS
- Animal pre-clinical studies: ARRIVE
- Study protocols: SPIRIT
- Clinical practice guidelines: AGREE

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

- Future of Research Communications and e-Scholarship (FORCE11)
- National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines
- The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues
- Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website

Species Names

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

Genetic Nomenclature

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

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

data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

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

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

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

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

Funding

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

Authorship

The journal follows the ICMJE definition of authorship, which indicates that authorship be based on the following 4 criteria:

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

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

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged. These authorship criteria are intended to reserve the

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

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

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

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

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

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