



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

SARA DANIELA CABETE MARTINS

***ANEMIAS HEMOLÍTICAS: CLÍNICA, DIAGNÓSTICO E
TERAPÊUTICA – UMA REVISÃO CRÍTICA***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO
MESTRE MARÍLIA GOMES**

ABRIL/2014

Resumo

A anemia é um dos distúrbios hematológicos mais comuns, sendo considerado um problema de saúde pública a nível mundial. A anemia hemolítica, que resulta de uma destruição prematura dos eritrócitos que não é colmatada pela eritropoiese, é classificada como uma anemia regenerativa, atendendo ao valor da contagem de reticulócitos. A hemólise pode ser aguda ou crónica e o seu diagnóstico é feito com base no aumento da LDH, da bilirrubina não conjugada e dos reticulócitos, na diminuição da haptoglobina e nos achados do esfregaço de sangue periférico.

As anemias hemolíticas são comumente classificadas em hereditárias e adquiridas. As hereditárias incluem os distúrbios da membrana eritrocitária, défices enzimáticos eritrocitários e hemoglobinopatias. As adquiridas incluem as de etiologias imunes e não imunes. Nesta revisão serão abordadas de forma sucinta as principais anemias hemolíticas hereditárias e ainda será dado destaque às anemias hemolíticas autoimunes e à Hemoglobinúria Paroxística Nocturna, tendo como pontos principais as suas manifestações clínicas, diagnóstico e terapêutica.

A investigação científica nesta área tem permitido uma melhor compreensão da fisiopatologia destas doenças, possibilitando o desenvolvimento de novas terapêuticas específicas, melhorando a qualidade de vida dos doentes.

Palavras-chave: anemias hemolíticas, hemoglobinopatias, hemoglobinúria paroxística nocturna, anemias hemolíticas autoimunes, défice de enzimas eritrocitárias, defeitos da membrana eritrocitária.

Abstract

Anemia is one of the most common hematologic disorders, and is considered a worldwide public health issue. Hemolytic anemia, the result of premature red blood cell destruction unsuccessfully compensated by erythropoiesis, is classified as a regenerative anemia, taking into consideration the reticulocyte count. Hemolysis may be acute or chronic and its diagnosis rests on increased serum LDH, unconjugated bilirubin and reticulocytes, decreased haptoglobin, as well as peripheral blood smear findings.

Hemolytic anemias are commonly classified as hereditary or acquired. Hereditary hemolytic anemias include red blood cell membrane or enzyme disorders and hemoglobinopathies. Acquired hemolytic anemias are divided according to the immune or non-immune nature of their etiology. This review provides a succinct overview of the main hereditary hemolytic anemias, while also concerning auto-immune anemias and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, maintaining the focus on their clinical presentation, diagnosis and treatment.

Scientific investigation in this area has allowed for a better understanding of the physiopathological processes behind these disorders, while also enabling the development of new, specific treatment options, improving quality of life for affected patients.

Keywords: hemolytic anemias, hemoglobinopathies, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, autoimmune hemolytic anemia, red cell enzymopathies, red cell membrane disorders

Índice

1. Introdução.....	10
2. Eritropoiese	12
3. Destruição Normal dos Eritrócitos	14
4. Anemia	15
4.1. Definição e Classificação	15
4.2. Abordagem Clínica.....	16
4.2.1. História Clínica e Exame Físico.....	16
4.2.2. Exames Laboratoriais	18
4.2.3. Diagnóstico Diferencial.....	20
5. Anemias Hemolíticas	20
5.1. Abordagem Clínica.....	21
5.2. Anemias Hemolíticas Hereditárias	23
5.2.1. Defeitos da Membrana Eritrocitária	23
5.2.1.1. Organização da Membrana do Eritrócito.....	23
5.2.1.2. Esferocitose Hereditária	24
5.2.1.2.1. Fisiopatologia	25
5.2.1.2.2. Manifestações Clínicas e Diagnóstico.....	26
5.2.1.2.3. Tratamento.....	27
5.2.1.3. Eliptocitose Hereditária	28
5.2.2. Defeitos das Enzimas Eritrocitárias	29
5.2.2.1. Défice de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	30
5.2.2.1.1. Manifestações Clínicas e Diagnóstico.....	31
5.2.2.1.2. Tratamento.....	32
5.2.2.2. Défice de Cinase do Piruvato	33
5.2.2.2.1. Manifestações Clínicas, Diagnóstico e Terapêutica	33
5.2.3. Distúrbios da Hemoglobina.....	35

