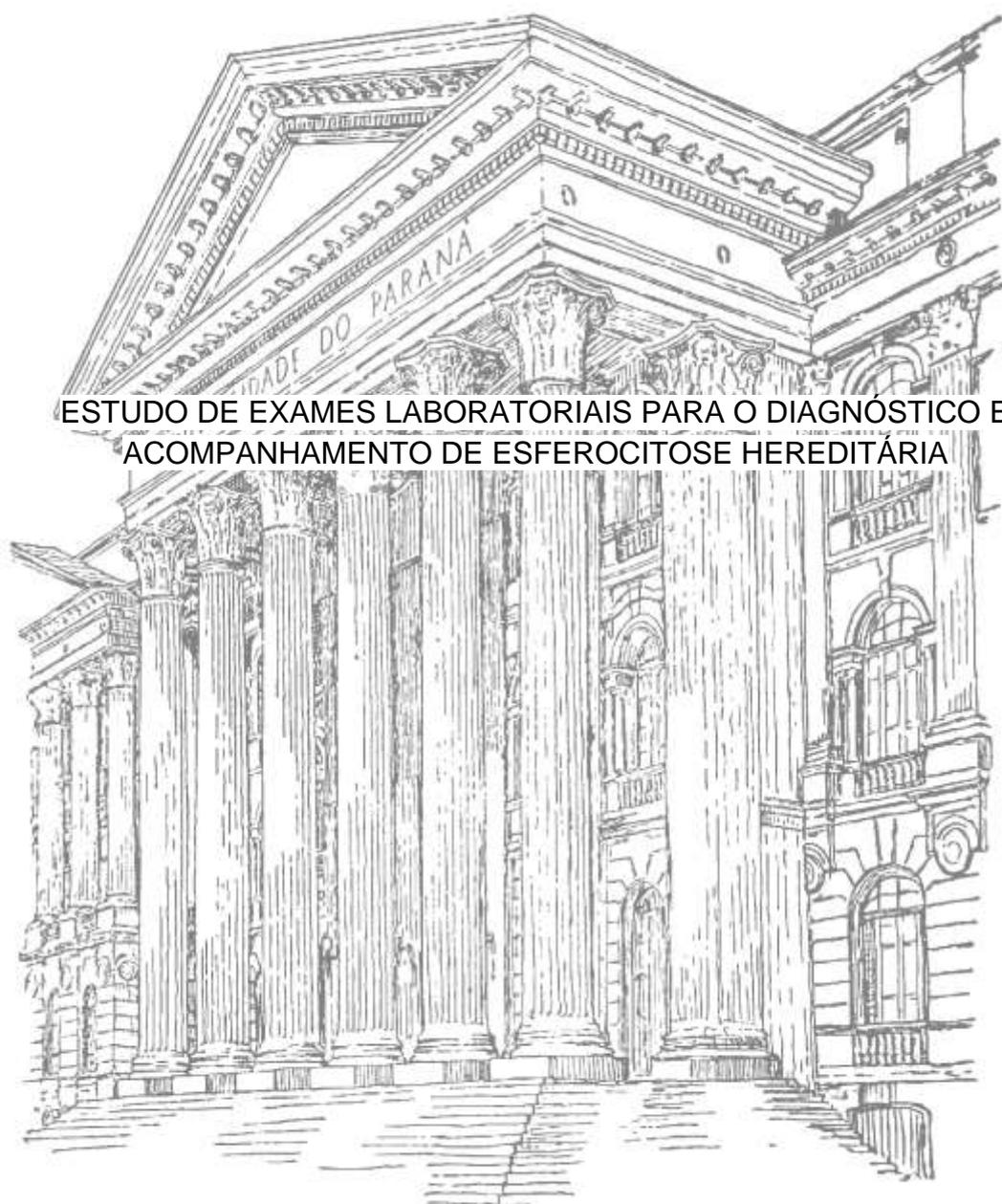


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA RIBEIRO DOS SANTOS



ESTUDO DE EXAMES LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO E
ACOMPANHAMENTO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA

CURITIBA

2015

VANESSA RIBEIRO DOS SANTOS

ESTUDO DE EXAMES LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO E
ACOMPANHAMENTO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Suely Soares Leonart

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Germano

CURITIBA

2015

Santos, Vanessa Ribeiro dos

Estudo de exames laboratoriais para o diagnóstico e acompanhamento de esferocitose hereditária / Vanessa Ribeiro dos Santos - Curitiba, 2015.

86 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Maria Suely Soares Leonart

Coorientador: Professor Dr. Sandro Germano

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Esferocitose hereditária. 2. Diagnóstico. 3. Membrana eritrocitária. 4. Hemólise.

I. Leonart, Maria Suely Soares. II. Germano, Sandro. III. Universidade Federal do Paraná.

IV. Título.

CDD 616.151

TERMO DE APROVAÇÃO

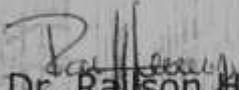
VANESSA RIBEIRO DOS SANTOS

Título: "Estudo de exames laboratoriais para o diagnóstico e acompanhamento de esferocitose hereditária"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Prof^a. Dr^a. Maria Suely Soares Leonart
Orientadora



Prof. Dr. Ralfson Henneberg
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Curitiba, 13 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, que me apoiou em todas as minhas decisões, obrigada por entenderem meus momentos de estresse e isolamento em que não pude estar presente.

A minha orientadora Maria Suely Soares, pelas inúmeras horas de dedicação e pelo apoio, inclusive em finais de semana, férias e feriados e pelos momentos em que, além de orientadora, você foi amiga, ouvinte e conselheira.

Aos meu coorientador, pessoa ímpar, que acreditou no meu potencial como profissional antes mesmo do fim deste projeto. Obrigada pelas idéias tão aplicáveis e por me fazer sorrir tantas vezes.

A Dr. Mara Albonei e sua equipe que me receberam de braços abertos no Ambulatório de Hematopediatria do HC-UFPR, me possibilitando o contato com os pacientes.

À equipe do Laboratório Escola de Análises Clínicas – UFPR pelo suporte prestado.

Ao professor Aguinaldo que colaborou com sugestões técnicas. À equipe do laboratório de Matriz Extracelular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

À Irene, por estar sempre disposta a me ajudar e pelas conversas de início de manhã.

Ao meu namorado, David, pessoa dotada de enorme paciência e que se tornou responsável por grande parte da paz que encontrei e que foi tão necessária para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelas finais de semana gastos escrevendo comigo e por tornar esta fase mais amena.

Às minhas amigas Bruna e Isabel, pessoas excepcionais, que ouviram minhas lamúrias, secaram minhas lágrimas, me deram idéias e que foram responsáveis por grande parte dos momentos de descontração.

E por fim, aos pacientes, sem os quais este projeto não teria acontecido e pelos quais devemos continuar trabalhando arduamente.

RESUMO

Esferocitose hereditária (HS) é a doença hemolítica por defeito de membrana eritrocitária de maior incidência (1:2.000-3.000) em países europeus e é caracterizada pela redução das espectrinas, banda 3, anquirinas ou proteínas 4.1 ou 4.2. Atualmente seu diagnóstico se fundamenta em: aumento da fragilidade osmótica (FO) e da fragilidade osmótica incubada (FOi); redução do tempo de lise em glicerol acidificado (AGLT); diminuição ou ausência de α -espectrina, β -espectrina, banda 3 ou de proteínas 4.1 e 4.2 em eletroforese de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); pesquisa de proteínas de membrana em citômetro de fluxo, empregando-se eosina 5-maleimida (EMA) como marcador e crio-hemólise aumentada. Este trabalho teve como objetivo comparar exames empregados no diagnóstico de esferocitose hereditária e identificar qual(is) deles são mais adequados ao diagnóstico. Foram obtidas 18 amostras de sangue de crianças atendidas no Ambulatório de Hematopediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. No estudo dos dados coletados foram identificados dados como gênero, feminino (8) e masculino (10); histórico familiar de HS das mães de 4 dos pacientes, presuntivamente diagnosticadas com esferocitose hereditária, FO e FOi aumentada em 7 e 8 pacientes (n=10) respectivamente, 7 casos de anemia moderada (8 a 11 gHb/dl) e 2 de anemia moderadamente severa (6 a 8 gHb/dl) (n=9). Nos ensaios realizados observou-se: FO com resultados acima da faixa de referência em 6 amostras (37,5%), FOi com resultados superiores à faixa de referência em 11 amostras (68,8%), AGLT com tempos reduzidos em 16 casos (94%). No SDS-PAGE observou-se 17 casos de diminuição da expressão de β -espectrina; 13 de diminuição de α -espectrina; 12, de banda 3; 1, de proteína 4.1 e 2 casos de redução de proteína 4.2, nas 18 amostras. Observou-se presença de esferócitos nas amostras analisadas pela quantificação das formas eritrocitárias ao microscópio óptico, variando de 3 a 20% (n=8). Comparando-se os resultados de redução de α -espectrina com AGLT houve concordância de 87,4%; com FO de 37,5% e com FOi de 62,5%. Quanto à redução de β -espectrina houve concordância de 87,5% com os resultados de AGLT; de 37,5% com FO e de 68,8% com FOi. Para a redução de banda 3, houve concordância de 75% com AGLT; de 32,5% com FO e de 56,2 com FOi. Comparando-se os resultados de FO com AGLT, houve concordância de 40% e com FOi de 66,6%. Na comparação entre FOi e AGLT, obteve-se concordância de 73,3%. Na comparação dos resultados de % de esferócitos com FO, FOi e AGLT a maior concordância foi com AGLT, 87,5%. A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se sugerir que a associação de AGLT e FOi pode representar a escolha mais confiável, por detectar maior número de casos com diagnóstico presuntivo de HS além de apresentar um custo acessível. A inclusão de SDS-PAGE, porém deve ser considerada, tendo em vista que detecta a redução ou ausência de proteínas e pode ser útil em casos não detectados pelo EMA, AGLT ou FOi.

Palavras-chaves: Esferocitose hereditária. Diagnóstico. Membrana eritrocitária. Hemólise

ABSTRACT

Hereditary spherocytosis (HS) is the hemolytic disease due to defects in the erythrocyte membrane of higher incidence (1: 2000-3000) in European countries and is characterized by lower spectrin, band 3, ankyrins or proteins 4.1 or 4.2. Currently diagnosis is based on: increased osmotic fragility (FO) and incubated osmotic fragility (FOi); reduction in lysis time in acidified glycerol (AGLT); decrease or absence of α -spectrin, β -spectrin, band 3 protein or 4.1 and 4.2 on electrophoresis of membrane proteins in polyacrylamide gel (SDS-PAGE); study of membrane proteins in a flow cytometric, using Eosin 5-maleimide (EMA) as a marker and increased crio-hemolysis. This study aimed to compare employees tests in the diagnosis of hereditary spherocytosis and identify which one (s) of them are best suited to the diagnosis. We obtained blood samples from 18 children treated at Hematopediatrics ambulatory of Clinic Hospital of the Federal University of Paraná . In the study of data collected data such as gender were identified, female (8) and male (10); family history of HS mothers 4 patients, presumptively diagnosed with hereditary spherocytosis, FO and FOi was increased on 7 and 8 patients (n = 10) respectively, 7 cases of moderate anemia (8 to 11 gHb / dl) and 2 anemia moderately severe (6 to 8 gHb / dL) (n = 9). In tests performed it was observed: FO with results above the normal range in 6 samples (37,5%) FOi was superior results with the normal range in 11 samples (68,8%), AGLT with reduced time in 16 cases (94%) . In SDS-PAGE it was observed in 17 cases decreased expression of β -spectrin; 13 α -spectrin decreased; 12 band 3; 4.1 1 protein; 2 protein and reduction case 4.2 in 18 samples. Spherocytes was observed in all samples analyzed by quantification of erythrocyte forms an optical microscope, ranging from 3 to 20% (n = 8). Comparing the results of α -spectrin reduction with AGLT, there was agreement of 87,4%; with FO, 37.5% and FOi was 62.5%. As for the reduction of β -espectrin, was obtained agreement of 87.5% concordance with the results of AGLT, 37,5% with FO; and, of 68,8%, with FOi. To reduce band 3, there was 75% agreement with AGLT; FO with 37.4%; and 56.2 with FOi. Comparing the results of FO with AGLT, there was agreement of 40% and was 66,6% with FOi. Comparing FOi and AGLT was obtained agreement of 73,3%. In comparing the results of % of spherocytes with FO, FOi and AGLT, the highest agreement was with AGLT 87.5%. From the data obtained suggest that AGLT and FOi association may represent the most reliable choice for detecting more cases with presumptive diagnosis of HS and presents an affordable cost. The inclusion of SDS-PAGE, however, must be considered in order to detect the reduction or absence protein and may be useful in cases not detected by the EMA, FOi or AGLT.

Keywords: Hereditary spherocytosis. Diagnosis. Erythrocyte membrane. Hemolysis

LISTA DE ABREVIATURAS

1,3-BPG	- 1,3-bisfosfoglicerato
AGLT	- Tempo de lise em glicerol acidificado
ANK1	- Anquirina
ATPases	- Adenosina trifosfatases
BSA	- Albumina de soro bovino
cAMP	- AMP cíclico
DAT	- Teste direto da antiglobulina
EMA	- Eosina 5-maleimida
EPB42	- Proteína 4.2
ERRO	- Espécies reativas de oxigênio
FGM	- Fragilidade globular mediana
FO	- Fragilidade osmótica
FOi	- Fragilidade osmótica pós-incubação
G1-P	- Glicose 1-fosfato
G-3PD	- Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
G6-P	- Glicose 6-fosfato
G6-PD	- Glicose 6-fosfato desidrogenase
Gal1-PUT	- Galactose 1-fosfato uridiltransferase
Ghosts	- Estroma eritrocitário
GSH	- Glutathiona redutase
Hb	- Hemoglobina
HC	- Hospital de Clínicas
HE	- Eliptocitose hereditaria
HF	- Histórico familiar de esferocitose hereditária

HPP	- Piropoiquilocitose Hereditária
HS	- Esferocitose hereditaria
HSt	- Estomatocitose hereditária
metaHb	- Meta-hemoglobina
Na ⁺ K ⁺ -ATPase	- Bomba de sódio e potássio
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PC	- Fosfatidilcolina
PL	- Fosfolipídeos
PS	- Fosfatidilserina
RGmax	- Resistência globular máxima
RGmin	- Valores de resistência globular mínima
SDS-PAGE	- Eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato
SLC4A1	- Banda 3
SM	- Esfingomielina
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VG	- Volume globular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESTRUTURA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA.....	22
FIGURA 2 -	VIA GLICOLÍTICA DE EMBDEN-MEYERHOF.....	24
QUADRO 1 -	CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA NA ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA.....	32
QUADRO 2 -	CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS PARA DIFERENCIAÇÃO DE ERITRÓCITOS.....	41
FIGURA 3 -	CORRIDA ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA (SDS-PAGE) EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE, DE AMOSTRAS CONTROLE E PADRÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS.....	43
QUADRO 3 -	DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS RETROSPECTIVOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	46
GRÁFICO 1 -	CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA (FO) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	50
GRÁFICO 2 -	CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA (FO) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇA COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014	51
GRÁFICO 3 -	CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA INCUBADA (FOi) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014	52

GRÁFICO 4 -	CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA INCUBADA (FOi) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	54
GRÁFICO 5 -	CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA INCUBADA (FOi) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	55
GRÁFICO 6 -	CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA (FO) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	56
QUADRO 4 -	RELAÇÃO DE BANDAS DE PROTEÍNAS DEFICIENTES NO SDS-PAGE EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE, DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	58
FIGURA 4 -	CORRIDA ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA (SDS-PAGE) EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE DE AMOSTRAS (1 A 9) DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	59
FIGURA 5 -	CORRIDA ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA (SDS-PAGE) EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE DE AMOSTRAS (10 A 18) DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	60

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - VALORES DE RGM_{in}, FGM E RGM_{ax} PARA FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....49
- TABELA 2 - VALORES DE RGM_{im}, FGM E RGM_{ax} PARA FO_i DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....53
- TABELA 3 - TESTE DE TEMPO DE LISE EM GLICEROL ACIDIFICADO (AGLT) DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....57
- TABELA 4 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT E FO_i DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....57
- TABELA 5 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO E FO_i DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....57
- TABELA 6 - PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.58
- TABELA 7 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS E AGLT, FO, FO_i DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....58

TABELA 8 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO, FOi E PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS COM A BANDA DE α -ESPECTRINA NO SDS-PAGE DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	60
TABELA 9 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO, FOi E PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS COM BANDA DE β -ESPECTRINA NO SDS-PAGE DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	61
TABELA 10 -ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO, FOi, PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS E PROTEÍNA DE BANDA 3 NO SDS-PAGE DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	61
TABELA 11 -SENSIBILIDADE DOS TESTES DE FO, FOi, AGLT, % DE ESFERÓCITOS E GEL DE SDS-PAGE REALIZADOS EM CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	61
TABELA 12 -PORCENTAGENS DE RETICULÓCITOS, CONCENTRAÇÕES DE HB E DE METAHEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	63
TABELA 13 -DOSAGEM DE BILIRRUBINA DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....	64
TABELA 14 -ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE Hb RELACIONADAS A GRAUS LEVE, MODERADO OU ACENTUADO DE ANEMIA E % DE RETICULÓCITOS NORMAIS, COM ELEVAÇÃO MODERADA OU ACENTUADA EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE	

HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A
OUTUBRO/2014.....65

TABELA 15 -ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO
DE Hb RELACIONADA A GRAUS LEVE, MODERADO OU
ACENTUADO DE ANEMIA E DE % DE ESFERÓCITOS DE
AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE
ESFEROCITÓSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR,
ABRIL A OUTUBRO/2014.....65

TABELA 16 -ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS Hb E BILIRRUBINA
DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO
DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, DE ACORDO COM NÍVEIS
NORMAL, AUMENTADO OU DIMINUÍDO, HOSPITAL DE CLÍNICAS –
UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.....65

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ERITRÓCITO	18
2.2 ANEMIA	26
2.3 DOENÇAS HEMOLÍTICAS.....	27
2.3.1 Avaliação laboratorial.....	27
2.4 DOENÇAS HEMOLÍTICAS POR DEFEITO DE MEMBRANA.....	31
2.4.1 Esferocitose Hereditária (HS)	32
2.4.2 Piropoiquilocitose Hereditária	34
2.4.3 Eliptocitose Hereditária.....	34
2.4.4 Estomatocitose Hereditária	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL	37
4.1.1 Amostras	37
4.1.2 Reagentes.....	37
4.1.3 Equipamentos	38
4.2 MÉTODOS.....	38
4.2.1 Coleta de dados retrospectivos.....	38
4.2.1.1 Fragilidade Osmótica (FO).....	38
4.2.1.2 Fragilidade Osmótica Pós-Incubação (FOi).....	39
4.2.1.3 Teste de Lise em Glicerol Acidificado (AGLT)	40
4.2.1.4 Contagem diferencial das formas eritrocitárias em microscopia óptica	40
4.2.1.5 Eletroforese de Proteínas de Membrana Eritrocitária.....	41
4.2.1.6 Dosagem de Bilirrubina	44
4.2.1.7 Meta-hemoglobina (metaHb)	44
5 RESULTADOS	46
5.1 DADOS RETROSPECTIVOS.....	46
5.2 EXAMES UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE HS.....	47
5.3 EXAMES DE ACOMPANHAMENTO PÓS DIAGNÓSTICO	62
6. DISCUSSÃO	66

6.1 DADOS RETROSPECTIVOS.....	66
6.2 EXAMES UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO	68
6.3 ACOMPANHAMENTO PÓS DIAGNÓSTICO.....	73
6.4 PERSPECTIVAS SOBRE O APERFEIÇOAMENTO DO DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES COM HS.....	75
7. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Doenças hemolíticas por defeito de membrana eritrocitária são herdadas e se desenvolvem a partir de defeitos, horizontais ou verticais, nas proteínas da membrana eritrocitária (KING & ZANELLA, 2013). Essas condições, muitas vezes, ocasionam anemia, esplenomegalia e icterícia (DA COSTA *et al.*, 2013) e compreendem a esferocitose hereditária (HS), eliptocitose hereditária (HE), estomatocitose (HSt) e piropoiquilocitose hereditária (HPP).

A esferocitose hereditária (HS) é a mais comum das anemias hemolíticas por defeito de membrana, causada por mutações nos genes responsáveis pela produção de anquirina (ANK1), α e β espectrina (SPTA1 e SPTB), banda 3 (SLC4A1) e proteína 4.2 (EPB42), por desordens genéticas de herança dominante, recessiva ou por mutações *de novo* (EBER & LUX, 2004).

Na avaliação laboratorial de HS detecta-se hemólise e anemia, a qual nem sempre estará presente. A coleta de informações sobre o histórico familiar e do paciente, incluindo sua alimentação, além do uso de drogas e medicamentos é de grande relevância na investigação de HS (LEE, BITHELL & FOERSTER *et al.*, 2009). Também é importante o diagnóstico diferencial em relação a doenças hemolíticas que apresentem maior incidência, como as talassemias, anemia falciforme e anemias imunohemolíticas (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

Após os testes laboratoriais que excluem doenças hemolíticas de maior incidência, persistindo a suspeita de HS, pode-se realizar exames como teste de fragilidade osmótica com sangue fresco e incubado a 37 °C por 24 horas e tempo de lise em glicerol acidificado (AGLT), que detectam alterações na relação superfície/volume do eritrócito; teste da eosina-5-maleimida (EMA), que quantifica proteínas de membrana a partir de citometria de fluxo e apresenta alta sensibilidade e especificidade (KING & ZANELLA, 2013); crioemólise, que se sugere ter relação com a presença do defeito molecular e não a relação volume/superfície; eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária com sulfato de dodecil sódico, que separa e quantifica proteínas presentes na membrana eritrocitária e detecção de defeitos associados aos genes que codificam proteínas de membrana eritrocitária.

Apesar de serem amplamente empregados na rotina laboratorial, estes testes apresentam variações de sensibilidade e especificidade significativas (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD *et al.*, 2004; PERROTA, GALLAGHER & MOHANDAS, 2008; BIANCHI, FERMO, VERCELATTI *et al.*, 2011), o que faz com que sejam necessários estudos mais aprofundados sobre sua utilização no diagnóstico de doenças hemolíticas por defeito de membrana.

Além disto, a HS é extensamente variável quanto à herança genética e manifestações clínicas e pode ser confundida com outras doenças hemolíticas, o que torna relevante o emprego de estratégias adequadas para confirmação do seu diagnóstico. Assim o estudo dos métodos laboratoriais mais utilizados pode vir a esclarecer qual deles apresente a melhor capacidade de diagnóstico de HS

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERITRÓCITO

O eritrócito não possui núcleo, mitocôndrias ou ribossomos. Apesar disto, é uma das células mais especializadas do corpo humano. A hemoglobina, proteína responsável por transportar oxigênio, constitui aproximadamente 95% das proteínas citoplasmáticas do eritrócito. Além disso, enzimas responsáveis pela produção energética, pela manutenção da hemoglobina e pela proteção contra o estresse oxidativo também constituem o eritrócito (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009).

De acordo com o modelo de mosaico fluído proposto por Singer & Nicolson (1972), a membrana eritrocitária é composta por uma bicamada lipídica na qual estão imersas proteínas chamadas integrais, de diferentes tamanhos, formas e propriedades funcionais. Junto à face interna da bicamada encontram-se as proteínas ditas periféricas, que formam o citoesqueleto, fundamental para a manutenção da estabilidade da membrana e da forma eritrocitária (YU, FISCHMAN & STECK, 1973). A bicamada lipídica é formada por colesterol não esterificado, fosfolípídeos (PL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina (SM) e fosfatidilserina (PS), cujos grupamentos não-polares se dispõem de frente um para o outro, formando interações hidrofóbicas. Enquanto isto, as "cabeças" polares dos PL, que possuem grupos hidrofílicos, interagem com o ambiente aquoso tanto na superfície citoplasmática quanto na externa (MANNO, TAKAKUWA & MOHANDAS, 2001).

O colesterol presente na membrana interage com os PL, levando à diminuição considerável de fluidez da membrana em comparação à bicamada fosfolipídica pura. Em estado de elevação anormal dos níveis de colesterol, ocorrem distorções no formato da membrana eritrocitária, com diminuição de sua deformabilidade natural e consequente destruição do eritrócito pelo baço (MOHANDAS & GALLAGHER, 2008).

No interior da bicamada lipídica estão presentes proteínas integrais, como a banda 3 e as glicoforinas, que podem atravessar completa ou parcialmente a

membrana eritrocitária. Algumas destas proteínas se movimentam lateralmente, enquanto outras apresentam imobilidade, devido ao fato de interagirem com outros componentes da membrana, como proteínas do citoesqueleto (GALLAGHER, 2005; MOHANDAS & GALLAGHER, 2008).

As glicoforinas apresentam em geral, três domínios: um externo, um no interior da bicamada lipídica e um interno ao citoplasma (MANKELOW, SATCHWELL & BURTON, 2012). Coram-se pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009) e são classificadas em glicoforinas A, B, C e D, sendo que A e B são determinadas por genes extremamente homólogos, GYPA e GYPB, localizados no cromossomo 4q28-q31, e formam homo ou heterodímeros; enquanto C e D derivam de um único gene, CYPC, localizado no cromossomo 2 e não possuem relação estrutural com A e B (GARRATY, TELEN & PETZ, et. al. 2002). As glicoforinas conferem carga negativa ao eritrócito devido à presença de ácido siálico e grupos amino terminais em sua composição, o que diminui a interação entre as células e previne a aglutinação celular (AUFFRAY, MARTAFIA & JONG et al., 2001).

O segmento N-terminal externo da glicoforina A possui receptores para o vírus *influenzae*, causador da gripe, e *P. falciparum*, causador da malária. Quando somados, glicoforina A (16 kDa) e B (10 kDa) apresentam 43 receptores de ancoragem para antígenos do sistema MNSs (POOLE, BANKS & BRUCE, et. al. 1999). Em pessoas com fenótipo nulo MN, onde há ausência de glicoforina A e B, nota-se total resistência à infecção por *P. falciparum* (STORRY, COGHLAN & POOLE, et. al. 2000).

As glicoforinas C e D (35 kDa) definem o grupo sanguíneo Gerbich e a deficiência total de ambas resulta no fenótipo Leach, característico de portadores de eliptocitose hereditária (GARRATY, TELEN & PETZ, 2002). Estudo sugere que a Glicoforina C representa o terceiro sítio de ligação para o *P. falciparum*, devido a sua ligação com a proteína PfEBP-2, presente no parasita (LOBO, RODRIGUES & REID, 2003).

A banda 3 (102 kDa) é uma proteína de canal iônico ou troca iônica, com a principal função de intercambiar a transferência de cloretos, carbonatos e água, além de interagir com o citoesqueleto através da ligação com a anquirina, possuindo

seu gene SLC4A1 localizado no cromossomo 17q21-q22 (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009). Demonstrou-se que a banda 3 apresenta segmento externo, onde estão presentes antígenos do grupo sanguíneo ABO, intramembranoso e interno e que possui comprimento que permite atravessar a membrana eritrocitária de 12 a 13 vezes (LOW, 1986). A expressão de formas anormais da molécula de banda 3 ou a diminuição na sua expressão estão diretamente ligadas a alterações morfológicas do eritrócito (ANONG, FRANCO & CHU *et al.*, 2009).

A banda 3 interage com anquirina, proteína 4.1, enzimas glicolíticas, hemoglobina, proteína 4.2 (LOW, 1986), GLUT1 e glicoforinas (MANKELOW, SATCHWELL & BURTON, 2012).

Além das proteínas integrais, as chamadas proteínas periféricas, representadas pela actina, aducina, anquirina, espectrina, proteínas 4.1, 4.2, 4.9, 6 e 7 também estão presentes no eritrócito compondo o citoesqueleto, ligado internamente à bicamada lipídica (HANDIN, LUX & STOSSEL, 1995).

A estrutura do citoesqueleto é formada por tetrâmeros de espectrina que formam uma rede conectada pelas proteínas do complexo juncional. Este complexo tem a função de conectar o citoesqueleto às proteínas da bicamada lipídica (MANKELOW, SATCHWELL, BURTON, 2012). A actina F (33 kDa) faz parte do chamado complexo juncional, que compreende também a proteína 4.1, anquirina e espectrina. A interação entre actina e espectrina é fraca, mas se fortalece a partir da ligação com a proteína 4.1, aumentando a estabilidade da ligação entre o citoesqueleto e a bicamada lipídica. O tamanho dos filamentos de actina parece ser regulado pela proteína tropomiosina e compreende de 14 a 16 monômeros (MOHANDAS & GALLAGHER, 2008).

A anquirina é composta por três domínios: N-terminal (89 kDa), que se liga à membrana eritrocitária; central (62 kDa) que interage com a espectrina e C-terminal, que tem a função de regular os outros domínios. A anquirina promove a ligação da espectrina além de outras proteínas transmembranares como banda 3, RhAG e proteína 4.2 à membrana eritrocitária, aumentando a afinidade entre essas ligações (MANKELOW, SATCHWELL & BURTON, 2012) e auxiliando no transporte de

pequenos substratos. Cada molécula de anquirina se liga a um tetrâmero de espectrina (BENNETT & STENBUCK, 1979).

A espectrina está associada à integridade eritrocitária, tendo em vista que em eritrócitos que apresentam ausência da mesma, há rompimento celular. Aproximadamente 35% do total de proteínas da membrana corresponde a um complexo espectrina-actina. Neste complexo estão presentes cadeias polipeptídicas de α e β -espectrina, que são homólogas entre si e uma cadeia correspondente à actina eritrocitária (BAINES, 2010).

A α -espectrina (240 kDa), codificada pelo gene SPTA1 e SPTAN1 e a β -espectrina (220 kDa), codificada pelos genes SPTB, SPTBN1, SPTBN2 e SPTBN4 (BAINES, 2010), formam heterodímeros que, por sua vez, formam tetrâmeros por associação de suas “cabeças”. Estes tetrâmeros são incorporados em um retículo que forma o citoesqueleto eritrocitário pela interação com a anquirina (FIGURA 1) (DA COSTA, GALIMAND & FENNETEAU, *et. al.* 2013).

A proteína 4.1 (80 kDa), codificada pelo gene EPB41 (BAINES, 2010) apresenta um papel importante na estrutura da membrana, na qual se liga à espectrina e à proteína transmembranar glicoforina A e C. Além disto, a proteína 4.1, quando na presença de actina, interage com a espectrina, promovendo a interação espectrina-actina, fortalecendo esta interação (LEE, BITHELL & FOERSTER *et al.*, 2009). O estudo eletroforético da proteína 4.1 apresenta duas subunidades 4.1a e 4.1b. A subunidade 4.1a interage com espectrina e actina, enquanto a subunidade 4.1b interage com glicoforinas e actina (MURADOR & DEFFUNE, 2007) e está presente em região de adesão da espermatogônia (TERADA, YAMAKAWA & BABA *et. al.* 2004).

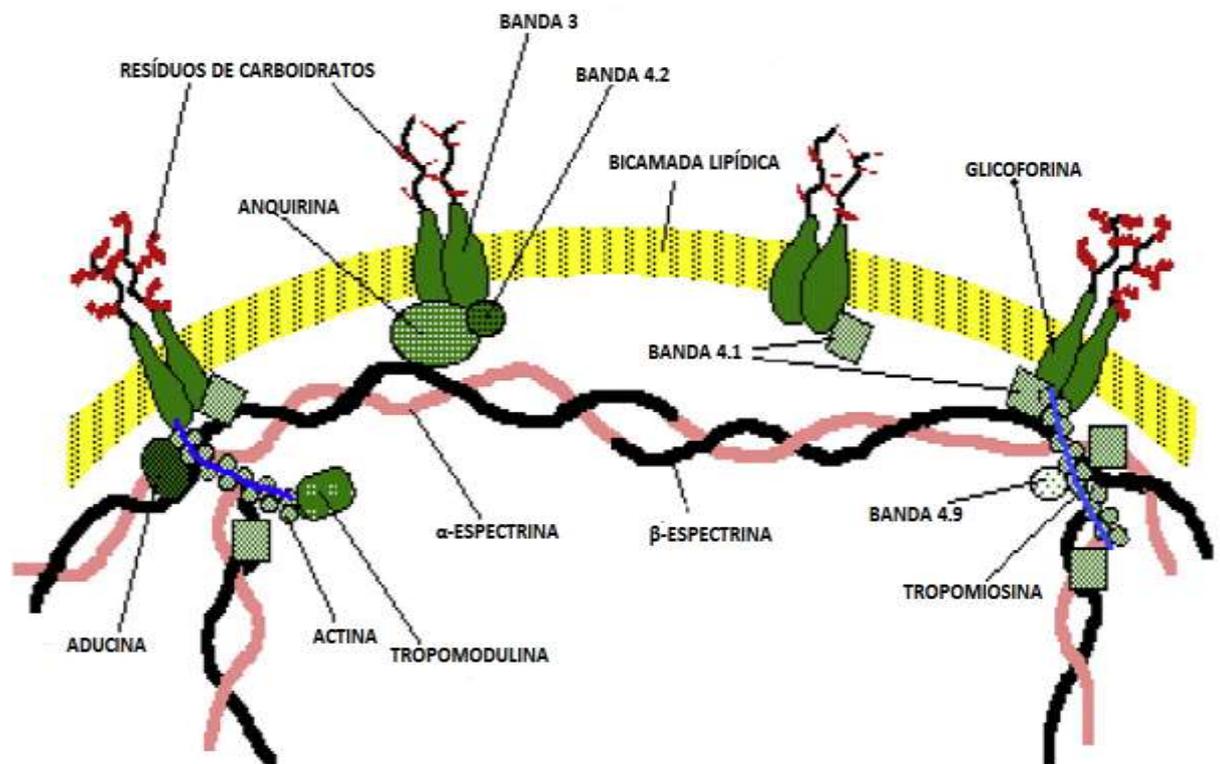


FIGURA 1. ESTRUTURA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA
 FONTE: Adaptado de DA COSTA *et al.*, 2013.

A proteína 4.2 apresenta alta semelhança com as transglutaminases, porém não possui os resíduos da tríade catalítica, necessários para a atividade enzimática. Possui glicina N-terminal, que possibilita a interação direta com a parte interna da membrana. Liga-se ao domínio citoplasmático N-terminal da banda 3, interage com anquirina, espectrina, proteína 4.1 e com proteínas do complexo Rh, promovendo a ancoragem das proteínas na membrana eritrocitária (SATCHWELL, SHOEMARK & SESSIONS *et al.*, 2009) e auxiliando na flexibilidade e estabilidade do eritrócito (KARACAY & SHANG, 1999). Na ausência de proteína 4.2, há redução na associação entre banda 3 e anquirina (MANKELOW, SATCHWELL & BURTON, 2012).

Além das proteínas estruturais, cerca de 50 enzimas interagem com a membrana eritrocitária (MOHANDAS & GALLAGHER, 2008) e entre suas funções estão a produção de energia derivada da glicose e o auxílio ao transporte de moléculas úteis ao eritrócito (LEE, BITHHELL & FOERSTER *et al.*, 2009).

Aldalase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G-3PD) e fosfoglicerato quinase são enzimas relacionadas à produção e utilização de ATP, convertendo

frutose difosfato a 3-bisfosfoglicerato. O ATP gerado nesta reação é provavelmente, utilizado pelas moléculas ligadas à membrana, entre elas a adenilciclase, que age como catalizadora na conversão de ATP em AMP cíclico (cAMP) e adenosina trifosfatases (ATPases) (GRIMES, 1980).

Um exemplo de ATPase da membrana eritrocitária é a bomba de sódio e potássio (Na^+K^+ -ATPase), responsável pelo controle de altas concentrações de potássio e baixas concentrações de sódio no interior da célula, do volume globular, bem como pela ativação de enzimas intracelulares dependentes de potássio (VIVES CORRONS & BESSON, 2001).

Por não possuir mitocôndrias, o eritrócito depende de outras vias não tão eficientes para produção de energia, sendo a via glicolítica anaeróbica, conhecida como Embden-Meyerhof, a predominante, metabolizando aproximadamente 90% da glicose (FIGURA 2) (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009).

O processo de glicólise anaeróbica realizado pelo eritrócito pode utilizar como substrato a glicose e em menor quantidade, galactose, manose ou ainda frutose. A galactose é primeiro fosforilada a galactose 1-fosfato e posteriormente, convertida a glicose 1-fosfato (G1-P) pela enzima galactose 1-fosfato uridiltransferase (Gal1-PUT). A partir da enzima fosfoglucomutase a Gal 1-PUT é convertida em glicose 6-fosfato (G6-P), passando, então, a integrar a via de Embden-Meyerhof, que difere das vias das demais células pela produção de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), que apresenta um papel vital no transporte de oxigênio (GRIMES, 1980).

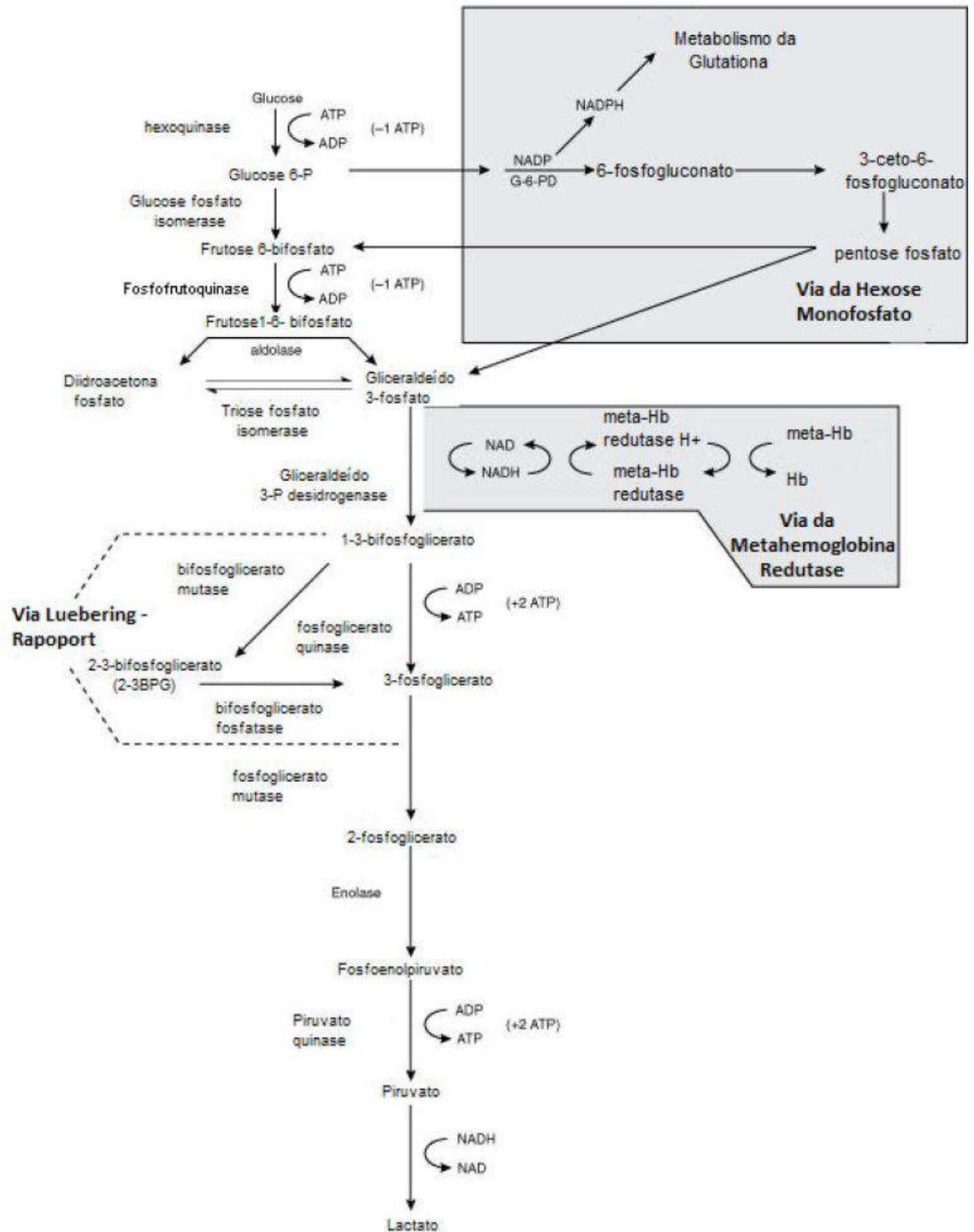


FIGURA 2 – VIA GLICOLÍTICA DE EMBDEN-MEYERHOF
 FONTE: CALVO (2014)

A glicose entra na célula a partir de transporte realizado por difusão facilitada. A via glicolítica anaeróbica forma três importantes intermediários: NADH, co-enzima associada à catalisação promovida pela lactato desidrogenase; ATP, intermediário

de energia que está relacionado com a conservação da forma celular e o transporte de cátions através da membrana e; 2,3-BPG, que tem como função modular a curva de dissociação do oxigênio (GRIMES, 1980).

Os rendimentos do NADH são fixos, sendo produzidas, para cada molécula de glicose, duas novas moléculas de NADH. Porém, a produção de ATP e de 2,3-BPG é limitada pela variação na atividade da via metabólica Luebering-Rapopport (FIGURA 3), exclusiva dos eritrócitos, a qual pode produzir no máximo duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose catabolisada (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009).

A via da hexoses monofosfato tem importante papel no metabolismo eritrocitário, pois tem a função de manter a glutatona em estado reduzido, colaborando para a diminuição do estresse oxidativo eritrocitário que é responsável pela diminuição da vida média dos eritrócitos. Nesta via, a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) reduz a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) que, por sua vez, reduz a glutatona (BEUTLER, 2001).

O controle da morfologia eritrocitária depende de energia, das proteínas de membrana, da bicamada lipídica e de interações entre esses componentes, podendo resultar, quando ausentes, em lise eritrocitária (ELGSAETER & MIKKELSEN, 1991). Pela ação da espectrina, o citoesqueleto auxilia na deformabilidade da membrana eritrocitária estabilizando a bicamada lipídica (MOHANDAS, CHASIS & SHOHET, 1983). O discócito é a forma eritrocitária que apresenta características ideais de deformabilidade, geometria e relação superfície/volume, apresentando capacidade de absorção de água em até 70% de seu volume (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

Com a expansão da porção externa da bicamada lipídica da membrana eritrocitária, forma-se o equinócito pela projeção de espículas na superfície. Por outro lado, quando esta expansão ocorre na parte interna da bicamada, forma-se o estomatócito. Estas formas são reversíveis à forma de discócito e intercambiáveis entre si. Porém com o agravamento das alterações metabólicas no eritrócito, há perda da reversibilidade com alongamento e afinamento das espículas do equinócito e entrada de água. Com a perda de fragmentos da membrana e aumento de viscosidade e rigidez há formação de esferócitos, forma irreversível e susceptível à

hemólise (CHAILLEY, WEED, LEBLOND *et al.*; 1973). O equinócito é formado a partir da redução da porção interna da bicamada lipídica, promovida pela diminuição nos níveis de ATP, necessários para a desfosforilação de fosfatidilinositol 4-fosfato e fosfatidilinositol 4,5-fosfato, a fosforilação dos fosfolípídeos promove a reconversão a discócito (FERRELL & HUESTIS 1982).