5.2.3.1.	α -talassemia	37
5.2.3.1.1.	Manifestações Clínicas, Diagnóstico e Tratamento	38
5.2.3.2.	β -talassemias.....	40
5.2.3.2.1.	Manifestações Clínicas	41
5.2.3.2.2.	Diagnóstico	43
5.2.3.2.3.	Tratamento.....	43
5.2.3.3.	Anemia de Células Falciformes.....	45
5.2.3.3.1.	Manifestações Clínicas	46
5.2.3.3.2.	Diagnóstico	47
5.2.3.3.3.	Tratamento.....	48
5.3.	Anemias Hemolíticas Adquiridas.....	49
5.3.1.	Hemoglobinúria Paroxística Nocturna	49
5.3.1.1.	Fisiopatologia	49
5.3.1.2.	Manifestações Clínicas	52
5.3.1.3.	Diagnóstico	55
5.3.1.4.	Tratamento.....	57
5.3.2.	Anemia Hemolítica Autoimune	60
5.3.2.1.	Fisiopatologia	61
5.3.2.2.	Manifestações Clínicas	64
5.3.2.3.	Diagnóstico.....	65
5.3.2.4.	Tratamento.....	67
5.3.2.4.1.	AHAI por Anticorpos Quentes	67
5.3.2.4.2.	AHAI por Anticorpos Frios.....	71
5.3.2.4.3.	Hemoglobinúria Paroxística a Frio.....	72
6.	Conclusão	74
7.	Agradecimentos.....	76
8.	Referências Bibliográficas	77

9. Anexos.....	81
----------------	----

Índice de Figuras

Figura 1: Incidência das principais causas de anemia.....	10
Figura 2: Diagrama representativo da hematopoiese.....	13
Figura 3: Estrutura da membrana eritrocitária.	24
Figura 4: Via glicolítica de Embden-Meyerhof e as suas interacções com a via da pentose fosfato e com o shunt Luebering-Rapoport.....	30
Figura 5: Activação do Sistema Complemento e local de acção do eculizumab.....	51
Figura 6: Algoritmo diagnóstico de anemias regenerativas.....	81
Figura 7: Algoritmo diagnóstico de anemias hiporregenerativas.....	82

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação de anemias em regenerativas e hiporregenerativas.....	16
Tabela 2: Pontos-chave a pesquisar na investigação da anemia.	17
Tabela 3: Classificação de anemias hemolíticas	22
Tabela 4: Outras hemoglobinopatias que podem cursar com anemia hemolítica.....	37
Tabela 5: Manifestações Clínicas da Doença de Células Falciformes.....	47
Tabela 6: Classificação da Hemoglobinúria Paroxística Nocturna.....	57

Índice de Abreviaturas

2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato
Ac	Anticorpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN _c	Ácido desoxirribonucleico complementar
AHAI	Anemia Hemolítica Autoimune
AINE's	Anti-Inflamatórios não Esteróides
AST	Aminotransferase de Aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BFU-E	<i>Burst forming unit-erythroid</i>
CAM	Electroforese em membrana de acetato de celulose em pH alcalino
CFU-E	<i>Colony forming unit-erythroid</i>
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corposcular Média
CLAR	Cromatografia líquida de alta resolução
HE	Eliptocitose Hereditária
EMA	Teste da eosina-5-maleimida
EPO	Eritropoietina
fL	Fentolitros
G6PD	Desidrogenase de Glicose-6-Fosfato
GAH	Globulinas anti-humanas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GV	Glóbulo Vermelho
Hb	Hemoglobina

HbA	Hemoglobina do adulto
HbA ₂	Hemoglobina do adulto tipo 2
HbBart	Hemoglobina Bart
HbC	Hemoglobina C
HbF	Hemoglobina fetal
HbH	Hemoglobina H
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HLA	Antigénio Leucocitário Humano
HPF	Hemoglobinúria Paroxística a Frio
HPN	Hemoglobinúria Paroxística Nocturna
HS	Esferocitose Hereditária
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG3	Imunoglobulina G3
IgM	Imunoglobulina M
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
LDH	Desidrogenase do lactato
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzida
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzida

NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PK	Cinase do Piruvato
PMN	Polimorfonucleares
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
Rh	Factor Rhesus
RM	Ressonância Magnética
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SRE	Sistema Reticuloendotelial
TAD	Teste da antiglobulina directo
TIA	Teste da antiglobulina indirecto
VCM	Volume Corpuscular Médio
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ζ	Zeta

1. Introdução

A anemia é uma condição hematológica comum, tanto no adulto como nas crianças, sendo considerado, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), um problema de saúde pública à escala mundial com impacto, não só na saúde, mas também nas condições sociais e no desenvolvimento económico [1]. A anemia é definida pela OMS como valores de hemoglobina (Hb) inferior a 12g/dL nas mulheres e inferior a 13g/dL nos homens [2].

A anemia hemolítica, resulta de uma destruição prematura dos eritrócitos que não é compensada pela eritropoiese, corresponde a cerca de 17,5% de todos os casos de anemia (Figura 1). É classificada como regenerativa por apresentar uma contagem absoluta de reticulócitos superior a $100 \times 10^9/L$ [3]. De acordo com a etiologia podem ser divididas em hereditárias e adquiridas. As adquiridas podem ainda ser classificadas em imunes, em que há um mecanismo imune que leva à lise dos eritrócitos mediada por anticorpos, e não imunes.

Principais Causas de Anemia

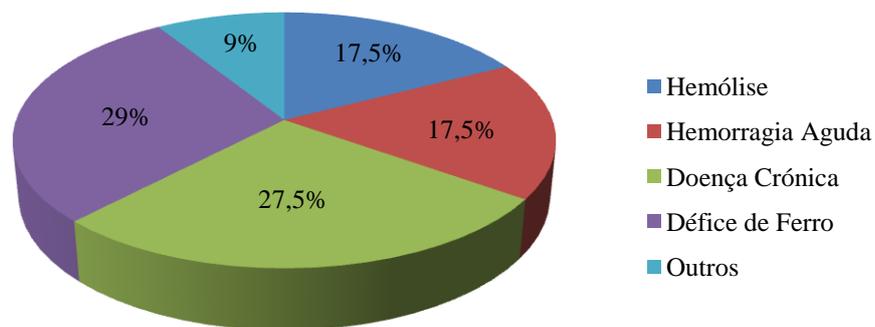


Figura 1: Incidência das principais causas de anemia. Adaptado de [3]

Clinicamente, os doentes com anemia hemolítica apresentam fadiga, dispneia e palidez cutâneo-mucosa, mas também aspectos mais particulares, relacionados com a hemólise, como icterícia, esplenomegalia e urobilinúria. No entanto, existem também casos em que a hemólise é assintomática, sendo detectada apenas por exames laboratoriais ocasionais. Para chegar a um diagnóstico correcto, é importante avaliar o doente, realizando uma história clínica cuidadosa e um exame físico completo, uma vez que estes podem indicar uma potencial causa da anemia, quer esta seja primária ou secundária a uma patologia subjacente [4]. O estudo das anemias obriga à realização de um hemograma completo, contagem de reticulócitos e esfregaço de sangue periférico para uma boa investigação etiológica.

Sendo a anemia um problema tão prevalente, é fundamental a aquisição dos conhecimentos necessários para a realização de um diagnóstico correcto. Por outro lado, devido ao fenómeno crescente de migração populacional, é indispensável ter actualizado o conhecimento relativo a algumas patologias que não seriam prováveis em determinadas áreas geográficas.

O propósito deste trabalho é a realização de uma revisão teórica actualizada da literatura sobre anemia hemolítica como um problema geral, indicando as manifestações clínicas, os procedimentos de diagnóstico e de terapêutica, e abordando particularmente as principais causas hereditárias (Talassemias, Eriptocitose Hereditária, Esferocitose Hereditária, Défice de glicose-6-fosfato e Défice de Piruvato Cinase) e algumas causas adquiridas (Anemia Hemolítica Autoimune e Hemoglobinúria Paroxística Nocturna), recorrendo a artigos científicos, livros e revistas especializadas.

2. Eritropoiese

A hematopoiese é um processo celular e molecular complexo, delicadamente regulado, que resulta na produção das diferentes linhas celulares do sangue. A célula precursora é a célula estaminal hematopoiética, que se divide e diferencia em células estaminais progenitoras de linhagem, linfóide e mielóide, que proliferam e se diferenciam em células sanguíneas maduras funcionais, na presença de factores de crescimento e do microambiente envolvente [5].