2.2 ANEMIA

A anemia é definida como uma quantidade insuficiente de hemoglobina para proporcionar a oxigenação dos tecidos de maneira correta. Os critérios clínicos iniciais a serem considerados para se determinar o tipo de anemia são: histórico familiar e histórico alimentar, o qual deve ser o mais específico possível. Da mesma forma os costumes domésticos e passatempos, bem como as atividades profissionais, devem ser investigados na tentativa de rastrear possíveis contatos com substâncias que possam produzir anemia hemolítica (LEE, BITHELL & FOERSTER *et al.*, 2009).

Pacientes com anemia geralmente apresentam diminuição do ritmo de trabalho, falta de ar, palpitações, ou ainda, outros sinais de débitos cardiorrespiratórios. Estas manifestações dependem principalmente, da taxa de redução da capacidade de oxigenação sanguínea e da capacidade dos sistemas cardiovascular e respiratório de compensar a anemia e as características clínicas correspondentes (LEE, BITHELL & FOERSTER *et al.*, 2009).

Causas de anemia podem envolver produção eritrocitária reduzida, produção de formas anormais, ou ainda excesso de destruição de eritrócitos, o que caracteriza as doenças hemolíticas (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

As anemias podem ser classificadas em arregenerativas e regenerativas, dependendo da capacidade e da necessidade da medula óssea em responder com a produção de eritrócitos. Em relação ao tamanho e cor dos eritrócitos, as anemias podem ser classificadas em normocíticas, microcíticas ou macrocíticas e hipocrômicas ou normocrômicas, respectivamente (BAIN, 1995).

2.3 DOENÇAS HEMOLÍTICAS

As doenças hemolíticas se caracterizam pela diminuição do tempo de vida dos eritrócitos no organismo em relação ao normal, ou seja, pela exacerbação do processo hemolítico podendo ser acompanhadas de anemia, a depender da intensidade do processo hemolítico e do grau de resposta da medula óssea, que intensifica a eritropoiese a partir da necessidade de liberação de novos eritrócitos (PERROTA, GALLAGHER & MOHANDAS 2008).

Nesta tentativa de compensação de hemólise, a medula óssea pode aumentar sua produção em até 7 a 8 vezes. Com produção intensa, nem todas as células liberadas para a corrente sanguínea passam pelo processo completo de maturação, o que faz com que seja possível detectar maior número de reticulócitos no sangue periférico, o que evidencia a atividade mais intensa da medula óssea. O grau da anemia e o tempo de sobrevivência dos eritrócitos determinam os sinais de hemólise, bem como sua intensidade (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009).

A suspeita de doença hemolítica é confirmada pelos chamados sinais de hemólise, como aumento da concentração de reticulócitos, anisocitose, policromatofilia, presença de eritroblastos e alterações de forma dos eritrócitos (PERROTA, GALLAGHER & MOHANDAS 2008).

As doenças hemolíticas podem ser herdadas ou adquiridas. Entre as anemias hemolíticas herdadas encontram-se hemoglobinopatias, eritroenzimopatias e defeitos da membrana eritrocitária. Enquanto que entre as adquiridas, há as imunohemolíticas, por reação transfusional; por fragmentação mecânica, entre outras (BAIN, 1995).

2.3.1 Avaliação laboratorial

Inicialmente a avaliação laboratorial deve fornecer informações sobre a presença ou ausência de anemia e de hemólise. Para tanto é realizado o hemograma, no qual se avalia a concentração de hemoglobina e os sinais característicos de hemólise (BIANCHI, FERMO, VERCELATTI *et al.*, 2012).

Quando confirmada a presença de hemólise, exames específicos devem ser realizados para o diagnóstico diferencial, considerando as suas prováveis causas. Exames comumente utilizados são: contagem de reticulócitos; observação microscópica da morfologia eritrocitária, com o objetivo de buscar formas eritrocitárias características associadas às possíveis causas de hemólise; auto-aglutinação; dosagem de bilirrubina não conjugada e haptoglobina sérica (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

A dosagem de bilirrubina não conjugada, pré-hepática, deve ser realizada com o objetivo de apontar a destruição exagerada de eritrócitos, que gera excesso de protoporfirina, resultando em maior quantidade de bilirrubina não-conjugada, que ao passar pelo fígado, irá se conjugar ao ácido glicurônico para ser excretada para o trato digestivo (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

As cadeias α de hemoglobina se dissociam das cadeias β após hemólise e se ligam as cadeias β da haptoglobina sérica, formando um complexo que pode ser diferenciado da hemoglobina livre por análise cromatográfica. Altas concentrações de haptoglobina sérica ligada a cadeias α de hemoglobina podem ser detectados em processos hemolíticos intensos (LEWIS, BAIN & BATES, 2006). A partir da caracterização da hemólise e de sua possível causa, deve-se avaliar o histórico familiar em relação a doenças hemolíticas e aos hábitos do paciente, incluindo sua alimentação e uso de drogas (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009).

Nesta etapa, devem ser realizados testes que excluam anemia falciforme, uma das doenças hemolíticas herdadas mais comuns. Esta doença, de caráter homocigoto, causa hemólise eritrocitária devido à mutação no gene responsável pela produção de hemoglobina A, fazendo com que esta passe de um genótipo típico, que determina a formação de duas cadeias de hemoglobina α e duas β , para um alterado com duas cadeias α e duas β^S . Esta alteração de genótipo ocorre a partir da substituição do sexto aminoácido da cadeia β , de ácido glutâmico para valina (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009). Sua identificação pode ser realizada através de visualização ao microscópio, de eritrócitos em forma de foice, por teste de falcização, teste de solubilidade de hemoglobinas, eletroforese de hemoglobinas e ou teste com anticorpos monoclonais específicos para hemoglobina S (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

Outras doenças que devem ser investigadas são as talassemias, que se apresentam pela deficiência na produção de um ou mais tipos de cadeias da hemoglobina. Conseqüentemente o paciente poderá apresentar uma anemia microcítica e hipocrômica leve, moderada ou mesmo grave, acompanhada do acúmulo das cadeias produzidas em quantidade normal. O diagnóstico no caso das β talassemias, é realizado a partir da dosagem de hemoglobina A₂, que pode ser realizado por cromatografia líquida de alta resolução ou em microcoluna e no caso das α -talassemias, pela dosagem de hemoglobinas F, H e Bart's (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009).

Além dos testes já citados, é necessário realizar o teste direto da antiglobulina (DAT) para descartar possíveis anemias imuno-hemolíticas, como a anemia hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade materno-fetal e reações transfusionais (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

Há ainda o grupo das eritroenzimopatias, como as doenças hemolíticas provocadas pela deficiência da enzima G6-PD, que afeta mais de 400 milhões de pessoas no mundo, de piruvatoquinase (PK) ou de outras enzimas. A G6-PD é responsável pela redução de NADP a NADPH. Na deficiência grave dessa enzima, em situações de estresse oxidativo, há acúmulo de agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio e dissulfetos, que contribuem para exacerbar o processo, levando a hemólise. Esta hemólise tende a ser compensada pela medula óssea, gerando os sinais característicos (BEUTLER, 2001). No caso da deficiência de piruvato quinase, uma das enzimas reguladoras do ciclo de Embden-Meyerhof, há diminuição da regeneração do ATP, com conseqüente falha na formação do lactato, formação de equinócitos e microesferócitos e hemólise de grau variado, que tende a melhorar após esplenectomia (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD, 2004). Para se descartar a deficiência destas enzimas devem ser realizados testes que avaliem sua atividade enzimática (BEUTLER, 1985; LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

A partir da exclusão das doenças citadas, entre outras, inicia-se a investigação específica para doenças por defeito de membrana eritrocitária. Vários testes podem ser utilizados, entre eles: fragilidade osmótica (FO), tempo de lise em glicerol acidificado (AGLT), crio-hemólise, SDS-PAGE e eosina 5-maleimida (EMA) (KING & ZANELLA, 2013; LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

Eosina 5-maleimida (EMA) é um composto fluorescente que se liga à proteína de banda 3. Na ausência ou redução desta proteína a intensidade do sinal fluorescente emitido em citômetro de fluxo, é menor em relação a eritrócitos com concentração normal de banda 3, evidenciando assim um defeito de membrana eritrocitária. Apesar de se ligar apenas à proteína de banda 3, a EMA emite, também, sinal de menor intensidade em casos de deficiência de outras proteínas de membrana (KING & ZANELLA, 2013). Este teste apresenta alta especificidade e maior sensibilidade que o AGLT (MARIANI, BARCELLINI & VERCELLATTI, *et. al.* 2008). O ensaio de EMA não será realizado neste trabalho devido ao custo e a não disponibilidade de citômetro de fluxo adaptado para a investigação de células da série vermelha.

O teste de criohemólise é definido como a porcentagem de lise em meio hipertônico a 0°C. Este teste é considerado mais específico para detectar a esferocitose hereditária por avaliar o grau de fragilidade apenas quando provocado pelo defeito molecular nas proteínas de membrana e não pela relação superfície/volume do eritrócito, como em outros testes. Porém, este teste não será desenvolvido neste trabalho por não apresentar um mecanismo completamente elucidado para a reação de criohemólise (STREICHMAN, GESCHEIDT, 1998).

A FO, baseada na técnica de Parpart e colaboradores (1947), avalia a quantidade de eritrócitos lisados em diferentes concentrações de salina tamponada, por meio de leitura espectrofotométrica da hemólise. Além da FO com sangue fresco, também pode ser realizada a análise com sangue incubado por 24 horas 37°C, de forma idêntica à FO imediata.

A resistência normal do eritrócito à hipotonia permite um aumento de volume de até 70%, antes de ser lisado. Esferócitos possuem este volume aumentado, independente da causa da alteração morfológica e estão mais propensos à lise devido ao fato de não absorverem água com a mesma capacidade. Diminuição na FO é característica de anemias ferropênicas e talassemias, casos em que os eritrócitos são mais resistentes à lise osmótica. Eritrócitos com defeitos de membrana geralmente apresentam ao contrário, fragilidade osmótica aumentada (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

No tempo de lise em glicerol acidificado (AGLT) (GOTTFRIED & ROBERTSON, 1974) adaptado por Zanella, adiciona-se glicerol a uma solução salina hipotônica tamponada, com a função de diminuir o influxo de água na célula, cronometrando-se o tempo até a hemólise dos eritrócitos. O tempo para ocorrer a lise difere entre células normais e esferócitos. A velocidade de hemólise é medida cineticamente pelo decréscimo da turvação do meio, medido em colorímetro fotoelétrico. O resultado é expresso como o tempo necessário para diminuição da densidade óptica à metade da inicial. O tempo para lise de esferócitos é de 25 a 150 seg, enquanto o de eritrócitos normais pode atingir até 1800 seg (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

A eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária com sulfato de dodecil sódico (SDS-PAGE) é uma técnica eletroforética em gel de poliacrilamida relacionada com o peso e a carga molecular, que pode identificar alterações qualitativas e quantitativas nas proteínas da membrana. Casos de esferocitose hereditária provocados pela deficiência de anquirina podem não ser detectados com esta técnica, pois os reticulócitos liberados para a corrente sanguínea como forma de compensação de hemólise pela medula óssea, apresentam grande concentração de anquirina. Nestes casos a SDS-PAGE irá apresentar uma banda de anquirina com concentração normal porém, esta aparente normalidade pode ser provocada pela alta concentração de anquirina presente nos reticulócitos (KING & ZANELLA, 2013).

O chamado *pink* teste é uma variação do AGLT na qual se emprega tampão com glicerol em concentração de 135 mmol/l. Este teste apresenta maior reprodutibilidade por não possuir os resultados dependentes de variações críticas de pH, porém, tem menos sensibilidade que o AGLT.

2.4 DOENÇAS HEMOLÍTICAS POR DEFEITO DE MEMBRANA

São doenças herdadas, que se desenvolvem a partir de genes que determinam defeitos quali ou quantitativos nas proteínas da membrana eritrocitária

(KING & ZANELLA, 2013) e resultam em esplenomegalia e icterícia (DA COSTA, GALIMAND, FENNETEAU *et al.*, 2013).

2.4.1 Esferocitose Hereditária (HS)

A esferocitose hereditária (HS) apresenta alta incidência em populações de países europeus (1:2000-3000) e em outros grupos étnicos (DA COSTA, GALIMAND, FENNETEAU *et al.*, 2013). É o grupo mais comum das anemias hemolíticas por defeito de membrana, causada por mutações nos genes responsáveis pela produção de anquirina (ANK1), α e β espectrina (SPTA1 e SPTB), banda 3 (SLC4A1) e proteína 4.2 (EPB42) (Quadro 1), por desordens genéticas de herança dominante, recessiva ou por mutações *de novo* (EBER & LUX, 2004).

PROTEÍNA	GENE	HERANÇA	BANDA REDUZIDA NO SDS-PAGE	PREVALÊNCIA
Anquirina	ANK1	Dominante Recessiva De novo	Anquirina, Espectrina, Proteína 4.2	40-65%
BANDA 3	SLC4A1	Dominante Recessiva De novo	Banda 3 Proteína 4.2	20-35%
α -ESPECTRINA	SPTA1	Recessiva	α -espectrina	<5%
β -ESPECTRINA	SPTB	Dominante De novo	β –espectrina	15-30%
PROTEÍNA 4.2	EPB42	Recessiva	Proteína 4.2	<5% Europa e USA 45-50% Japão

QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA NA ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA.

FONTE: Adaptado de PERROTA, GALLAGHER & MOHANDAS (2008)

A HS pode ser caracterizada quanto ao grau de severidade da doença em leve, moderada, moderadamente severa e severa, de acordo com o grau de anemia. Na HS leve há compensação da hemólise pelo baço, leve reticulocitose, geralmente

os pacientes não apresentam anemia e são assintomáticos. As manifestações clínicas da HS, que podem apresentar diferentes intensidades de acordo com o grau de severidade da desordem são: anemia, esplenomegalia, icterícia por hemólise ou por obstrução biliar, cálculos biliares, reticulocitose, esferocitose, aumento na proporção de células hiperdensas (PERROTTA, GALLAGHER & MOHANDAS, 2008). A HS moderada é a mais comum, com os níveis de hemoglobina entre 8 e 11 g/dL e a concentração de esferócitos no sangue periférico, em geral, acima de 8%. Na HS moderadamente severa há baixos níveis de hemoglobina, entre 6 e 8 g/dL. Na maioria dos casos, em pacientes que necessitam de transfusões, a reticulocitose está acima de 15% e o aumento nas concentrações de bilirrubina é facilmente evidenciado. A maioria dos pacientes com HS severa apresentam herança autossômica recessiva, hemoglobina abaixo de 6g/dL, necessitam de transfusões constantes e em alguns casos, é necessária uma terapia de quelação de ferro (EBER & LUX, 2004).

Aproximadamente 50% das crianças com HS desenvolvem severa icterícia neonatal. No entanto, pouco mais da metade dos pacientes recém-nascidos com HS apresentam valores de hemoglobina dentro da normalidade, indicando a ausência de hemólise intrauterina. A ausência de anemia em neonatos com HS propicia baixos índices de detecção da doença ao nascimento (EBER & LUX, 2004). Porém, em pacientes com HS, os valores de hemoglobina podem declinar intensamente durante as três primeiras semanas de vida, podendo levar à necessidade de transfusão sanguínea (DELHOMMEAU, CYNOBER & SCHISCHMANOFF *et al.* 2000).

No estudo de pacientes com HS, há relatos de estresse oxidativo eritrocitário, demonstrando que processo hemolítico pode ser agravado pela lise provocada pelo desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes. Nestes casos, identificou-se aumento de espécies reativas de oxigênio e de peroxidação lipídica, além de baixos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (GHOTI, FIBACH & DANA, *et al.* 2010).

2.4.2 Piropoiquilocitose Hereditária

Piropoiquilocitose Hereditária (HPP) é uma forma grave de HS, geralmente diagnosticada logo após o nascimento e que requer transfusões de sangue nos primeiros meses de vida (GALLAGHER, 2004). Nesta desordem se detecta mutações no gene SPTA1, que envolve a produção de α -espectrina (PERROTA, GALLAGHER & MOHANDAS, 2008). Na HPP os níveis de Hb são baixos, em geral inferiores a 8 g/dl e os pacientes passam por transfusões constantes além de serem submetidos à terapia de quelação de ferro, instituída logo após o diagnóstico (EBER & LUX, 2004)

2.4.3 Eliptocitose Hereditária

A eliptocitose (HE) se caracteriza pela redução nas interações dos dímeros de espectrina e nas interações espectrina-actina-proteína 4.1R ou ainda pela diminuição de suas concentrações, fazendo com que o eritrócito adquira forma elíptica (GALLAGHER, 2004). A HE é comum em regiões endêmicas para a malária, principalmente na África. Nos EUA a prevalência é de 1 para cada 2 a 4 mil pessoas (WYANDT, BANCROFT & WENSHIP, 1941)

O paciente com HE apresenta um genótipo heterogêneo, com herança autossômica dominante. Os genes mutados na HE, descritos até o momento são: SPTA1, SPTB ou EPB41, este último associado à expressão da proteína 4.1. A HE pode ser assintomática, ou mesmo apresentar icterícia, hemólise ou esplenomegalia. Em alguns casos, relatou-se icterícia neonatal e hidropsia fetal associados à eliptocitose (DA COSTA, GALIMAND, FENNETEAU *et al.*, 2013).

2.4.4 Estomatocitose Hereditária

A estomatocitose hereditária (HSt) deriva de herança autossômica dominante e resulta em poros na membrana celular, que propiciam o aumento da concentração

de sódio intracelular e consequente desregulação nas concentrações de cátions (BRUCE, GUIZOUARN, BURTON *et al.*, 2009). Uma das alterações ocorridas na HSt está associada ao aumento de sódio nos eritrócitos e consequente influxo de água, e outra conhecida como xerocitose, representa a diminuição na concentração intracelular de potássio, resultando em desidratação (MOHANDAS & GALLAGHER, 2008) e está associada a mutações no gene EPB42, que expressa a proteína 4.2 (PERROTA, GALLAGHER & MOHANDAS, 2008).

A xerocitose apresenta fenótipo que varia entre anemia leve e moderada, diferente da HSt por influxo de sódio que apesar de mais rara, apresenta um fenótipo mais severo (DA COSTA, GALIMAND, FENNETEAU *et al.*, 2013).

As doenças hemolíticas por defeito da membrana eritrocitária são extensamente variáveis quanto à herança genética e às manifestações clínicas e podem ser confundidas entre si e com outras doenças hemolíticas, o que torna relevante o emprego de estratégias adequadas para confirmação do seu diagnóstico. Assim, o estudo da validade dos métodos laboratoriais mais utilizados como FO e AGLT, pode vir a esclarecer a respeito da necessidade de empregá-los ou não para aperfeiçoar o diagnóstico diferencial entre esferocitose hereditária, o defeito mais frequente, outros defeitos da membrana eritrocitária e outras doenças hemolíticas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar comparativamente exames laboratoriais empregados para o diagnóstico e acompanhamento de esferocitose hereditária.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Coletar dados retrospectivos de pacientes com diagnóstico presuntivo de HS;
- b) Promover a investigação laboratorial de pacientes com diagnóstico presuntivo de HS com o auxílio da determinação de FO, AGLT, quantificação de formas eritrocitárias anormais e SDS-PAGE;
- c) Detectar o grau de sensibilidade de FO, FOi, AGLT, porcentagem de esferócitos e SDS-PAGE;
- d) Determinar a concentração de bilirrubina e metehemoglobina.
- e) Correlacionar os resultados dos testes laboratoriais entre si.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras

Amostras de 1 a 10 ml de sangue venoso anticoagulado em duas alíquotas, em EDTAK₃ (1 mg/ml) e em heparina sódica (20 µl/ml) foram coletadas de 18 crianças de ambos os sexos, com idades entre 0 e 12 anos, com diagnóstico presuntivo de esferocitose hereditária, atendidas no Ambulatório de Hemopediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná da UFPR (HC-UFPR), Curitiba-PR;, e de: 6 crianças consideradas saudáveis, por apresentarem hemograma normal, com idades entre 7 e 11 anos, participantes do Projeto de Extensão “Incidência de anemias e parasitoses em crianças em idade escolar nas escolas municipais da região de metropolitana de Curitiba realizado no Laboratório de Análises Clínicas Escola da UFPR (LAC-UFPR) sob número de aprovação 83313 (PROEC),(grupo controle).

Os responsáveis legais pelos indivíduos sujeitos da pesquisa foram conscientizados a respeito da importância deste estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Saúde da Universidade Federal do Paraná, sob n.: 25387814.4.0000.0102, concordando, assim, em participar da pesquisa.

4.1.2 Reagentes

Para a realização deste trabalho foram utilizados NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ (Vetec), K₂HPO₄ (Reagen), Na₂HPO₄.12H₂O (Baker), fluoreto de metilfenilsulfonil, saponina, albumina bovina, azul de Coomassie R-250 e N-N'-N'-N' tetra etilenodiamino (Sigma), N-N'-metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad), glicerol (Ecibra), corantes Giemsa e May-Grunwald (Bioprov), kit para dosagem de bilirrubina e kit

padrão de bilirrubina (Labtest), persulfato de amônio (Synth), dodecil sulfato de sódio (BIO AGENCY).

4.1.3 Equipamentos

Para a realização das análises, foram utilizados os seguintes equipamentos: centrífuga minispin (Eppendorf); centrífuga refrigerada 4K15 (Sigma); espectrofotômetro (Cintra 10); sistema de eletroforese vertical mini-protean tetra system 2 géis, 0.75mm (Bio-Rad); balança analítica (BelEngineering); microscópio óptico (Nikon Eclipse E200); fotômetro de microplaca (Thermo Scientific Multiskan FC); pHmetro (Mettler Toledo MP200); banho maria (Fanem 100).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de dados retrospectivos

Dados retrospectivos do prontuário de cada paciente, referentes as informações obtidas nas consultas e exames laboratoriais iniciais realizados no HC-UFPR na investigação de HS: idade, gênero, histórico familiar de anemia, concentração de hemoglobina (Hb), volume globular (VG), uso de medicamentos, resultados de fragilidade osmótica (FO) e de fragilidade osmótica pós-incubação (FOi).

4.2.1.1 Fragilidade Osmótica (FO)

Análise realizada como descrita por Parpart e colaboradores (1947), com adaptações. Utilizou-se como amostra, sangue venoso heparinizado e, como reagentes, soluções de cloreto de sódio em tampão fosfato, Na_2HPO_4 13,65 g e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,34 g, pH 7,2, equivalentes a concentrações de 1, 2, 3, 3,5, 4, 5, 5,5, 6, 6,5, 7,5 e 9 g de NaCl/l. As análises foram realizadas até 2 horas após a

coleta e as amostras, conservadas a 4°C. Em tubos de ensaio, adicionou-se 10 µl de sangue a 1 ml de cada uma das respectivas soluções ou de água destilada. Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas por inversão, mantidas em temperatura ambiente por 30 min, novamente homogeneizadas e centrifugadas a 1200 x g por 5 min. Para determinação da % de hemólise, transferiu-se 300 µl de cada sobrenadante para poços de microplaca e, em seguida, leu-se a densidade óptica a 540 nm em fotômetro de microplaca, atribuindo-se o valor de 100% de hemólise à leitura do sobrenadante do tubo com água destilada.

Os resultados foram expressos na forma de curvas de fragilidade osmótica, com as concentrações de NaCl no eixo dos X e a porcentagem de hemólise no eixo dos Y. Eritrócitos de pacientes que apresentaram curvas desviadas para a direita em relação à obtida com eritrócitos normais e que apresentaram hemólise em concentrações de cloreto de sódio acima da faixa de referência, foram caracterizados como tendo FO aumentada. Ao contrário, os que apresentaram curvas desviadas para a esquerda e hemólise em concentrações de cloreto de sódio abaixo da faixa de referência, foram como tendo fragilidade osmótica diminuída. Há três faixas de referências a serem consideradas: resistência globular mínima (RGMín), definida como a mais alta concentração de salina em que a hemólise foi detectada; resistência globular máxima (RGMáx), a mais alta concentração em que a hemólise foi total, e; fragilidade globular mediana (FGM), a concentração que causou 50% de hemólise. Os valores de referência para o teste são: 5 g/l para resistência globular mínima ou lise inicial; 3 g/l para resistência globular máxima ou lise completa, e; 4 a 4,5 g/l para fragilidade globular mediana (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

4.2.1.2 Fragilidade Osmótica Pós-Incubação (FOi)

Realizou-se também o teste de FOi após incubação das amostras coletadas em heparina sódica por 24 horas a 37°C. As concentrações de cloreto de sódio utilizadas foram de 1, 2, 3, 3,5, 4, 5, 5,5, 6, 6,5, 7,5, 9 e 12 g de NaCl/l. Tanto as análises quanto a expressão dos resultados foram realizadas seguindo a técnica de FO (subitem 4.2.1.1).

Os valores de referência para FOi são: 7 g/l para resistência globular mínima; 2 g/l para resistência globular máxima; e 4,65 a 5,9 g/l para resistência globular mediana (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

4.2.1.3 Teste de Lise em Glicerol Acidificado (AGLT)

Empregou-se a técnica descrita por Gottfried & Robertson (1974), modificada por Zanella. Colocou-se 5 ml de tampão fosfato salina preparado com 9 partes de NaCl 154 mmol/l e 1 parte de tampão fosfato 100 mmol/L (Na_2HPO_4 , 14,9 g/L e KH_2PO_4 13,61 g/L), pH 6,85, em tubo de ensaio, acrescido de 20 μl de sangue anticoagulado com EDTA K_3 . Transferiu-se 0,5 ml da suspensão para cubeta de espectrofotômetro com capacidade para 3 ml, alojando-a no equipamento. Com comprimento de onda ajustado para leitura em 625 nm, adicionou-se 1 ml de glicerol, homogeneizando-se rápida e cuidadosamente com auxílio do micropipetador. Com cronômetro, acompanhou-se o cursor do espectrofotômetro e encerrou-se a contagem do tempo quando a leitura correspondeu à metade da inicial. O resultado foi expresso como tempo, em segundos, necessário para reduzir em 50% a densidade óptica. Para eritrócitos normais este valor pode chegar a 1800 seg enquanto, para esferócitos, se mantém entre 25 e 150 seg (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

4.2.1.4 Contagem diferencial das formas eritrocitárias em microscopia óptica

Logo após a coleta, colocou-se 20 μl de sangue anticoagulado com EDTA K_3 próximo à extremidade de uma lâmina de microscopia. Com o auxílio de lâmina extensora, distribuiu-se o sangue em movimento retilíneo uniforme único, para obtenção da extensão sanguínea e a seguir, o material permaneceu em temperatura ambiente até completa secagem. Após, 20 gotas de corante de May-Grunwald foram dispensados sobre a extensão e, após 2 min, diluiu-se com a adição de 20 gotas de água ultrapura. Após mais 2 min desprezou-se a água da lâmina e adicionou-se 20 gotas de corante de Giemsa diluídas (3 gotas para cada 2 ml de água tamponada pH 7,0). Decorridos 10 min, desprezou-se o corante e lavou-se a lâmina em água

corrente. Após secagem, o material foi analisado ao microscópio óptico, determinando-se a % de esferócitos e registrando-se a presença de outras formas eritrocitárias, segundo os critérios morfológicos de BESSIS (1972), definidos no QUADRO 2. As contagens foram realizadas por dois examinadores de forma independente, sendo que cada um deles avaliou ao menos 5 campos em objetiva de imersão (1000x), nos quais os eritrócitos se apresentassem espalhados, sem superposições ou deformações por contato direto entre si. Desta forma, cada examinador contou entre 500 e 1000 células. Na comparação entre os resultados obtidos por ambos, quando não houve consenso, estabeleceu-se os valores médios entre resultados.

FORMA ERITROCITÁRIA	BESSIS (1972)
1. DISCÓCITOS	1.1 Discócito
	1.2 Discoequinócito
	1.3 Discoestomatócito
2. EQUINÓCITOS	2.1 Equinócito I
	2.2 Equiócito II
	2.3 Equinócito III
	2.4 Equinoesferócito
3. ESTOMATÓCITOS	3.1 Estomatócito I
	3.2 Estomatócito II
	3.3 Estomatócito III
	3.4 Estomatoesferócito
4. ESFERÓCITO	4.1 Esferócito

QUADRO 2 – CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS PARA DIFERENCIAÇÃO DE ERITRÓCITOS.

FONTE: BESSIS (1972)

4.2.1.5 Eletroforese de Proteínas de Membrana Eritrocitária

a) Isolamento das membranas eritrocitárias (*ghosts*)

O estroma eritrocitário utilizado na análise eletroforética foi obtido a partir do método de DODGE, MITCHELL & HANAHAN (1963), modificado. O sangue, anticoagulado com EDTA_{K3}, foi lavado três vezes com NaCl 9 g/l por centrifugação a 5000 x g por 10 min, retirando-se o sobrenadante e a camada leucocitária a cada lavagem. Em seguida adicionou-se, a cada ml de sedimento de eritrócitos, 8 ml de

tampão fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5mmoles/l, pH 8,0, acrescido de fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSF) 0,2 mmoles/l. Centrifugou-se a 10000 x g por 20 min, retirando-se o sobrenadante. Repetiu-se a centrifugação e lavagem por sete vezes, ou até que o estroma estivesse aparentemente livre de hemoglobina ou seja, com coloração esbranquiçada.

Realizou-se a quantificação de proteínas dos *ghosts* pelo método de BRADFORD (1976), adaptado. Como padrão, criou-se uma curva de albumina bovina (BSA), com concentrações de 1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/ml. As amostras foram diluídas 1:100 e, a partir da equação de reta, gerada pela absorbância da curva padrão, obteve-se a concentração de proteínas.

b) Eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato (SDS-PAGE)

A corrida eletroforética foi realizada conforme método de FAIRBANKS *et. al.* (1971) modificado, com gel de poli(acrilamida) 5 a 15 %, preparado com 8 ml de água ultrapura; 4 ml de tampão Tris 1,5 M pH 8,8, 4 ml acrilamida: N-N'-metileno-bis-acrilamida, 30:0,8 g/dl; 40 µl de persulfato de amônio 10% (p/v) (APS); 20 µl de N, N, N', N'-tetraetilenodiamino (TEMED); 250 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 g/dl. Com o auxílio de bomba peristáltica, o gel foi inserido em gradiente de concentração, da mais alta para a mais baixa, entre duas placas de vidro, distanciadas por separadores em acrílico com 1 mm de espessura e inseridas na cuba eletroforética. Em seguida, gotas de butanol foram inseridas sobre o gel para evitar a formação de bolhas de ar e auxiliar no alinhamento do gel durante a polimerização. Após a gelificação, o butanol foi removido. Sobre o gel em gradiente de concentração foi inserido gel de alinhamento, preparado a partir de 3,7 ml de água ultrapura; 1,5 ml de tampão Tris 0,5 M, pH 6,8; 250 µl de dodecil sulfato de sódio 10 g/dl, 1 ml de acrilamida: N-N'-metileno-bis-acrilamida 30:0,8g, 40 µl de APS, e; 20 µl de TEMED. Sobre a mistura ainda líquida, inseriu-se o pente formador de poços. Após a polimerização do gel de alinhamento, retirou-se o pente.

Foram aplicadas nos poços alíquotas de *ghosts* eritrocitários contendo 8 μg de proteínas. A corrida foi realizada com voltagem de 40 A por 12 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado com solução de azul de Comassie Blue R-250 a 0,25 g/dl, por 5 min e descorado com metanol 50% (v/v).

As bandas foram comparadas com padrão e controle obtido por ROCHA (2010) , conforme FIGURA 3.

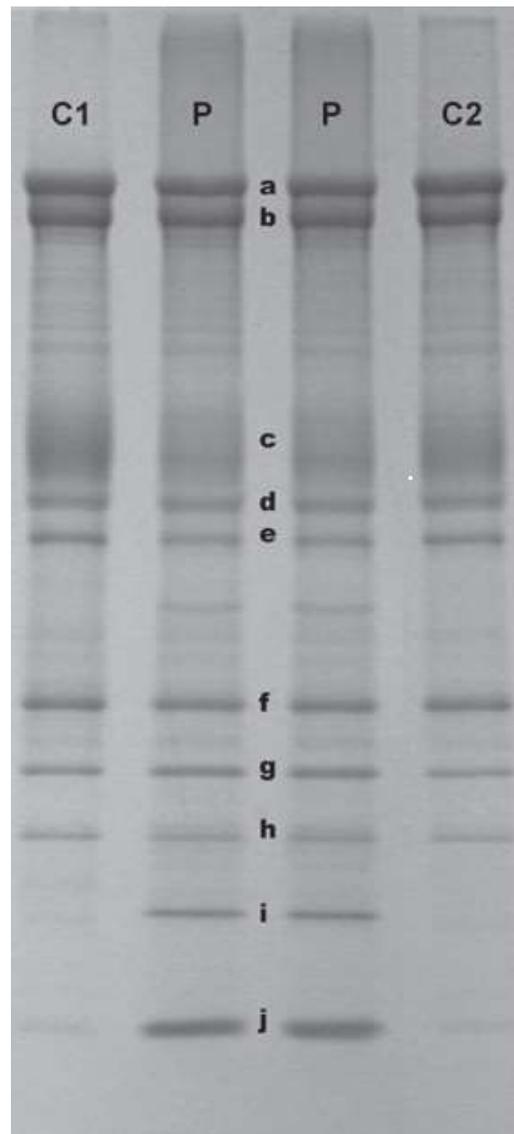


FIGURA 3 – CORRIDA ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA (SDS-PAGE) EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE, DE AMOSTRAS CONTROLE E PADRÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS.

FONTE: ROCHA (2010).

NOTA: a= α -espectrina; b= β -espectrina e anquirina; c=banda 3; d=proteína 4.1; e=proteína 4.2; f=actina; g=gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; h= tropomiosina; i=peroxiredoxina 2; j=cadeias de globinas.

4.2.1.6 Dosagem de Bilirrubina

Técnica realizada com *kit* comercial Labtest para dosagem de bilirrubina, contendo ácido sulfanílico, nitrito de sódio e acelerador além de *kit* para dosagem da concentração padrão de bilirrubina. A formação do diazo reagente se deu pela junção de 10 µl de nitrito de sódio e 300 µl de ácido sulfanílico. Em tubo identificado branco, inseriu-se 1 ml de água deionizada, 0,1 ml do ácido sulfanílico e 0,05 ml de amostra; em tubo identificado como bilirrubina direta, 1,0 ml de água deionizada, 0,1 ml de diazo reagente e 0,05 ml de amostra, e em tubo marcado como bilirrubina total, 1 ml de acelerador, 0,1 ml de diazo reagente e 0,05 ml de amostra.

Após homogeneização, as amostras ficaram em repouso por 5 min. As absorbâncias das bilirrubinas direta e total foram determinadas em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 525 nm. O branco foi utilizado para zerar o equipamento. Para a determinação da concentração do padrão, seguiu-se a mesma técnica. Inseriu-se os valores de absorbância no cálculo:

$$\text{Bilirrubina (mg/dl)} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do Padrão}) \times 10.$$

A bilirrubina indireta foi obtida pela diferença entre as bilirrubinas total e direta. Os valores de referência para a concentração de bilirrubina foram: Bilirrubina total, inferior a 1,2 g/l, bilirrubina indireta, inferior a 0,8 g/l, bilirrubina direta, inferior a 0,4 g/l (NATHAN, ORKIN & GINSBURG *et al.*, 1998)

4.2.1.7 Meta-hemoglobina (metaHb)

Técnica realizada conforme metodologia de Naoun *et al.* (2004) onde preparou-se a amostra de sangue, coletada em EDTAK₃, lavando os eritrócitos por três vezes com NaCl 9 g/l por centrifugação a 1200 x g por 5 min, desprezando-se o sobrenadante. Após as lavagens, preparou-se uma suspensão de eritrócitos (VG=10%) em tampão fosfato, Na₂HPO₄- KH₂PO₄ 100 mmoles/l, pH 6,85 em NaCl 9 g/l.

Em um tubo indentificado como A, inseriu-se 100 µl da suspensão de eritrócitos e 100 µl de saponina 1 g/dl. Após agitação, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 60 mmoles/l, pH 6,8, homogeneizando-se a solução por inversão.

Em outro tubo identificado como B, adicionou-se 100 µl da solução contida no tubo A e 1 ml do tampão fosfato. Após homogeneização por inversão, foram realizadas duas leituras de absorbância, no tubo A a 630 nm e no tubo B a 540 nm, utilizando-se o tampão fosfato como branco. Os valores de absorbância obtidos foram inseridos no cálculo:

$$\% \text{metaHb} = ([A] \text{ Tubo A} \times 100) / ([A] \text{ Tubo A} + ([A] \text{ Tubo B} \times 10))$$

A faixa de referência para metaHb em crianças é de 3,61 a 6,44 (RECHETZKI, HENNEBERG & SILVA et. al., 2012).

5 RESULTADOS

5.1 DADOS RETROSPECTIVOS

Para o estudo do grupo de pacientes com diagnóstico presuntivo de esferocitose hereditária, os dados retrospectivos dos mesmos, obtidos de seus respectivos prontuários no HC-UFPR, estão expressos no QUADRO 3. Nele, estão apresentados: gênero, feminino (8) e masculino (10); histórico familiar de esferocitose hereditária (HF), pelo qual as mães de 4 dos 18 pacientes haviam sido presuntivamente diagnosticadas com esferocitose hereditária; FO e FOi aumentada em 7 e 8 pacientes (n=10), respectivamente; volume globular reduzido em 7 casos (n=9); ; concentração que Hb que evidenciava 7 casos de anemia moderada (8 a 11 g/dl) e 2 de anemia moderadamente severa (6 a 8 g/dl) (n=9).

AMOSTRA	GÊNERO	FO n=10	Foi n=10	VG (%) n=9	HB g/dl n=9
1	M	N	N	26,9	9,3
2	M	nd	nd	nd	Nd
3	F	N	A	26,6	9,1
4	F	A	A	24,1	8,2
5	M	A	A	23,8	7,2
6	F	N	A	nd	Nd
7	M	nd	nd	nd	Nd
8	F	nd	nd	nd	Nd
9	M	nd	nd	nd	Nd
10	F	nd	nd	nd	Nd
11	M	nd	nd	nd	Nd
12	M	nd	nd	nd	Nd
13	F	A	A	25,8	8,7
14	M	nd	nd	nd	Nd
15	F	A	N	27,6	9,1
16	F	A	A	33,5	12,4
17	M	A	A	34,9	11,8
18	M	A	A	19	6,2

QUADRO 3 – DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS RETROSPECTIVOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

FONTE: Prontuários HC-UFPR

NOTA: HF=Histórico familiar de esferocitose hereditária; FO=fragilidade osmótica imediata; FOi=fragilidade osmótica pós-incubação; VG=volume globular; Hb=hemoglobina; M=masculino; F=feminino; N=normal; A=aumentada; nd=não disponível.

5.2 EXAMES UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DE HS

A TABELA 1 apresenta os valores de RGMín, FGM e RGMáx no teste de FO das 16 amostras analisadas. Os GRÁFICOS 1, 2 e 3 apresentam as curvas de FO das 16 amostras analisadas. Os resultados ficaram acima da faixa de referência nas amostras 4, 5 (1b), 9, 10 (2a), (2b), 13 (2c) e 15 (3a).

A TABELA 2 apresenta os valores de RGMín, FGM e RGMáx no teste de FOi, das 16 amostras. Os GRÁFICOS 4, 5 e 6 apresentam as curvas de FOi das 16 amostras analisadas. Os resultados ficaram acima do valor de referência nas amostras , 2 (1a), 3, 4 (1b), 5, 6 (1c), 7, 9 (2a), 10,11 (2b), , 13 (2c) e 16 (3a).

A TABELA 3 apresenta os valores obtidos na análise de AGLT em 17 amostras de sangue, diminuídos em relação ao normal, em 16 casos, com valores abaixo de 150 seg.

As análises comparativas e porcentagens de concordância e discordância entre os resultados de FO, FOi e AGLT estão expressos nas TABELAS 4 e 5, sendo que a maior concordância encontrada foi entre AGLT e Foi, com 75%.

A TABELA 6 apresenta a porcentagem de esferócitos nas amostras de sangue periférico (n=8). Pode-se verificar a observação de esferócitos em todas as amostras analisadas, variando de 3 a 20%.

A TABELA 7 apresenta a análise comparativa e porcentagens de concordância e discordância entre os resultados de FO, FOi e AGLT com % de esferócitos.

No SDS-PAGE em gradiente de concentração de acrilamida (5-15%), corado com Comassie Blue (n=18) (FIGURAS 4 e 5), em comparação ao controle e padrão (ROCHA, COSTA & COSTA-PEREIRA *et. al.* 2010) (FIGURA 3), pela observação das bandas protéicas, pode-se sugerir 17 casos de redução de β -espectrina (todas, exceto amostra 8), 13 de α -espectrina (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 18), 12 de banda 3 (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 18), 2, de proteína 4.2 e 1 caso de diminuição da expressão de banda de proteína 4.1 (amostra 17), como relacionado no QUADRO 4.

A TABELA 8 apresenta as análises comparativas e as porcentagens de concordância e discordância entre resultados de redução de banda de α -espectrina no gel de SDS-PAGE com AGLT, FO, Foi e porcentagem de esferócitos. Comparando-se os resultados de redução de banda α -espectrina com AGLT, houve concordância em 14 casos (n=16), com FO, em 6 (n=16), com Foi em 10 (n=16), e com porcentagem de esferócitos em 8 (n=8), indicando, 87,4; 37,5, 62,5 e 100% de concordância, respectivamente.

A TABELA 9 apresenta as análises comparativas e porcentagens de concordância e discordância entre resultados de redução de banda β -espectrina no gel de SDS-PAGE com AGLT, FO e FOi. Comparando-se os resultados de redução de β -espectrina (n=16) com AGLT, houve concordância em 15 casos; com FO em 8 e; com FOi em 13; e com porcentagem de esferócitos 8 (n=8), mostrando 93,8; 50, 81.2% e 100% de concordância, respectivamente.

A TABELA 10 apresenta as análises comparativas e as porcentagens de concordância e discordância entre resultados de redução de banda 3 no gel de SDS-PAGE com AGLT, FO e FOi. Comparando-se os resultados de banda 3 com redução de AGLT houve concordância em 13 casos (n=16), com aumento de FO em 6 (n=16) e, com aumento de FOi em 9 (n=16), e com porcentagem de esferócitos 8 (n=8), o que corresponde a 81,2, 37,4, 56,2 e 100%, respectivamente.