A eritropoiese é o processo pelo qual se originam os eritrócitos, e é parte integrante da hematopoiese. É um dos processos mais bem estudados a nível celular e molecular, uma vez que os diferentes estádios da eritropoiese podem ser definidos por marcadores fenotípicos, a maioria, ou mesmo todos os factores que a regulam são conhecidos e a diferenciação final dos eritrócitos depende apenas de um factor, a eritropoietina (EPO). Por outro lado, as doenças eritrocitárias estão bem caracterizadas e, em muitos casos, a causa molecular foi já descoberta. Além disto, a eritropoiese é o processo hematopoiético que quantitativamente tem maior rendimento, sendo produzidos cerca de 2×10^{11} eritrócitos por dia [5,6].

A eritropoiese é cuidadosamente regulada por vários factores de crescimento e de transcrição nucleares, entre os quais se destacam a EPO e o GATA-1, e pelo microambiente envolvente. Ao longo do desenvolvimento humano a eritropoiese ocorre em distintas áreas anatómicas. Durante o período embrionário ocorre nas ilhas sanguíneas do saco vitelino, no período fetal predominantemente no fígado e durante a vida adulta ocorre principalmente na medula óssea [6].

A eritropoiese tem início quando uma célula estaminal hematopoiética multipotente inicia um conjunto de processos que vai culminar com o seu comprometimento à linhagem eritróide (Figura 2). As primeiras células desta linhagem, os *burst forming unit-erythroid* (BFU-E), dependem de muitos factores de crescimento para a sua diferenciação em *colony*

forming unit-erythroid CFU-E, nomeadamente do *stem cell factor* (SCF, que, por sua vez, se vão diferenciar em proeritroblastos, a primeira célula morfologicamente identificável da linhagem eritróide, dependendo da EPO. Os proeritroblastos diferenciam-se, sucessivamente, em eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos acidófilos, que são as últimas células nucleadas da linhagem eritróide. A diferenciação prossegue dando origem aos reticulócitos, que são células sem núcleo, que passam por diapedese através da parede dos sinusóides medulares para o sistema circulatório, e que vão dar origem aos eritrócitos maduros.