Na TABELA 11 estão expressas as sensibilidades dos testes de FO, FOi e AGLT, porcentagem de esferócitos e SDS-PAGE, de 50, 81, 94, 100 e 100%, respectivamente, em relação ao diagnóstico presuntivo de HS.

TABELA 1 – VALORES DE RESISTÊNCIA GLOBULAR MÍNIMA (RGMin), FRAGILIDADE GLOBULAR MEDIANA (FGM) E RESISTÊNCIA GLOBULAR MÁXIMA (RGMax) PARA FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLINICAS - UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

AMOSTRA	RGMin (g/l)	FGM (g/l)	RGMax (g/l)
1	5	4	3
2	5	4	3
3	Nd	nd	nd
4	6	5,5	4
5	6,5	5,5	4
6	5	4	1
7	5	4	3
8	Nd	nd	nd
9	5,5	5	4
10	7,5	5	3
11	5	4	2
12	6	5	3,5
13	6,5	5,5	5
14	6	5	4
15	6,5	5	4
16	5	4	3
17	5	4	1
18	5	4	3

FONTE: A autora (2015)

NOTA: RGMin=resistência globular mínima; FGM=fragilidade globular mediana; RGMax=resistência globular máxima; Valores de Referência:RGMin=5, FGM=4-4,5, RGMax=3; n=16; cada resultado é média de dois experimentos independentes.

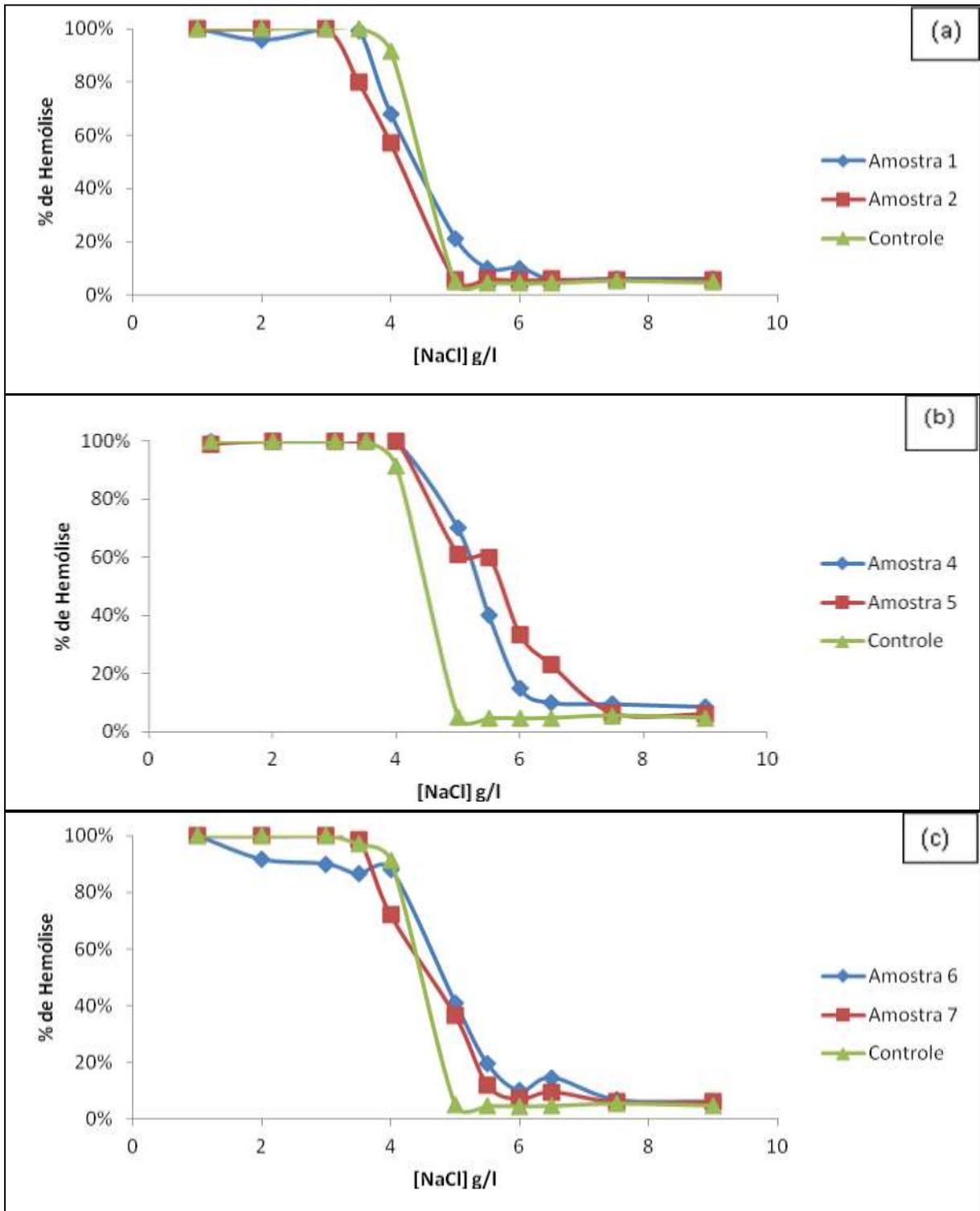


GRÁFICO 1- CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA (FO) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

FONTE: A autora (2015).

NOTA: Amostras 1 e 2 (a), 4 e 5 (b), 6 e 7 (c) (Ambulatório de Hemopediatria do Hospital de Clínicas-UFPR) e amostra controle de criança saudável (Laboratório Escola de Análises Clínicas-UFPR). Porcentagens de hemólise obtidas em concentrações crescentes de cloreto de sódio, até duas horas após a coleta de sangue e anticoagulação com heparina.

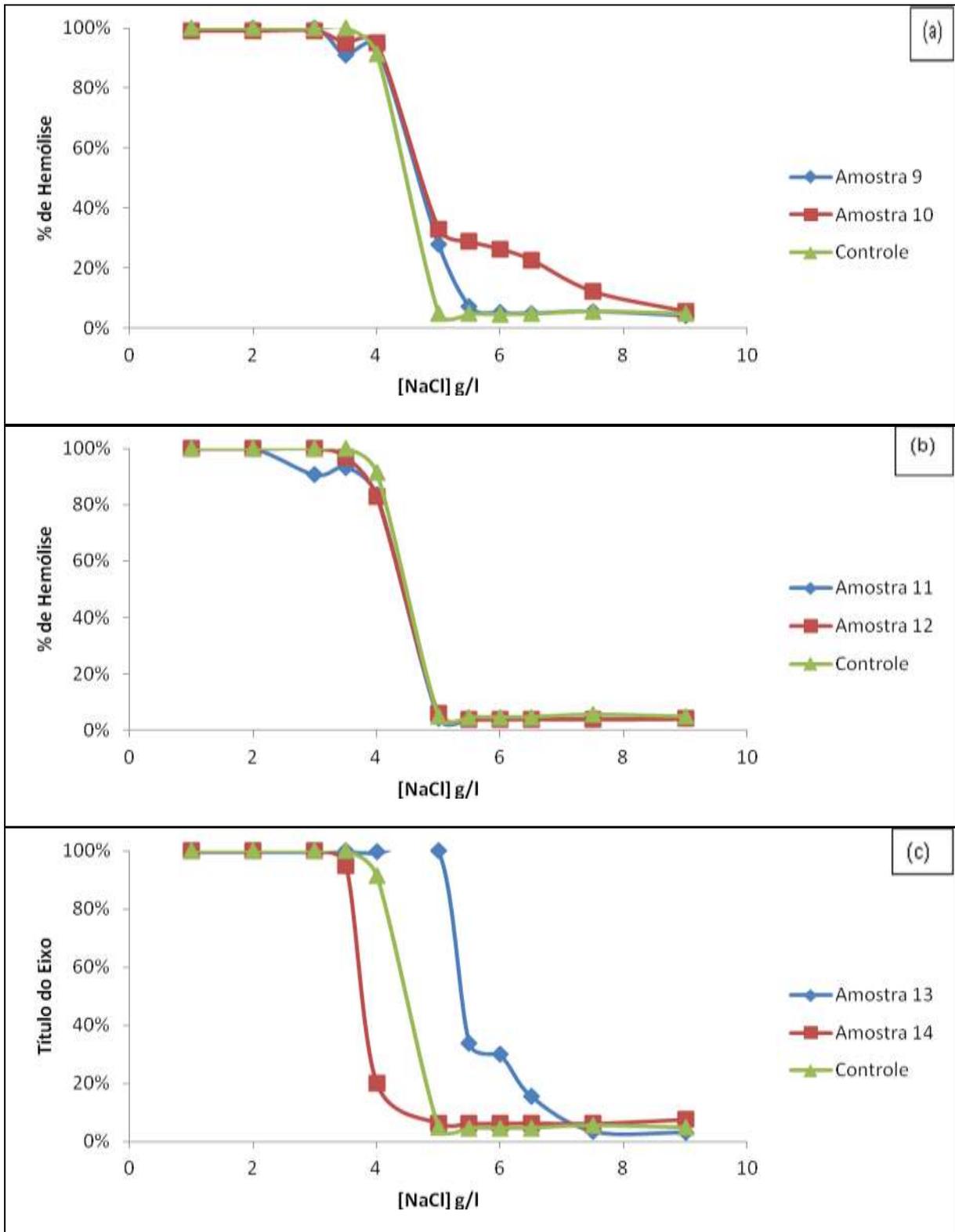


GRÁFICO 2- CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA (FO) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇA COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

FONTE: A autora (2015).

NOTA: Amostras 9 e 10 (a), 11 e 12 (b), 13 e 14 (c) (Ambulatório de Hemopediatria do Hospital de Clínicas-UFPR) e amostra controle de criança saudável (Laboratório Escola de Análises Clínicas-UFPR). Porcentagens de hemólise obtidas em concentrações crescentes de cloreto de sódio, até duas horas após a coleta de sangue e anticoagulação com heparina.

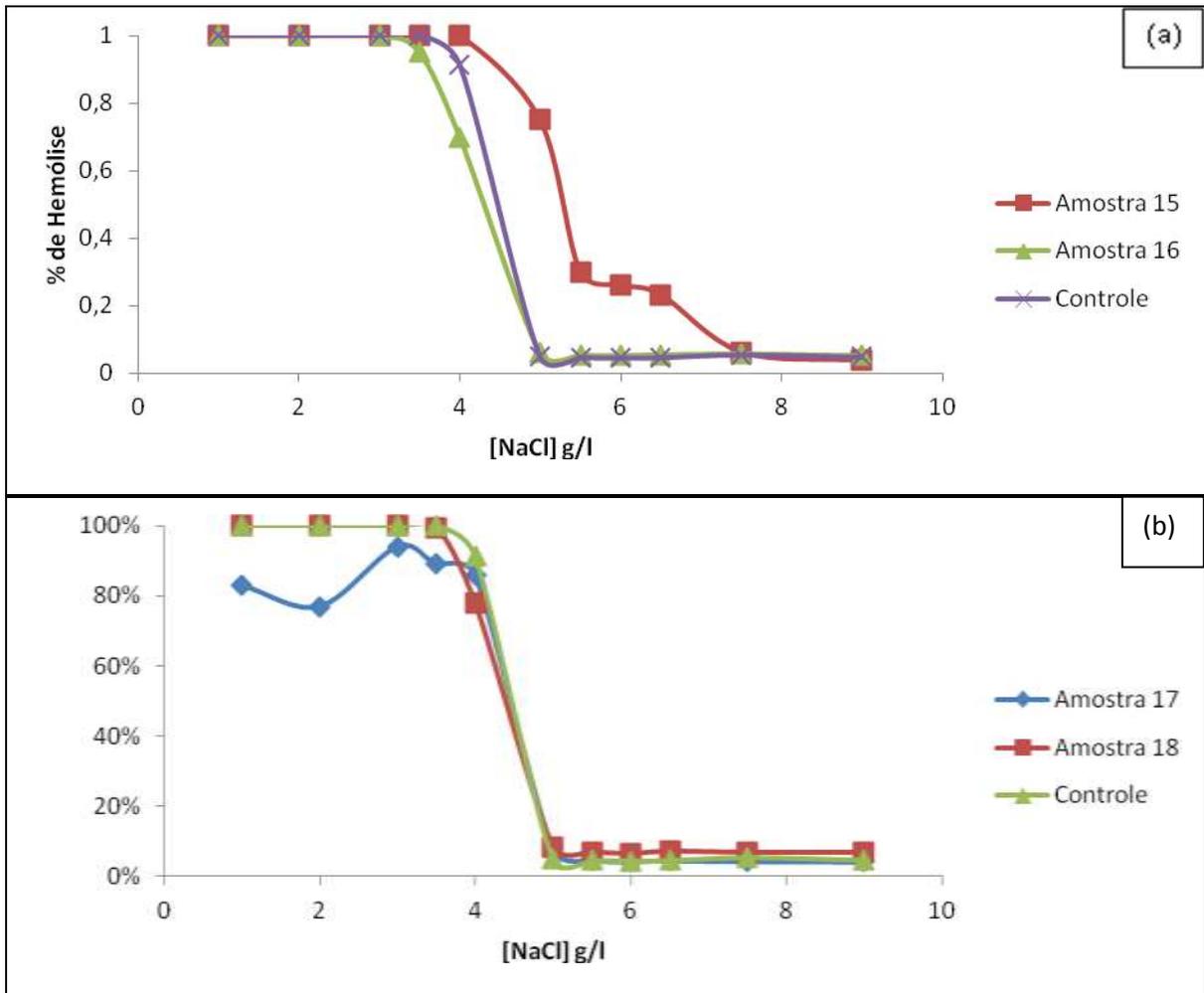


GRÁFICO 3- CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA IMEDIATA (FO) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇA COM DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

FONTE: A autora (2015).

NOTA: Amostras 15 e 16 (a), 17 e 18 (b) (Ambulatório de Hemopediatria do Hospital de Clínicas-UFPR) e amostra controle de criança saudável (Laboratório Escola de Análises Clínicas-UFPR). Porcentagens de hemólise obtidas em concentrações crescentes de cloreto de sódio, até duas horas após a coleta de sangue e anticoagulação com heparina.

TABELA 2 – VALORES DE RESISTÊNCIA GLOBULAR MÍNIMA (RGM_{min}), FRAGILIDADE GLOBULAR MEDIANA (FGM) E RESISTÊNCIA GLOBULAR MÁXIMA (RGM_{max}) PARA FOI DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

AMOSTRA	RGM _{min} (g/l)	FGM (g/l)	RGM _{max} (g/l)
1	6,5	5,5	5
2	9	7,5	2
3	9	6	1
4	9	6,5	1
5	12	7,5	3,5
6	12	7,5	1
7	9	7,5	3,5
8	Nd	nd	nd
9	9	7,5	1
10	9	7,5	1
11	7,5	6	3,5
12	7,5	5,5	3,5
13	9	7,5	3,5
14	6,5	5	1
15	Nd	nd	nd
16	7,5	6,5	3
17	6,5	5	1
18	7,5	6	2

FONTE: A autora (2015)

NOTA: RGM_{min}=resistência globular mínima; FGM=fragilidade globular mediana; RGM_{max}=resistência globular máxima; V.R RGM_{min}=7, FGM=4,65 – 5,9, RGM_{max}=2; cada resultado é média de dois experimentos independentes, n=16.

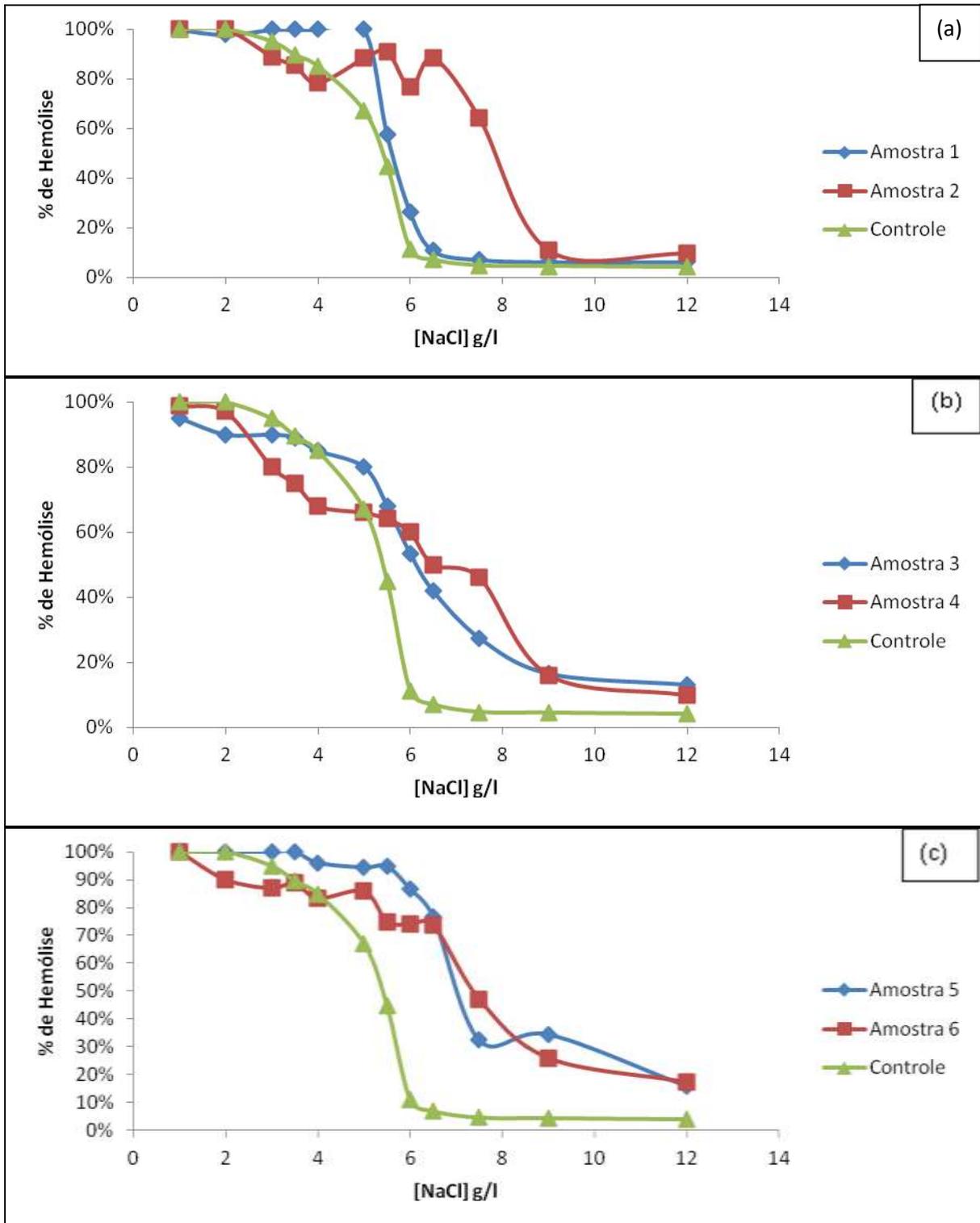


GRÁFICO 4- CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA INCUBADA (FOi) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

FONTE: A autora (2015).

NOTA: Amostras 1 e 2 (a), 3 e 4 (b), 5 e 6 (c) (Ambulatório de Hemopediatria do Hospital de Clínicas-UFPR) e amostra controle de criança saudável (Laboratório Escola de Análises Clínicas-UFPR). Porcentagens de hemólise obtidas em concentrações crescentes de cloreto de sódio, após a coleta de sangue, anticoagulação com heparina e incubação a 37°C por 24 horas.

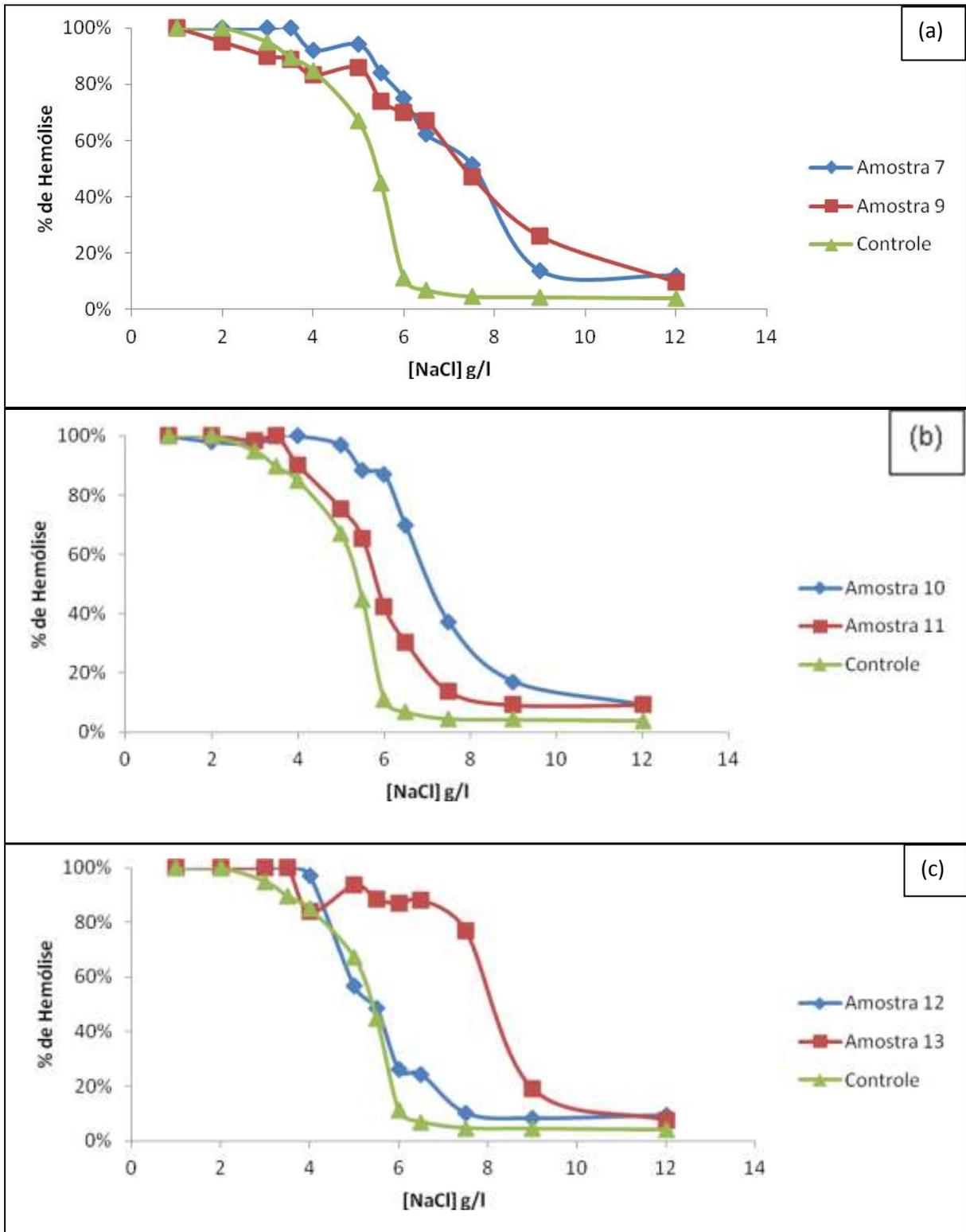


GRÁFICO 5- CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA INCUBADA (FOi) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

FONTE: A autora (2015).

NOTA: Amostras 7 e 9 (a), 10 e 11 (b), 12 e 13 (c) (Ambulatório de Hemopediatria do Hospital de Clínicas-UFPR) e amostra controle de criança saudável (Laboratório Escola de Análises Clínicas-UFPR). Porcentagens de hemólise obtidas em concentrações crescentes de cloreto de sódio, após a coleta de sangue, anticoagulação com heparina e incubação a 37°C por 24 horas.

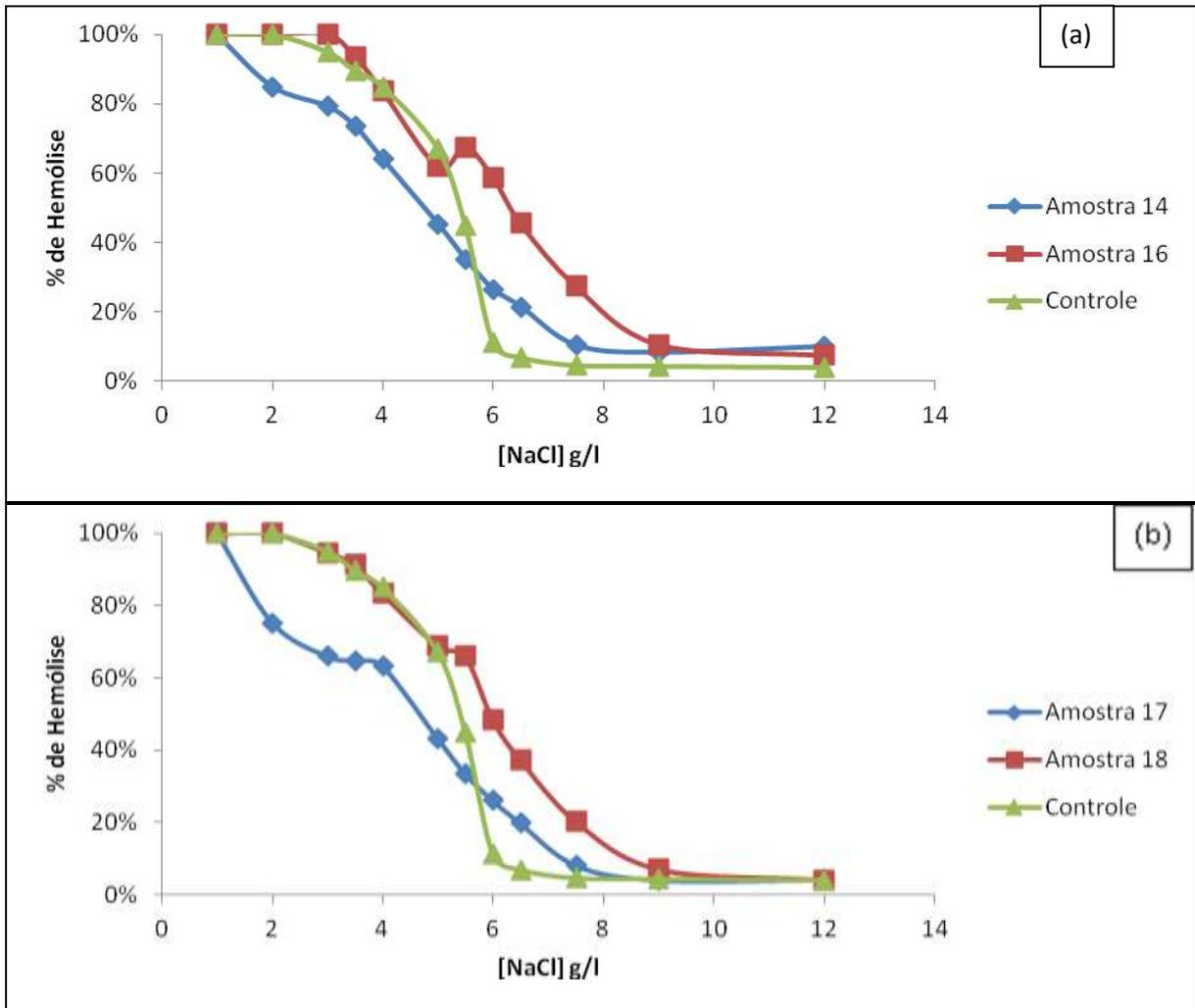


GRÁFICO 6- CURVAS DE FRAGILIDADE OSMÓTICA INCUBADA (FOi) DE ERITRÓCITOS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

FONTE: A autora (2015).

NOTA: Amostras 14 e 16 (a), 17 e 18 (b) (Ambulatório de Hemopediatria do Hospital de Clínicas-UFPR) e amostra controle de criança saudável (Laboratório Escola de Análises Clínicas-UFPR). Porcentagens de hemólise obtidas em concentrações crescentes de cloreto de sódio, após a coleta de sangue, anticoagulação com heparina e incubação a 37°C por 24 horas.

TABELA 3 – TESTE DE TEMPO DE LISE EM GLICEROL ACIDIFICADO (AGLT) DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

AMOSTRA	AGLT (SEG)
1	105
2	42
3	58
4	60
5	37
6	38
7	53
8	55
9	41
10	26
11	70
12	298
13	33
14	90
15	Nd
16	52
17	74
18	61

FONTE: A autora (2015)

NOTA: nd=não disponível; AGLT=tempo de lise em segundos após incubação em glicerol acidificado; n = 17; Valor de Referência: 25 a 150 seg característico de HS; cada resultado é média de dois experimentos independentes obtidos das amostras do grupo controle.

TABELA 4 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT E FOi DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

		FOi		
		Aumentada (% concordância)	Normal (% concordância)	Total
AGLT	Diminuído	11(73,3)	4	15
Concordância total=73,3%	Normal	0	0	0
Discordância total=26,7%	Total	11	4	15

FONTE: A autora (2015)

NOTA: AGLT=tempo de lise em glicerol acidificado; FO=fragilidade osmótica; FOi=fragilidade osmótica pós incubação 37°C por 24 horas.

TABELA 5 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO E FOi DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

		FO		
		Aumentada (% concordância)	Normal (% concordância)	Total
AGLT	Diminuído	5(33,3)	9	14
Concordância total=40%	Normal	0	1(6,7)	1
Discordância total=60%	Total	5	10	15
Foi	Aumentada	5(33,3)	5	10
Concordância total=66,6%	Normal	0	5(33,3)	5
Discordância total= 33,4%	Total	5	10	15

FONTE: A autora (2015)

NOTA: AGLT=tempo de lise em glicerol acidificado; FO=fragilidade osmótica; FOi=fragilidade osmótica pós incubação 37°C por 24 horas.

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

AMOSTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
ESFERÓCITOS (%)	12	nd	nd	18	20	10	nd	3	nd	Nd	nd	nd	nd	11	nd	Nd	16	10

FONTE: A autora (2015)

NOTA: % de esferócitos, contagem diferencial (500 a 1000 células) de formas eritrocitárias em extensão sanguínea (n=8).

TABELA 7 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS E AGLT, FO, FOi DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

	ESFERÓCITOS	
	Aumentado (% concordância)	
AGLT Concordância total=100%	Diminuído	8(100)
	Normal	0
	Total	8
FO Concordância total=25% Discordância total= 75%	Aumentada	2(25)
	Normal	6
	Total	8
Foi Concordância total=37,5% Discordância total= 62,5%	Aumentada	3(37,5)
	Normal	5
	Total	8

FONTE: A autora (2015)

NOTA:AGLT=tempo de lise em glicerol acidificado; FO=fragilidade osmótica; FOi=fragilidade osmótica pós incubação 37°C por 24 horas.

QUADRO 4 – RELAÇÃO DE BANDAS DE PROTEÍNAS DEFICIÊNTES NO SDS-PAGE EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE, DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

AMOSTRA	α - ESPEC	β -ESPEC	BANDA 3	PROTEÍNA 4.1	PROTEÍNA 4.2	BANDA 6
1	D	D	D	N	N	N
2	D	D	D	N	N	N
3	D	D	N	N	N	N
4	D	D	D	N	N	N
5	D	D	D	N	N	N
6	D	D	D	N	D	N
7	D	D	D	N	D	N
8	N	N	N	N	N	N
9	D	D	D	N	N	D
10	D	D	D	N	N	N
11	N	D	N	N	N	N
12	N	D	N	N	N	N
13	N	D	N	N	N	N
14	D	D	D	N	N	N
15	N	D	N	N	N	N
16	D	D	D	N	N	N
17	D	D	D	D	N	D
18	D	D	D	N	N	N

FONTE: A autora (2015)

NOTA: α -espec= α -espectrina; β -espec= β -espectrina; D=diminuída; N=normal

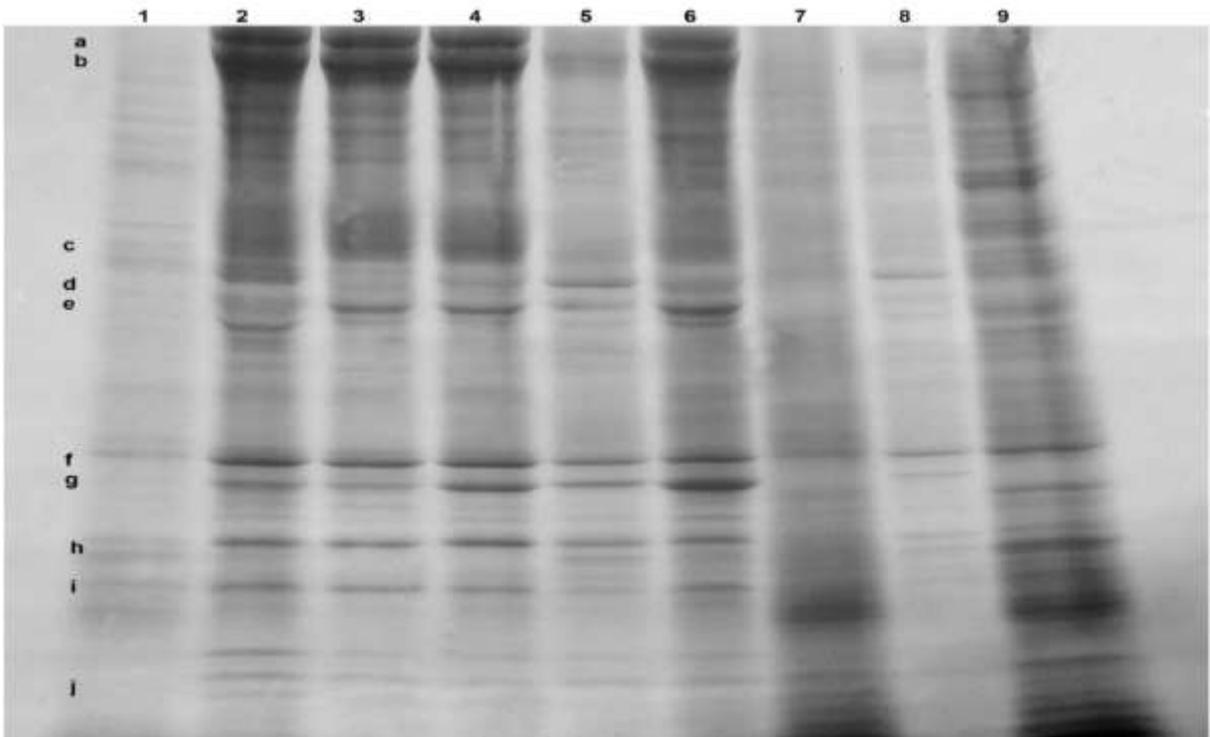


FIGURA 4 - CORRIDA ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA (SDS-PAGE) EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE DE AMOSTRAS (1 A 9) DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

FONTE: A autora (2015).

NOTA: a= α -espectrina; b= β -espectrina e anquirinas; c=banda 3; d=proteína 4.1; e=proteína 4.2; f=actina; g=gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; h= tropomiosina; i=peroxiredoxina 2; j=cadeias de globinas; 1a9=números correspondentes às amostras analisadas.

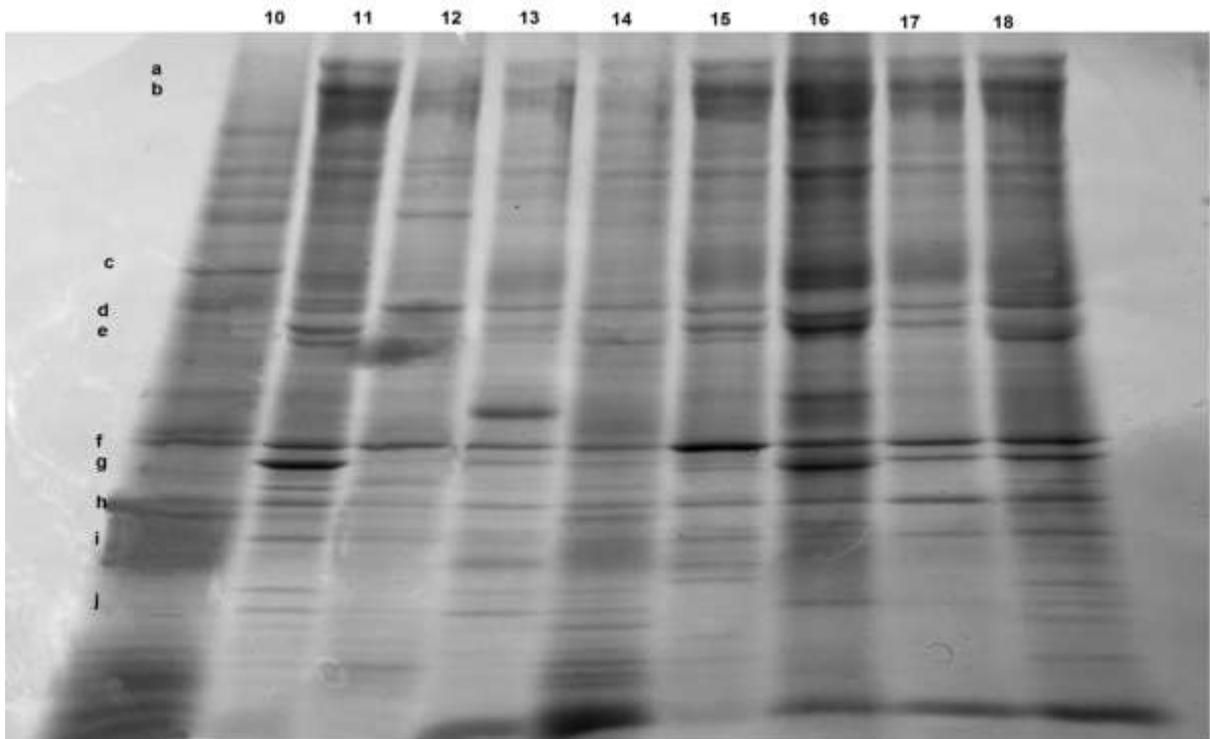


FIGURA 5 - CORRIDA ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA (SDS-PAGE) EM GRADIENTE LINEAR (5-15%), CORADO COM COMASSIE BLUE DE AMOSTRAS (10 A 18) DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

FONTE: A autora (2015).

NOTA: a= α -espectrina; b= β -espectrina e anquirinas; c=banda 3; d=proteína 4.1; e=proteína 4.2; f=actina; g=gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; h= tropomiosina; i=peroxiredoxina 2; j=cadeias de globinas; 10 a 18=números correspondentes às amostras analisadas.

TABELA 8 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO, FOi E PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS COM A BANDA DE α -ESPECTRINA NO SDS-PAGE DE CRIANÇAS COM DIGANÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNCAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

		α -Espectrina		Total
		Diminuída (% concordância)	Normal (% concordância)	
AGLT Concordância total=87,4% Discordância total=12,6%	Diminuído	13 (81,2)	2	15
	Normal	0	1 (6,2)	1
	Total	13	3	16
FO Concordância total=37,5% Discordância total= 62,5%	Aumentada	5 (31,2)	3	8
	Normal	7	1 (6,2)	8
	Total	12	4	16
Foi Concordância total=62,5% Discordância total= 37,5%	Aumentada	9 (56,2)	2	11
	Normal	4	1(6,2)	5
	Total	13	3	16
% DE ESFERÓCITOS Concordância total=100%	Aumentada	8 (100)	0	8
	Total	8	0	8

FONTE: A autora (2015)

NOTA: Dim=diminuída; SDS-PAGE=eletoforese em dodecil sulfato de sódio; AGLT=tempo de lise em glicerol acidificado; FO=fragilidade osmótica; FOi=fragilidade osmótica pós incubação 37°C por 24 horas.

TABELA 9 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO, FOi E PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS COM BANDA DE β -ESPECTRINA NO SDS-PAGE DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

		β -Espectrina		Total
		Diminuída (% concordância)	Normal (% concordância)	
AGLT Concordância total=93,8% Discordância total=6,2%	Diminuído	15 (93,8)	0	15
	Normal	1	0	1
	Total	16	0	16
FO Concordância total=37,5% Discordância total= 62,5%	Aumentada	6 (37,5)	0	6
	Normal	10	0	10
	Total	16	0	16
Foi Concordância total=68,8% Discordância total= 31,2%	Aumentada	11 (68,8)	0	11
	Normal	5	0	5
	Total	16	0	16
% DE ESFERÓCITOS Concordância total=100%	Aumentada	8 (100)	0	8

FONTE: A autora (2015)

NOTA: Dim=diminuída; SDS-PAGE=eletroforese em dodecil sulfato de sódio; AGLT=tempo de lise em glicerol acidificado; FO=fragilidade osmótica; FOi=fragilidade osmótica pós incubação 37°C por 24 horas.

TABELA 10 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DE AGLT, FO, FOi, PORCENTAGEM DE ESFERÓCITOS E PROTEÍNA DE BANDA 3 NO SDS-PAGE DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS-UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014

		BANDA 3		Total
		Diminuída (% concordância)	Normal (% concordância)	
AGLT Concordância total=81,2% Discordância total=18,8%	Diminuído	12 (75)	3	15
	Normal	0	1(6,2)	1
	Total	12	4	16
FO Concordância total=32,5% Discordância total= 67,5%	Aumentada	4 (25)	2	6
	Normal	8	2 (12,5)	10
	Total	12	4	16
FOi Concordância total=56,2% Discordância total=43,8%	Aumentada	8 (50)	3	13
	Normal	4	1(6,25)	3
	Total	12	4	16
% DE ESFERÓCITOS Concordância total=100%	Aumentada	8 (100)	0	8

FONTE: A autora (2015)

NOTA: Dim=diminuída; SDS-PAGE=eletroforese em dodecil sulfato de sódio; AGLT=tempo de lise em glicerol acidificado; FO=fragilidade osmótica; FOi=fragilidade osmótica pós incubação 37°C por 24 horas.

TABELA 11 – SENSIBILIDADE DOS TESTES DE FO, FOi, AGLT, % DE ESFERÓCITOS E GEL DE SDS-PAGE REALIZADOS EM CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

	FO (n=16)	FOi (n=16)	AGLT (n=17)	% DE ESFERÓCITOS (n=8)	SDS-PAGE
Sensibilidade(%)	37,5	68,8	94	100	100%

FONTE: A autora (2015)

NOTA: FO=fragilidade osmótica imediata; FOi=fragilidade osmótica pós-incubação 37° C por 24h; AGLT=tempo de lise em glicerol acidificado; SDS-PAGE=eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio.

5.3 EXAMES DE ACOMPANHAMENTO PÓS DIAGNÓSTICO

A TABELA 12 apresenta informações referentes a dados dos pacientes no momento da coleta de sangue para a realização dos testes de FO, FOi, AGLT e SDS-PAGE. A porcentagem de reticulócitos (n=12), mostra dois casos (amostra 12) com resultado dentro da faixa de referência, a concentração de Hb (n=13) demonstra 6 casos com ausência de anemia (amostras 3, 6, 9, 12, 17 e 18) e a metahemoglobina (n=13) demonstra ausência de estresse oxidativo em todas as amostras.