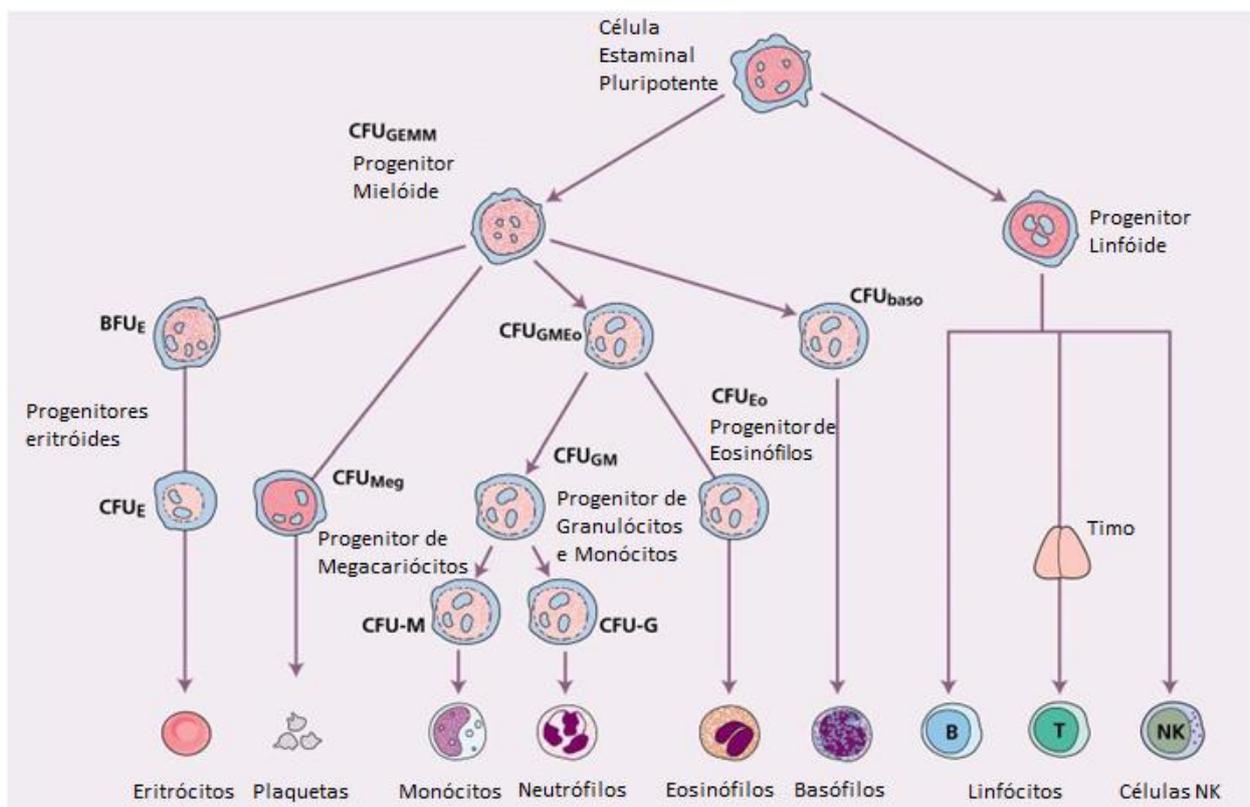


Figura 2: Diagrama representativo da hematopoiese. Adaptado de [10].

Este processo ocorre, durante a vida adulta, como já foi referido, na medula óssea e necessita, para além das condições já referidas, de uma fonte adequada de ferro, ácido fólico e vitamina B12.

Os eritrócitos têm uma semivida de 100-120 dias, em condições normais, sendo que a eritropoiese é regulada de forma a que o número de eritrócitos formados seja equivalente ao número de eritrócitos perdidos por senescência. Os eritrócitos senescentes são removidos por macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE), principalmente no baço. Apesar desta regulação, em resposta à diminuição do número de eritrócitos por hemólise ou hemorragia, verifica-se um aumento da formação de reticulócitos em poucos dias, regulada pela EPO. Esta é produzida essencialmente no rim, sendo que o número de células produtoras de EPO aumenta exponencialmente com diminuições lineares no hematócrito [5,6].

3. Destruição Normal dos Eritrócitos

Como já foi referido, a semivida dos eritrócitos é de, aproximadamente, 120 dias em circunstâncias normais, desde que o reticulócito é libertado em circulação, até que o eritrócito senescente é sequestrado por macrófagos do SRE. Algumas teorias pretendem explicar este processo como, por exemplo, a acumulação de lesões oxidativas na membrana, a perda de deformabilidade do eritrócito (perda da forma em disco bicôncavo, passando para uma forma esférica), perda de enzimas necessárias para manter o equilíbrio do estado de oxidação-redução e para metabolismos intermediários, e ainda mecanismos imunes [7].

Depois dos eritrócitos serem retirados de circulação, ocorre a degradação da hemoglobina. Esta é separada nos seus dois constituintes: o grupo heme e a globina. O grupo heme é ainda separado em ferro e protoporfirina. O ferro liga-se à transferrina formando um complexo que reentra em circulação, sendo reaproveitado pelos eritroblastos na medula óssea. A protoporfirina é transformada em bilirrubina, que é conjugada a nível hepático e excretada através da bÍlis no duodeno, onde é convertida em estercobilinogénio e estercobilina. A estercobilina é eliminada nas fezes, mas tanto esta como o estercobilinogénio podem ser

reabsorvidos para a circulação, sendo depois eliminados pela urina como urobilina ou urobilinogénio. As cadeias de globina são degradadas em aminoácidos, que vão ser reutilizados na formação de novas proteínas.

4. Anemia

4.1. Definição e Classificação

A OMS define anemia quando a concentração de Hb é inferior a 12g/L nas mulheres e a 13g/L nos homens. [2]. Relativamente às crianças, a OMS considera existência de anemia em crianças dos 6 meses aos 6 anos quando a Hb é inferior a 11g/L, e em crianças dos 6 aos 14 anos quando é inferior a 12g/L.

Actualmente, as anemias podem ser classificadas, em hiporregenerativas ou regenerativas, de acordo com a contagem absoluta de reticulócitos. Assim, as anemias hiporregenerativas são as anemias em que a contagem absoluta de reticulócitos é inferior a $50 \times 10^9/L$, e as regenerativas são as que a contagem absoluta de reticulócitos é superior a $100 \times 10^9/L$ [3].

As anemias hiporregenerativas podem ter diversas etiologias, nomeadamente a anemia aplástica, a aplasia eritróide pura, a síndrome mielodisplásica. Os défices de ferro e/ou vitaminas, a infiltração medular, a fibrose medular, a anemia da doença inflamatória, e o défice de produção de EPO. Por outro lado, as anemias regenerativas podem ser divididas em dois grupos: anemia devido a hemorragia aguda e anemias hemolíticas (Tabela 1) [3].

Tabela 1: Classificação de anemias em regenerativas e hiporregenerativas. Adaptado de [8].

Hiporregenerativas	Regenerativas
Anemia aplástica	Hemólise
Aplasia pura de eritrócitos	Imune
Síndrome mielodisplásico	Não imune:
Estados de deficiência:	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Congénitas:</u> défices da membrana eritrocitária, SS, talassémias, enzimopatias, Hb instável; • <u>Adquiridas:</u> HPN, drogas, microangiopatia, hiperesplenismo
<ul style="list-style-type: none"> • Ferro • Vitaminas 	
Infiltração da medula/fibrose	
Anemia inflamatória (anemia da doença crónica)	Hemorragia
Subprodução de Eritropoietina	

Anemia hiporregenerativa – contagem de reticulócitos inferior a $50 \times 10^9/L$

Anemia regenerativa – contagem de reticulócitos superior a $100 \times 10^9/L$

HPN, Hemoglobinúria Paroxística Nocturna; SS, doença de células falciformes homozigótica.

4.2. Abordagem Clínica

4.2.1. História Clínica e Exame Físico

Os doentes com anemia podem referir sintomas inespecíficos como fadiga, dispneia, palpitações, cefaleias ou cansaço fácil. Também podem estar presentes sinais gerais de anemia, como palidez da pele e mucosas, taquicardia, hipotensão arterial e sopro sistólico. Alguns sinais estão associados a tipos particulares de anemia, como é o caso da queilite

angular e coiloníquia, associadas a anemia ferropénica; a esplenomegalia, que pode estar associada a anemias hemolíticas congénitas anemia hemolítica autoimune ou doenças linfoproliferativas. Os sinais de hemólise como a icterícia, podem orientar-nos para o diagnóstico de anemias hemolíticas [3,9]. É também importante distinguir se a anemia teve um início súbito ou se, por outro lado, teve um início insidioso e se há história de hemorragia. A Tabela 2 resume os pontos mais importantes da história e do exame físico dos doentes com anemia.

Tabela 2: Pontos-chave a pesquisar na investigação da anemia. Adaptado de [3]

História Clínica	Exame Físico
História familiar de anemia	Palidez
Raça	Icterícia
Início agudo/insidioso	Petéquias
Hemorragia – urina, fezes, gástrica, pulmonar	Temperatura
Infecções	Taquicardia, hipotensão arterial
Flebotomias	Esplenomegalia
Icterícia, urina escura (traduz hemoglobinúria)	Adenomegalia
Petéquias	
Sintomas de outros órgãos	
Massas, nódulos	
Consumo de álcool e hábitos alimentares	
Uso de drogas, hábitos medicamentosos	
Transfusões prévias	

O diagnóstico etiológico de anemia deve ser determinado combinando dados da história clínica, exame físico, hemograma completo, contagem absoluta de reticulócitos e

esfregaço de sangue periférico. Dependendo dos dados obtidos a partir da abordagem acima descrita, serão necessários exames mais específicos, laboratoriais ou de outro tipo, para determinar a causa da anemia.

Na abordagem do doente, devemos ter em conta que a anemia pode ser uma entidade primária ou secundária a outras doenças. Assim, um questionário sistemático e abrangente torna-se muito importante, uma vez que pode indicar a causa, ou orientar para um grupo mais restrito de diagnósticos.