A TABELA 13 expressa valores de bilirrubina direta, indireta e total das amostras (n=13) analisadas, onde 1 caso (amostra 14) apresentou valor acima da faixa de referência.

A TABELA 14 apresenta a análise comparativa entre os valores de Hb e % de reticulócitos, evidenciando 6 casos com ausência de anemia e que apresentaram altas % de reticulócitos no sangue periférico.

A TABELA 15 apresenta a análise comparativa entre valores de Hb e % de esferócitos, sendo que em 4 casos de anemia leve houve presença de esferócitos.

A TABELA 16 apresenta a análise comparativa dos resultados de Hb e bilirrubina total

A TABELA 17 apresenta a análise comparativa dos resultados de FO, FOi, AGLT e metaHb, com maior concordância entre FO e metaHb (68,8%) e a maior discordância entre AGLT e metaHb (62,6%).

TABELA 12 – PORCENTAGENS DE RETICULÓCITOS, CONCENTRAÇÕES DE HB E DE METAHEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

AMOSTRA	RETICULÓCITOS (%)	HB (g/dl)	METAHEMOGLOBINA (%)
1	3,49	9,3	2,48
2	nd	Nd	2,24
3	10,53	11,7	2,76
4	10,54	7,3	2,18
5	12,4	9	2,85
6	12,05	10,6	1,97
7	10,9	10,2	2,45
8	nd	Nd	nd
9	4,12	13	2,95
10	nd	Nd	nd
11	nd	Nd	nd
12	0,6	12,2	3,48
13	8,33	8,6	2,16
14	nd	Nd	2,19
15	17,48	7,7	2,45
16	6,39	11,5	2,87
17	6,89	11,2	nd
18	10,32	11,3	nd

FONTE: A autora (2015)

NOTA: nd=não disponível; % de reticulócitos no HC-UFPR (n=12); concentração de hemoglobina no HC-UFPR (n=13); % de meta hemoglobina, método de Naoum et al. (2004) (n=13).

TABELA 13 – DOSAGEM DE BILIRRUBINA DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

AMOSTRA	BILIRRUBINA DIRETA	BILIRRUBINA INDIRETA	BILIRRUBINA TOTAL
1	0,3	0,53	0,83
2	nd	nd	Nd
3	0,98	1,74	2,72
4	1,19	3,4	4,59
5	nd	nd	Nd
6	0,85	6,04	6,13
7	0,72	3,58	4,3
8	nd	nd	Nd
9	1,15	0,68	1,83
10	0,89	7,36	8,25
11	0,85	1,28	2,13
12	nd	nd	Nd
13	0,8	1,16	1,96
14	0,34	3,19	3,53
15	0,77	11,91	12,68
16	1,06	0,81	1,87
17	nd	nd	Nd
18	0,89	2,39	3,28

FONTE: A autora (2015)

NOTA: nd=não disponível; cada resultado é média de dois experimentos independentes; Valores de Referência: bilirrubina total=1,2 bilirrubina direta=0,4 e bilirrubina indireta=0,8 mg/dl; n=13.

TABELA 14 - ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE Hb RELACIONADA A GRAUS LEVE, MODERADO OU ACENTUADO DE ANEMIA E % DE RETICULÓCITOS NORMAIS, COM ELEVAÇÃO MODERADA OU ACENTUADA EM AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

		Hb (g/l)			
		superior a 11	8 a 11	6 a 8	Total
Reticulócitos (%)	0 a 4	1	1	0	2
	4 a 10	3	1	0	4
	superior a 10	2	3	2	7
	Total	6	5	2	13

FONTE: A autora (2015)

NOTA: Concentração de Hb: superior a 11 g/l (ausência ou grau leve de anemia), 8 a 11 g/l (grau moderado de anemia), 6 a 8 g/l (grau acentuado de anemia); reticulócitos: até 4% (dentro ou próximo dos valores de referência), 4 a 10% (elevação moderada), superior a 10% (elevação acentuada), n=13.

TABELA 15 - ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE Hb RELACIONADA A GRAUS LEVE, MODERADO OU ACENTUADO DE ANEMIA E DE % DE ESFERÓCITOS DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

	Hb (g/l)		
	Superior a 11	8 a 11	6 a 8
Esferócitos (%)	2	4	1

FONTE: A autora (2015)

NOTA: Concentração de Hb: superior a 11 g/l (ausência ou grau leve de anemia), 8 a 11 g/l (grau moderado de anemia), 6 a 8 g/l (grau acentuado de anemia).

TABELA 16 - ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DE Hb E BILIRRUBINA DE AMOSTRAS DE CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA, DE ACORDO COM NÍVEIS NORMAL, AUMENTADO OU DIMINUÍDO, HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, ABRIL A OUTUBRO/2014.

		Hb (g/l)			
		superior a 11	8 a 11	6 a 8	Total
Bilirrubina total (mg/dl)	0 a 1,2	0	2	0	2
	superior a 10	4	2	2	8
	Total	4	4	2	10

FONTE: A autora (2015)

NOTA: Concentração de Hb: superior a 11 g/l (ausência ou grau leve de anemia), 8 a 11 g/l (grau moderado de anemia), 6 a 8 g/l (grau acentuado de anemia); Valores de Referência: bilirrubina total=1,2 bilirrubina direta=0,4 e bilirrubina indireta=0,8 mg/dl; n=10

6. DISCUSSÃO

6.1 DADOS RETROSPECTIVOS

Hospitais Universitários públicos regionais que oferecem atendimento de alta complexidade, como o HC-UFPR, fornecem ampla assistência à população brasileira. Devido ao grande número de pessoas atendidas, estes hospitais concentram maior número de casos de HS, apesar da doença apresentar baixa incidência. Por ser um hospital de alto nível e cujo atendimento é considerado de referência, é de extrema importância o emprego de exames específicos que possibilitem diagnósticos confiáveis, em algumas situações com urgência.

Porém, para o diagnóstico de HS, o Serviço de Análises Clínicas do HC-UFPR, até a realização deste trabalho contava apenas com os exames hematemétricos de rotina para triagem de doenças hemolíticas e com as análises de FO e FOi, que são úteis, mas apresentam sensibilidade limitada, além de serem críticos por sofrerem alterações de fragilidade a partir de pequenas oscilações de pH e temperatura (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

Por terem acompanhamento clínico apenas no HC-UFPR, os pacientes recrutados para esta pesquisa tiveram, portanto, diagnóstico presuntivo de HS sem a realização de testes moleculares para detectar o defeito de membrana em cada caso e assim confirmar bioquimicamente a doença. Houve aumento de FO ou FOi, característico de HS, nas análises iniciais de investigação da maioria dos pacientes em estudo, porém, o mesmo pode estar associado a outras doenças que não HS, tendo em vista que estes dois testes podem apresentar resultados elevados também em algumas outras condições clínicas. Por outro lado, em alguns casos, FO e FOi apresentaram resultados dentro da faixa de referência, o que não exclui a possibilidade de diagnóstico de HS (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD, 2004). Nesses casos, foi feito o diagnóstico clínico, a partir da exclusão de outras doenças de maior incidência. Casos nos quais a HS é assintomática são considerados como fator agravante para o subdiagnóstico da doença. Tendo em vista o relato de grande número de casos sem sintomas, acredita-se que a real prevalência de HS seja superior à descrita na literatura (LEE, BITHELL & FOERSTER et al., 2009).

Por não haver cura para HS, estratégias para diminuir os sintomas, quando presentes, ou impedir o agravamento do quadro anêmico, se fazem necessárias. Uma delas é a suplementação com ácido fólico, rotineiramente prescrito para indivíduos com anemia crônica (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD, 2004). Nos pacientes estudados neste trabalho, a suplementação com ácido fólico, 5 mg/dia, iniciou-se a partir dos primeiros atendimentos. Esta suplementação se relaciona ao relato de 11 casos de anemia megaloblástica por deficiência de ácido fólico, associados à HS (LINDENBAUM & KLIPSTEIN, 1963) e foi sugerida por ROSENBLATT & HOFFBRANS (1999) como rotina, com o objetivo de prevenir a instalação de anemia megaloblástica, que agrava ainda mais o quadro hemolítico. Para tanto, várias concentrações de ácido fólico são sugeridas como, por exemplo 1 mg/dia e 100 µg/kg/dia (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD, 2004).

Outra forma de controle da doença é a esplenectomia, que é efetiva na redução de hemólise, aumentando o tempo de vida dos eritrócitos e diminuindo as complicações clínicas. A escolha da esplenectomia é realizada com base nos sintomas clínicos da HS, sendo requerida ainda na infância apenas nos casos de maior gravidade da doença. Após a esplenectomia, não se faz mais necessário o acompanhamento trimestral do paciente, que passa a ser anual (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD, 2004). Todos os pacientes com diagnóstico presuntivo de HS, participantes deste trabalho, não realizaram esplenectomia até a realização dos ensaios descritos.

Em 70 a 75% dos casos de HS, tem sido relatado histórico familiar da doença (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD *et al.*, 2004; MARIANI, BARCELLINI & VERCELLATI *et al.*, 2008; CRISP, SOLARI & VOTA, *et al.* 2011). Neste trabalho, observou-se histórico familiar de HS em 22% dos casos. No entanto, além de ser uma casuística pequena, outros fatores como, por exemplo, a ocorrência de casos na forma assintomática e o fato de que o diagnóstico dos membros da família foi presuntivo, ou mesmo a indisponibilidade de mais recursos para o diagnóstico, podem ter contribuído para a discrepância entre os dados encontrados neste trabalho e os relatos da literatura.

6.2 EXAMES UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO

Os resultados de análises quali e quantitativas são considerados ferramentas de extrema importância para a avaliação da gestão do desempenho do laboratório em relação aos seus processos analíticos. Durante a realização dos ensaios laboratoriais, buscou-se manter a reprodutibilidade e confiança nos resultados. Para tanto, todas as técnicas utilizadas neste trabalho foram realizadas seguindo-se recomendações preconizadas por LEWIS, BAIN & BATES (2006), bem como pelo Comitê Britânico de Padronização em Hematologia (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD *et al.*, 2004)

A partir dos resultados obtidos, procurou-se identificar qual o método ou associação de métodos apresentariam maior contribuição para o diagnóstico de HS e, para tanto, foram realizados ensaios de FO, FOi, AGLT e SDS-PAGE.

Em 37,5% dos casos com diagnóstico presuntivo de HS, os resultados obtidos na FO foram superiores à faixa de referência estabelecida ou seja, indicativos de HS. Outros autores têm encontrado FO aumentada em aproximadamente 65% dos casos de HS (MARIANI, BARCELLINI & VERCELLATI *et al.* 2008; BIANCHI, FERMOS & VERCELLATI, *et al.* 2011; KING & ZANELLA, 2013).

É importante salientar que o teste de FO pode ser afetado também por variáveis físicas como por exemplo, pH final do sangue em suspensão e temperatura em que se realiza o teste. Parpart *et al.* (1947) relataram que a alteração de pH é um ponto crítico a ser analisado, pois a variação de 0,1 unidade é suficiente para causar alterações significativas, aumentando a fragilidade com a redução do valor de pH. A relação com a temperatura é importante, pois o aumento de 5 °C pode elevar em 0,1 g/l a concentração de salina em que ocorre hemólise (LEWIS, BAIN & BATES, 2006). Fatores de ordem biológica podem sugerir alterações nos resultados, uma vez que a curva de FO pode ser afetada por altas concentrações de reticulócitos, promovendo aumento de até 66% na fragilidade em amostras de pacientes não-esplenectomizados (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD *et al.*, 2004).

Neste estudo, foi possível avaliar a FO e compará-la com a FOi, sendo que esta última vem sendo, até o momento, recomendada como método padrão para diagnóstico de HS em pacientes com teste de Coombs negativo, ou seja, após exclusão do diagnóstico de anemia imuno-hemolítica (PERROTA, GALLAGHER & MOHANDAS, 2008; NATHAN, ORKIN, GINSBURG *et al.*, 2009)

A FOi apresentou 68,8% de resultados superiores à faixa de referência estabelecida pelo método. Os resultados obtidos mostraram maior sensibilidade em detectar casos com diagnóstico presuntivo de HS em relação ao método de FO (TABELA 4). Esses resultados foram concordantes com os obtidos em estudos realizados por diversos autores, inclusive quanto à relação com os resultados de FO (BARCELLINI & VERCELLATI *et al.*, 2008; BIANCHI, FERMOS & VERCELLATI, 2011; MARIANI, KING & ZANELLA, 2013).

A partir dos resultados encontrados para estes dois testes sugere-se, assim, maior sensibilidade, em relação ao diagnóstico presuntivo, de FOi em relação ao método de FO, na detecção de casos de HS. Esta observação está relacionada à própria incubação, uma vez que, mantendo a amostra por 24 horas a 37°C, há tumefação do eritrócito por acúmulo de sódio no interior da célula, excedente à perda de potássio. Este acúmulo ocorre porque a incubação consome a energia metabólica necessária para promover o bombeamento ativo contra gradiente de concentração, tornando o esferócito, assim, mais susceptível à lise eritrócitaria. Tal efeito parece ser menos importante sobre a fragilidade do eritrócito normal (LEWIS, BAIN & BATES, 2006).

Foram realizadas análises de concordância (TABELA 5) entre FO e FOi e observou-se que, com o emprego dos dois testes associados houve detecção de 86,7% dos casos presuntivamente positivos de HS, o que pode representar um ganho na sensibilidade em relação ao uso de cada teste isoladamente.

Dando continuidade aos experimentos, foram testadas outras metodologias para avaliar o diagnóstico de HS, dentre elas o método AGLT, modificado a partir do teste de tempo de lise em glicerol (GLT), pela acidificação da solução tamponada. O AGLT se apresenta significativamente reduzido em eritrócitos de pacientes com HS em relação aos eritrócitos normais, com aumento de sensibilidade em relação ao GLT. Por outro lado, há diminuição da especificidade. O AGLT apresenta resultados

reduzidos não apenas na HS, mas também em gestantes e em casos de insuficiência renal crônica, leucemias crônicas e anemia hemolítica autoimune. Porém, como é sugerido que o AGLT seja realizado após a exclusão de doenças de maior incidência, esta diminuição de especificidade não caracteriza um grande impacto sobre a avaliação do resultado (LEWIS, BAIN & BATES, 2006). Entretanto, a utilização do AGLT tem sido útil, inclusive, nos casos não detectados bioquimicamente (BIANCHI, FERMO, VERCELATTI *et al.*, 2011).

No ensaio realizado neste trabalho, o AGLT apresentou 94% de sensibilidade em relação ao diagnóstico presuntivo de HS. Estes dados são concordantes com os obtidos por outros autores (MARIANI, BARCELLINI, VERCELLATTI *et al.*, 2008; BIANCHI, FERMO, VERCELATTI *et al.*, 2011;), mas foram superiores aos encontrados por CYNOBER *et al.* (1996).

A partir das análises comparativas realizadas entre FO/FOi e AGLT, obteve-se uma maior concordância de resultados com FOi, que apresentou 75%. Quando associados, estes dois testes aumentaram para 93,5% a sensibilidade em relação ao diagnóstico presuntivo. Valor semelhante, em torno de 99%, foi encontrado por MARIANI *et al.* (2008), com essa associação. Nas análises entre AGLT e FO não houve relações estatísticas significantes entre os dados.

O eritrócito normal apresenta a forma de disco bicôncavo, que confere resistência à tensão e elevada deformabilidade, mantendo uma grande área de superfície, necessária para a troca de gases. Defeitos na membrana podem causar alterações na forma do eritrócito levando a conformações anormais, como esferócitos, equinócitos, estomatócitos e eliptócitos (MOHANDAS & GALLAGHER, 2008).

Para a realização deste trabalho optou-se por realizar a contagem diferencial das formas eritrocitárias em extensões sanguíneas, coradas por May-Grunwald Giemsa, com base nos critérios morfológicos estabelecidos por Bessis (1972) (MATERIAL E MÉTODOS, item 4.2.1.4), por ser um método simples, confiável, e que apresenta graus aceitáveis de exatidão e precisão para quantificar os esferócitos presentes nas amostras.

A partir de nossos resultados, pode-se perceber que a porcentagem de esferócitos foi muito variável, de 3 a 20%, porém, esteve presente em todas as amostras, atingindo portanto, sensibilidade de 100%, em comparação ao diagnóstico presuntivo. Na análise comparativa com FO, FOi, AGLT e bandas reduzidas de SDS-PAGE, a maior concordância de resultados foi com AGLT, apresentando um valor de 87,5%.

A alteração responsável pelo aparecimento dos esferócitos envolve anormalidades nas chamadas interações verticais entre as proteínas da membrana eritrocitária, que inclui as ligações das espectrinas, da anquirina e da proteína 4.2 com a banda 3 (MOHANDAS & GALLAGHER, 2008).

Quando comparamos a presença de esferócitos (n=8) com os defeitos de membrana, os esferócitos foram encontrados nas amostras de todos os pacientes nos quais se observou redução de espectrinas ou banda 3 na membrana eritrocitária em SDS-PAGE. Estes dados indicam uma possível relação entre formação de esferócitos e a deficiência destas duas proteínas, como anteriormente descrito por BESSIS (1972), que explica que as deficiências de proteínas de membrana podem alterar a morfologia eritrocitária.

As proteínas de membrana eritrocitária podem ser estudadas em SDS-PAGE, através do método de LAEMMLI (1970), com concentração fixa de acrilamida, ou pelo método de FAIRBANKS (1971), que utiliza gradiente de concentração de acrilamida. Esta última é mais útil por separar de forma mais adequada bandas protéicas de massa molecular superior a 100 kDa, como as espectrinas e anquirinas.

Portanto, para este estudo foi utilizado o método de FAIRBANKS (1971), o que permitiu sugerir 13 casos de redução de α -espectrina, 17 de β -espectrina, 12 de banda 3, 1 de banda de proteína 4.1 e 2 de proteína 4.2, (QUADRO 4), frente a estes dados, e a partir da exclusão da amostra 8, sugere-se uma sensibilidade de 100% para SDS-PAGE em relação ao diagnóstico presuntivo de HS. Dentre as amostras analisadas por SDS-PAGE, a amostra 8 apresentou perfil eletroforético normal. Isto pode ser justificado pelo fato de que o paciente doador desta amostra recebeu seguidas transfusões sanguíneas em curto prazo de tempo antes da coleta de sangue. Por este motivo os resultados obtidos com esta amostra, para todos os ensaios realizados neste trabalho, não foram analisados.

Os dados obtidos por SDS-PAGE corroboram os de outros autores, que apontaram as deficiências de espectrinas e de banda 3 como os defeitos mais comuns em HS (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD *et al.*, 2004; DELAUNAY, 2007; MARIANI, BARCELLINI & VERCELLATI *et al.*, 2008; BARCELLINI, BIANCHI, FERMO *et al.*, 2011,). As reduções de proteína 4.1 e 4.2 também estão de acordo com resultados obtidos previamente, que apontam a deficiência destas proteínas em HS, porém com menor incidência (MARIANI, BARCELLINI & VERCELLATI *et al.*, 2008).

Deficiências de anquirina podem não ter sido detectadas devido aos elevados níveis de reticulócitos apresentados pelos pacientes nas amostras de sangue estudadas, ou mesmo por problemas técnicos, já que as concentrações normais de anquirina são relativamente baixas.

Na análise comparativa dos resultados obtidos no SDS-PAGE com FO, FOi e AGLT, pode-se perceber que diminuições de β -espectrina, α -espectrina e banda 3 no SDS-PAGE foram observadas com maior frequência nos casos em que houve diminuição no tempo de AGLT (TABELAS 8, 9 e 10). Este fato pode estar associado a maior sensibilidade do AGLT em relação ao diagnóstico clínico de HS apresentada neste trabalho e por outros autores (BOLTON-MAGGS, STEVENS & DODD *et al.*, 2004; DELAUNAY, 2007; BARCELLINI, BIANCHI, FERMO *et al.*, 2011; MARIANI, BARCELLINI & VERCELLATI *et al.*, 2008).

Além dos ensaios realizados neste trabalho, é importante salientar a utilização do EMA, que parece, até o momento, ser a técnica mais adequada por aliar alta sensibilidade e especificidade. Estudos realizados a partir desta técnica obtiveram resultados de 92,7% de sensibilidade e 99,1% de especificidade (KING, BEHRENS, ROGERS, *et al.* 2000). Ainda mais, relata-se que a associação de EMA e AGLT pode possibilitar a identificação de 100% dos casos de HS (MARIANI, BARCELLINI & VERCELLATI *et al.*, 2008). O inconveniente desta técnica está na utilização de equipamentos de custo elevado frente à relativamente baixa incidência da doença e consequente necessidade de uso. Uma forma de contornar esta situação seria a utilização do equipamento em conjunto com outros setores do laboratório.

Discrepâncias entre os resultados dos ensaios e os dados relatados em literatura poderiam estar associados à baixa casuística obtida para este trabalho, devido ao número reduzido de pacientes com HS atendidos no HC-UFPR.

6.3 ACOMPANHAMENTO PÓS DIAGNÓSTICO

Após o diagnóstico de HS, faz-se necessário o acompanhamento clínico e laboratorial do paciente para introduzir, quando necessário, medidas paliativas, no intuito de reduzir a gravidade dos sinais e sintomas apresentados. Para tanto, exames que monitorem a hemólise, como bilirrubina e % de reticulócitos e que detectem a presença de anemia, como a concentração de Hb, são solicitados.