Questionar sobre os antecedentes pessoais ajuda-nos a perceber se pode haver alguma entidade nosológica que esteja a causar anemia, como, por exemplo, qualquer doença crónica. Tendo em conta que a causa mais comum de anemia são os défices nutricionais, é indispensável saber os hábitos alimentares e a ingestão diária de bebidas alcoólicas. A história social e ocupacional tem também relevância no contexto de anemia, uma vez que, por exemplo, toxicod dependentes que consomem drogas injectáveis podem ter doenças virais, como infecção por vírus da imunodeficiência humana (VIH) e/ou da hepatite C (VHC), que podem estar associados a anemia. Já em termos ocupacionais, a exposição a agentes tóxicos para a medula óssea, como o chumbo, podem cursar com anemia. Saber os hábitos medicamentosos do doente é importante, uma vez que estes podem causar diversas reacções que podem levar a anemia, desde aplasia medular a reacções hemolíticas. Determinar se há história familiar de anemia, particularmente em crianças, é essencial, uma vez que alguns tipos de anemia têm carácter hereditário.

4.2.2. Exames Laboratoriais

A contagem absoluta de reticulócitos é um parâmetro laboratorial útil, preciso e que reflecte o estado da eritropoiese [3], sendo essencial na investigação etiológica da anemia.

Atendendo a este parâmetro podemos então perceber se há uma resposta compensatória da medula óssea à anemia, com aumento da produção de eritrócitos (anemias hiperregenerativas), ou se, por outro lado, a anemia é secundária a um déficit da produção de eritrócitos (anemias hiporregenerativas).

Outro parâmetro laboratorial de grande importância na investigação e diagnóstico diferencial de anemia é o volume corpuscular médio (VCM), apresentado em fentolitros (fL), que corresponde ao tamanho médio dos eritrócitos. Até recentemente, a classificação das anemias (microcíticas, normocíticas ou macrocíticas) era apenas baseada neste índice eritrocitário.

O RDW (*red cell distribution width*), ou coeficiente de distribuição eritrocitário é um parâmetro que avalia a percentagem de variação de tamanho dos eritrócitos, isto é a anisocitose

Os três índices mencionados, quando avaliados em conjunto, auxiliam o diagnóstico diferencial, direccionando os passos seguintes na investigação.

O exame do esfregaço de sangue periférico é um dos exames mais informativos no diagnóstico da anemia. Permite confirmar os dados obtidos pelo hemograma que, em algumas situações, como a formação de *rouleaux* ou a presença de eritrócitos nucleados, podem ser imprecisos. Além da observação dos eritrócitos, permite também a observação de outras linhas celulares, podendo informar sobre a presença de uma doença primária da medula óssea, ou de doenças infiltrativas. As alterações do esfregaço sanguíneo podem, em alguns casos, surgir antes de estas se reflectirem no hemograma, nomeadamente na concentração de hemoglobina ou no VCM. O esfregaço sanguíneo tem especial importância na suspeita de anemias hemolíticas, uma vez que algumas destas dão origem a alterações morfológicas características nos eritrócitos [3,9].

4.2.3. Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial deve ter em atenção os dados obtidos na história clínica, exame físico e exames laboratoriais, como explicado nas secções anteriores. De uma forma global, podemos guiar-nos pelos algoritmos em anexo de forma a chegarmos a um diagnóstico, considerando a contagem absoluta de reticulócitos, o VCM e o esfregaço de sangue periférico.

5. Anemias Hemolíticas

As anemias hemolíticas fazem parte do grupo das anemias regenerativas e manifestam-se quando o ritmo da eritropoiese não é suficiente para compensar o número de eritrócitos perdidos por hemólise [3].

A hemólise pode ocorrer por dois mecanismos: intravascular e extravascular. A hemólise intravascular corresponde à destruição dos eritrócitos na corrente sanguínea, havendo libertação do conteúdo eritrocitário para o plasma. É a forma menos comum de hemólise e pode resultar, por exemplo, de trauma mecânico secundário a lesão endotelial, à fixação ou activação do complemento, ou por lesão directa da membrana e destruição celular por agentes infecciosos. A hemólise extravascular é a forma mais comum de hemólise e é caracterizada pela remoção e destruição dos eritrócitos com alterações da membrana pelos macrófagos do SRE [4].