Com o objetivo de verificar o quadro apresentado pelos pacientes no momento da coleta da amostra de sangue, os resultados dos testes rotineiros realizados no Serviço de Análises Clínicas do HC-UFPR foram avaliados. Na análise comparativa entre os diferentes graus de anemia, de acordo com a concentração de Hb, e a % de reticulócitos, observou-se que, em 3 casos com ausência de anemia, o número de reticulócitos também estava na faixa de normalidade. Por outro lado, em 5 casos com ausência de anemia, detectou-se mais de 4% de esferócitos, e destes em 4, elevação na concentração de bilirrubina não-conjugada. Na análise de comparação dos resultados, observou-se ainda que em 4 casos com níveis de Hb entre 8 e 11 g/l, havia elevação na % de esferócitos na concentração de reticulócitos. Porém no estudo da correlação entre grau de anemia e contagem de reticulócitos não houvesse encontrou relações estatisticamente significantes entre os dados.

Estes dados estão de acordo com a literatura, na qual se descreve, como característicos de HS, aumento da hemólise devido à presença de esferócitos, resultando em diminuição nos níveis de Hb e consequente tentativa de compensação de hemólise promovida pela medula óssea, com liberação de células jovens, como os reticulócitos, para o sangue periférico (NATHAN, ORKIN, GINSBURG *et al.*, 2009; LEE, BITHELL & FOERSTER *et al.*, 2009). Na maioria dos pacientes estudados, apesar da exacerbação do processo hemolítico, verificou-se

que o quadro clínico era compensado ou com anemia leve a moderada, devido à alta atividade da medula óssea.

Apenas dois casos de % de reticulócitos dentro da faixa de referência foram identificados. O primeiro corresponde a um paciente cuja SDS-PAGE apresentava redução de espectrinas e de banda 3; e o segundo, de espectrinas apenas. Aumento na contagem de reticulócitos em casos de HS também foi detectado por MARIANI *et. al.* (2008), que relatou valores acima da faixa de referência para casos de pacientes não esplenectomizados, associados à deficiência de banda 3 e de espectrinas. Os mesmos autores relatam também, casos de pacientes de HS esplenectomizados, com defeitos na produção de espectrina e com aumento na contagem de reticulócitos.

Um dos fatores que podem estar associados ao agravamento do quadro hemolítico em pacientes com HS é o processo de estresse oxidativo que se dá pelo desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes (BENDOVA, MACHOVA, HASKOVA *et. al.* 2010).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e a produção de radicais livres e outras espécies reativas é parte do metabolismo humano, sendo observada em condições fisiológicas, como nos sinais de transdução. No entanto, quando ocorre desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes, há efeitos prejudiciais à membrana que podem levar à lise eritrocitária e agravar o quadro de hemólise de pacientes com HS (VASCONCELOS, 2007).

Danos ocasionados aos eritrócitos decorridos do estresse oxidativo podem levar à lise, liberando Hb com conseqüente formação de metaHb (TELEN & KAUFMAN, 2004). A metaHb aumenta a produção de ERO no interior do eritrócito, ocasionando mais estresse oxidativo na célula, tornando o eritrócito mais vulnerável à lise e iniciando um novo ciclo, que amplifica o processo hemolítico. Ou seja, a metaHb age como um amplificador de formação de ERO, importante para desenvolvimento do processo de hemólise (BALAJI, TRIVEDI, 2012)

Para avaliar o grau de estresse oxidativo das amostras dos pacientes, participantes deste trabalho, realizou-se a determinação da concentração de metaHb que como exame de acompanhamento, pode auxiliar na detecção de casos de

hemólise ocorridas pelo estresse oxidativo, que pode ser minimizado, impedindo o agravamento do quadro em pacientes com HS.

A partir da dosagem de MetaHb em eritrócitos dos pacientes estudados, não se encontrou evidências de estresse oxidativo, que seriam evidenciados por valores de metaHb acima da faixa de referência.

Ghoti et al. (2010) observaram, entretanto, a presença de estresse oxidativo em eritrócitos de pacientes com HS, além de redução nos marcadores de estresse oxidativo após a suplementação com agentes antioxidantes. A ausência de estresse oxidativo nos eritrócitos dos pacientes estudados poderia ser explicada pela suplementação com concentrações elevadas de ácido fólico recebida pelos mesmos, que pode agir como antioxidante.

6.4 PERSPECTIVAS SOBRE O APERFEIÇOAMENTO DO DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES COM HS.

A partir da avaliação do melhor método para diagnóstico de HS, associada a indicações da literatura científica, pode-se sugerir, portanto que hospitais de referência, como HC-UFPR, que realizam apenas FO e FOi como testes para o diagnóstico de HS, incluam em sua rotina a realização do ensaio de EMA, por ser o exame que isoladamente, apresenta maior sensibilidade e especificidade. Uma segunda sugestão, alternativa à primeira, seria a incorporação da análise de AGLT associada a FOi, que, a partir dos resultados obtidos neste trabalho e em outros, parece ser a associação que poderia detectar maior número de casos de HS, além de ser mais econômica e acessível que o EMA.

Em casos inconclusivos, nos quais AGLT, FOi ou EMA não sejam suficientes para o diagnóstico e que a suspeita de HS persista, a detecção do possível defeito de membrana eritrocitária, feita pela análise das bandas de proteínas de membrana eritrocitária em gel de SDS-PAGE, seria a melhor alternativa apresentada até o momento. Apesar de não exigir uma instrumentação tão sofisticada, esta técnica não é sugerida para o diagnóstico de todos os casos suspeitos de HS por ser uma metodologia laboriosa e de difícil inserção na rotina laboratorial.

Após o diagnóstico, para o acompanhamento do paciente, com o objetivo de impedir o agravamento do quadro de hemólise e seus danos consequentes, considerando também, a ausência de tratamento específico para a doença, sugerimos, além do acompanhamento hematimétrico, a avaliação do estresse oxidativo dos eritrócitos dos pacientes com HS, a partir da realização de exames como metaHb, tendo em vista que o estresse oxidativo pode se apresentar como um fator de agravamento de sinais e sintomas como já relatado por outros autores (Ghoti, FIBACH & DANA et al. 2011).

7. CONCLUSÕES

No estudo sobre exames laboratoriais para diagnóstico e acompanhamento de 18 pacientes com diagnóstico presuntivo de HS, atendidos no HC-UFPR, de abril a novembro de 2014, concluiu-se que:

- a) O teste de FO apresentou sensibilidade de 37,5%, com relação ao diagnóstico presuntivo de HS;
- b) O teste de FOi apresentou sensibilidade de 68,8%, com relação ao diagnóstico presuntivo de HS;
- c) O AGLT apresentou sensibilidade de 94%, com relação ao diagnóstico presuntivo de HS;
- d) No gel de SDS-PAGE, observou-se diminuição de bandas de α e β -espectrinas, banda 3, proteína 4.1 e proteína 4.2, de forma isolada ou conjunta, com exceção de um caso, cujo paciente havia recebido transfusão sanguínea recente;
- e) Observou-se 3 a 20% de esferócitos no sangue periférico dos pacientes analisados (n=8);
- f) A associação de AGLT e FOi identificou 100% dos casos diagnosticados presuntivamente como HS;
- g) Não se observou aumento nas concentrações de metahb em eritrocitos dos pacientes estudados.

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se sugerir que a associação de AGLT e FOi podem representar a escolha mais confiável, por detectar maior número de casos com diagnóstico presuntivo de HS além de apresentar um custo acessível. De acordo com a literatura a utilização do EMA pode ser a opção mais confiável para o diagnóstico de Hs. Esta sugestão, entretanto, não substitui o emprego de SDS-PAGE, que detecta especificamente as proteínas reduzidas ou ausentes da membrana eritrocitária nos casos de HS. Tais determinações são reconhecidas na literatura científica e disponíveis a serem utilizadas, alternativamente, em centros especializados em diagnóstico de doenças hemolíticas.

Além disto, a utilização de ácido fólico aliada a concentrações normais de metahb nos eritrócitos dos pacientes estudados sugerem uma compensação do estresse oxidativo pelo ácido fólico em pacientes com HS. Desta forma, a inserção de exames para a detecção do processo oxidativo na rotina de acompanhamento dos pacientes com HS e a inserção de suplementação com agentes antioxidantes quando necessário, pode ser uma forma de diminuir o processo de hemólise.

REFERÊNCIAS

ANONG, W. A.; FRANCO, T.; CHU, H.; WEIS, T. H.; DEVLIN, E.E.; BODINE, D. M.; AN, X.; MOHANDAS, N.; LOW, P.S. Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. **American Society of Hematology**, Washington, v. 27; n. 114, p. 1904–1912, 2009.

AUFFRAY, I.; MARTAFIA, S.; JONG, L.; LEE, G.; HUANG, C.; PASZTYET, C.; et al. Glycophorin A dimerization and band 3 interaction during erythroid membrane biogenesis: in vivo studies in human glycophorin A transgenic mice. **Blood**, Bristol, v.97; n. 9, p. 2872-8, 2001.

BAIN, B. J. **Blood cells, a practical guide**. 2.ed. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1995, p.504,.

BAINES, A. J. The spectrin-ankyrin-4.1-adducin membrane skeleton: adapting eukaryotic cells to the demands of animal life. **Protoplasma**, Canterbury, v.244; p. 99-131, 2010.

BALAJI, S.N.; TRIVEDI, V. Extracellular Methemoglobin mediated Early ROS Spike Triggers Osmotic Fragility an RBC Destruction: An Insight into the Enhanced Hemolysis During Malaria. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.27, n.2, p.178-185, 2012.

BARCELLINI, W.; BIANCHI, P; FERMO, E.; IMPERIALI, F.G; MARCELLO, A.P.; VERCELLATI, C.; ZANINONI, A.; ZANELLA, A. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects; **Blood Transfusion**, Milano, v.9 n.3, p. 274-277.

BENDOVA, P.; MACKOVA, E.; HASKOVA, P.; VAVROVA, A.; JIRKOVSKY, E.; STERBA, M.; POPELOVA, O.; KALINOWSKI, D.S.; KOVARIKOVA, P.; VAVRONA, K.; RICHARDSON, D. R.; SIMUNEK, T. Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidate stress-induced cellular injury. **Chemical Research in Toxicology**, v.23, p.1105-1114, 2010.

BENNET, V.; STENBUCK, P.J. Association between ankyrin and de cytoplasmic domain od band 3 isolate from the human erythrocyte membrane. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v.255, p.6424-6432, 1979.

BESSIS, M. Red cell shapes: an illustrated classification and is rationale. **Nouv. Revue Française Hématologie**, v.12, p.721, 1972.

BEUTLER, E. How do red cell enzymes age? A nem perspective. **British Journal Haematology**, Oxford, v.61, p.377-384, 1985.

BEUTLER E.; Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and other red cell enzyme abnormalities. **Hematology**. New York, 6 ed, p. 527-539, 2001.

BIANCHI, P.; FERMO, E.; VERCELLATI, C.; MARCELLO, A.P.; PORRETTI.; CORTELEZZI, A.; BARCELLINI, W.; ZANELLA, A. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study on 150 patients grouped according to the molecular and clinical characteristics. **Haematologica**, Milano, v. 97, n. 4, p. 516-523, 2012.

BOLTON-MAGGS, P.H.B.; STEVENS, R.F.; DODD, N.J.; LAMONT, G.; TITTENSOR, P.; KING, M.J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. **British Journal Haematology**, v.126, n. 4, p.455-474, 2004.

BRADFORD, M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, **Analitical Biochemistry**, Georgia, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUCE, J. L.; GUIZOUARN, H.; BURTON, N.M.; GABILLAT, N.; POOLE, J.; FLATT, J.F.; BRADY, R.L.; BORGESSE, F.; DELAUNAY, J.; STEWART, G. W. The monovalent cation leak in over-hydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh associated glycoprotein (RhAG) **American Society of Hematology**, Washington, v. 113, n. 6, p. 1350-1357, 2009

CALVO, C. L. Red Cell Biology: Erythropoiesis, Apoptosis, and Metabolism. LabM 321 Introduction to Clinical Hematology. University of Washington. Disponível em: <http://faculty.washington.edu/calvoc/DocumentsLabM321/Lectures/3RBC.ppt>.

Acesso em 25/09/2014

CHAILLEY, B.; WEED, R.I.; LEBLOND, P.F., MAIGNÉ, J. Formes échiocytaires et stomatocytaires du globule rouge, **Nouvelle Revue Française Hématologie.**, Paris, v.13, p.71-88, 1973.

CRISP, R.L.; SOLARI, L.; VOTA, D.; GARCÍA, E.; MIGUEZ, G.; CHAMORRO, M.E.; SCHVARTZMAN, G.A.; ALFONSO, G.; GAMMELLA, D.; CALDAROLA, S.; RICCHERI, C.; VITTORI, D.; VENEGAS, B.; NESSE, A.; DONATO, H. A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'-maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE) on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina. **Annals of Hematology**, v.90, n.6, p.625-634, 2011.

CYNOBER, T.; MOHANDAS, N.; TCHERNIA, G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. **Journal Laboratory and Clinical Medicine.** v.12, p.259-69,1996.

DA COSTA, L.; GALIMAND, J.; FENNETEAU, O.; MOHANDAS, N. Hereditary spherocytosis, and other red cell membrane disorders, **Blood Reviews**, Paris, v. 27, p. 167-178, 2013.

DELAUNAY, J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. **Blood Reviews** v.21, p.1-20, 2007.

DELHOMMEAU, F.; CYNOBER, T.; SCHISCHMANOFF, P. O.; ROHRLICH, P.; DELAUNAY, J.; MOHANDAS, N.; TCHERNIA, G. Natural history of hereditary spherocytosis during the first year of life, The American Society of Hematology, **The American Society of Hematology**, v. 95, p. 393-397, 2000.

DODGE, J.T.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.100, p.119-30, 1963.

EBER, S.; LUX, S. E. Hereditary Spherocytosis - Defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer, **Seminars in Hematology**, Munique, v. 41, n. 2, p. 118-141, 2004.

ELGSAETER, A.; MIKKELSEN, A. Shapes and shape change in vitro in normal red blood cells 1991), **Biochemistry and Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1071, p. 273-290, 1991.

FAIRBANKS, G.; STECK, T.L.; WALLACH, D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry**, v.10, p.2606-2617,1971.

FERRELL, J.E.; HUESTIS, W.H. Calcium does not mediate the shape change that follows ATP depletion in human erythrocytes, **Biochemistry and Biophysics Acta**, Amsterdam, v.687, p. 12792-12801, 1987.

GALLAGHER, P.G. Hereditary Elliptocytosis: Spectrin and Protein 4.1R, **Seminars in Hematology**, New Haven, v. 2, n. 41, p. 142-164, 2004.

GALLAGHER, P.G. Red cell membrane disorders, **American Society of Hematology**, New Haven, v. 2005, n.1, p 13-18, 2005.

GARRATY, G.; TELEN, M. J.; PETZ L. D.; Red cell antigens as functional molecules and obstacles to transfusion, **Hematology**, Durham, v. 2002, n. 1, p. 445-462, 2002.

GHOTI, H.; FIBACH E.; DANA M.; ABU SHABAN, M.; JEADI H.; BRAESTER A.; MATAS Z.; RACHMILEWITZ, E. Oxidative stress contributes to hemolysis in patients with hereditary spherocytosis and can be ameliorated by fermented papaya preparation. **Annals of Hematology**, v. 90 n.5, p.509-513 , 2010.

GOTTFRIED, E.L.; ROBERTSON, M.A. Glycerol lysis time as a screening test for erythrocyte disorders. **Journal Laboratory and Clinical Medicine**, v.83, p.323-333, 1974.

GRIMES, A. J. **Human red cell metabolism**. 1.ed. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1980.

HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood: Principles and practice of hematology**. 1.ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1995.

KARACAY, B.; CHANG, L.S.; Induction of erythrocyte protein 4.2 gene expression during differentiation of murine erythroleukemia cells, **Genomics**, Columbus, v. 59, n. 1, p. 6-17, 1999.

KING, M.J.; BEHRENS, J.; ROGERS, C.; FLYNN, C.; GREENWOOD, D.; CHAMBERS, K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. **British Journal Haematology**, v.111, p.924-33, 2000.

KING, M.J.; ZANELLA, A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing, **International Journal of Laboratory Hematology**, Bristol, v. 35, n. 3, p. 237-243, 2013.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685,1970.

LEE. G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology** 12.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

LEWIS, S.M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia pratica de Dacie e Lewis**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

LINDENBAUM, J.; KLIPSTEIN F.A. Folic acid deficiency in sickle-cell anemia. **New England Journal of Medicine**, v.269, p.875-882, 1963.

LOBO, C.A.; RODRIGUEZ. M.; REID. M.; LUSTIGMAN, S.; Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). **Blood**, New York, v.101, n. 11, p.4628-31, 2003.

LOW, P. S. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.864, n. 2, p. 145-167, 1986.

MANKELOW, T.J.; SATCHWELL, T.J.; BURTON, N.M. Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane, **Blood cells, molecules and diseases**, Bristol, v. 49, n.1, p. 1-10, 2012

MANNO, S.; TAKAKUWA, Y.; MOHANDAS, N.; Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability, **Research Gate**, New Haven, v.99, n.4, p. 1943-1948, 2001.

MARIANI, M.; BARCELLINI, W.; VERCELLATI, C.; MARCELLO, A.P.; FERMO, E.; PEDOTTI, P.; BOSCHETTI, C.; ZANELLA, A. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. **Haematologica**, v.93, p. 1310-1317, 2008.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J.A.; SHOHET, S.B. The influence os membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. **Seminars in Hematology**., New York, v.20, p. 225-242, 1983

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present and future, **American Society of Hematology**, Washington, v 112, n.10, p. 3939-3948, 2008.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Botucatu, v.29, n.2, p.168-178, 2007.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de metemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v.26, p.19 -22, 2004.

NATHAN, D.G.; ORKIN, S.H. Nathan & Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 5ª ed. **W.B:Saunders Company**, 1998.

PARPART, A. K.; LORENZ, P. B.; PARPART, E. R.; GREGG, J. R.; CHASE, A. M. The osmotic resistance (fragility) of human red cells, **Journal of Clinical investigation**, Princeton, v.26, n.4, p.636-640, 1947.

PERROTTA, S.; GALLAGHER, P.G.; MOHANDAS. N.; Hereditary Spherocytosis, **The Lancet**, Itália, v. 372, p. 1411-1426, 2008.

POOLE, J.; BANKS, J.; BRUCE, L. J.; RING, S. M.; LEVENE, C.; STERN, H.; OVERBEEKE, M. A.; TANNER, M. J. Glycophorin A mutation Ala65 - Pro gives rise to a novel pair of MNS alleles ENEP (MNS39) and HAG (MNS41) and altered Wrb expression: direct evidence for GPA/band 3 interaction necessary for normal Wrb expression. **Transfusion Med**, Bristol, v.9, n.2, p.167-74, 1999.

RECHETZKI, K. F.; HENNEBERG, R.; SILVA, P.H.; NASCIMENTO, A.J. Reference values for methemoglobin concentrations in children, **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, Curitiba, v. 34, n. 1, p. 14-16, 2012

ROCHA, S.; COSTA, E.; ROCHA-PEREIRA, P.; FERREIRA, F.; CLETO, E.; BARBOT, J.; QUINTANILHA A.; BELO L.; SANTOS-SILVA, A. Erythrocyte membrane protein destabilization versus clinical outcome in 160 Portuguese Hereditary Spherocytosis patients **British Journal of Haematology**, v.149, p.785–794

ROSENBLATT, D.S.; HOFFBRAND, A. V. Megaloblastic anemia an disorders of cobalamin and folate metabolism. **Pediatric Hematology**, p. 167-184 ,Churchill Livingstone, London.

SATCHWELL, T. J.; SHOEMARK, D. K.; SESSIONS, R. B.; TOYE, A. M. Protein 4.2 : A complex linker, **Blood Cells, Molecules and Diseases**, Bristol, v.42, n.3, p. 201–210, 2009.

SHOTTON. D.; BURKE, B.; BRANTON, D. The shape of spectrinmolecules from human erythrocyte membranes, **Biochemistry and Biophysics Acta**, London, v.536, n.1, p.313–317, 1978.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, **Science**, Washington, v.175, n.4023, p.720-731, 1972.

STORRY, J.R.; COGHLAN, G.; POOLE, J.; FIGUEROA, D.; REID, M.E. The MNS blood group antigens, Vr (MNS12) and Mt(a) (MNS14), each arise from an amino acid substitution on glycoporphin A. **Vox Sanguinis**. v.78 n.1 p.52-56, 2000.

STREICHMAN, S.; GESCHEIDT, Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. **American Journal Hematology**. v.58 n.3 p.206-212, 1998.

TELEN, M.J.; KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. In: GREER, J.P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11^a Ed., p.421-484, Lippincott Williams & Wilkins Publisher, 2004.

TERADA, N.; OHNO, N.; YAMAKAWA, H.; BABA, T.; FUJII, Y.; ZEA, Z.; OHARA, O.; OHNO, S. Immunohistochemical study of protein 4.1B in the normal and WW(v) mouse seminiferous epithelium, Japão, **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, v.52, n.6, p.769-77, 2004.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M. O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, São Paulo, 2007.

VIVES CORRONS, J. L.; BESSON, I.; Red cell membrane Na⁺ transport systems in hereditary spherocytosis: Relevance to understanding the increased Na⁺ permeability, **Annals Hematology**, Barcelona, v.80, p. 535-539, 2001.

WYANDT, H.; BANCROFT, P.M.; WENSHIP, T.O. Elliptic erythrocytes in man. **Archives of internal medicine**, Nebraska, v.68, n.6, p 1043-1065, 1941.

YU, J.; FISCHMAN, D.A; STECK, T.L. Selective solubilization of proteins and phospholipids of red blood cell membranes by non ionic detergents, **Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry**, Chicago, v.1, p 233-248, 1973