As anemias hemolíticas podem ser classificadas etiologicamente em hereditárias e em adquiridas (Tabela 3). As hereditárias resultam de alterações intrínsecas dos eritrócitos e podem dividir-se em defeitos da membrana dos eritrócitos (como, esferocitose e eliptocitose hereditárias), distúrbios da hemoglobina (como, doença de células falciformes, HbC, talassémias) e défices de enzimas eritrocitárias (como, défice da cinase do piruvato, défice de

desidrogenase da glucose-6-fosfato [G6PD]). As adquiridas podem ter diferentes etiologias, como síndromes de fragmentação dos glóbulos vermelhos (GV), a hemoglobinúria paroxística nocturna (HPN), e podem ser secundárias a agentes físicos e químicos, a infecções e a patologias hepática e renal. As imunes resultam de um mecanismo hemolítico mediado por anticorpos que pode ou não cursar com a activação do complemento. Podem ser divididas em autoimunes, aloimunes e associadas a fármacos. As anemias hemolíticas autoimunes (AHAI) podem ser primárias, ou estar associadas a outras doenças autoimunes ou a síndromes linfoproliferativas [3].

Neste trabalho será discutido com maior relevância a anemia hemolítica imune, enquanto os outros tipos serão apresentados de forma mais sucinta.

5.1. Abordagem Clínica

Para além das características gerais que já foram abordadas, as anemias hemolíticas podem ter manifestações clínicas mais características ou sugestivas deste diagnóstico. As anemias hemolíticas agudas podem cursar com hemoglobinúria e, por vezes, com dor dorsal (particularmente quando a hemólise é intravascular), icterícia, hepatoesplenomegália ou esplenomegália [4].

A anemia é habitualmente normocítica podendo, no entanto, quando a reticulocitose é muito elevada, haver um ligeiro aumento do VCM. Isto ocorre porque os reticulócitos têm um VCM de aproximadamente 150 fL, enquanto o VCM dos eritrócitos maduros é de 80 a 100fL. Na avaliação da anemia hemolítica, a observação do esfregaço de sangue periférico é essencial e muito informativo, uma vez que há aspectos morfológicos dos eritrócitos que são característicos em algumas doenças. Não só a avaliação da série vermelha, mas também o aspecto morfológico da série branca e das plaquetas é muito útil, já que permite excluir ou confirmar a coexistência de doenças hematológicas ou malignas [9].

Tabela 3: Classificação de anemias hemolíticas. Adaptado de [10].

Classificação de Anemias Hemolíticas	
Hereditárias	Adquiridas
Défices de enzimas eritrocitárias	Imunes
Defeitos da membrana eritrocitária	<i>Autoimunes</i>
Distúrbios da hemoglobina	AHAI por anticorpos quentes
	AHAI por anticorpos frios
	AHAI do tipo misto
	<i>Aloimunes</i>
	Reacção hemolítica a transfusão
	Doença hemolítica do recém-nascido
	Aloenxertos
	<i>Associada a fármacos</i>
	Síndromes de Fragmentação dos GV
	HPN
	Agentes Físicos e Químicos
	Infecções
	Secundárias

AHAI, anemia hemolítica autoimune; GV, glóbulos vermelhos; HPN, hemoglobinúria paroxística noturna

Os dados da análise bioquímica são imprescindíveis para o diagnóstico da anemia hemolítica. Estes traduzem-se por aumento da bilirrubina não-conjugada e da desidrogenase do lactato (LDH) e diminuição/ausência da haptoglobina. Além disso, quando ocorre hemólise, há libertação de LDH e de hemoglobina para o plasma sanguíneo. A hemoglobina libertada é convertida em bilirrubina não-conjugada, como resultado da metabolização do grupo heme, ou pode ligar-se à haptoglobina no plasma, formando o complexo hemoglobina-

haptoglobina. A hemoglobina em excesso na circulação acaba por saturar a haptoglobina, o que leva à sua diminuição ou mesmo ausência.

Podem também ser encontradas alterações na sumária de urina, como consequência da hemólise. Nomeadamente, uma urina escura, devido à presença em excesso de urobilinogénio [4].

5.2. Anemias Hemolíticas Hereditárias

5.2.1. Defeitos da Membrana Eritrocitária

5.2.1.1. Organização da Membrana do Eritrócito

A membrana eritrocitária é um constituinte, estrutural e funcional, essencial para a normal actividade do glóbulo vermelho. É necessária para a homeostasia interna do eritrócito, através da manutenção de um pH e de um diferencial electrolítico, entre o GV e o plasma, adequados. Além disto, é também responsável pela característica estrutura bicôncava do GV e por manter uma fluidez, deformabilidade, osmolaridade e uma razão entre a área e o volume apropriados. Assim, compreende-se que esta estrutura seja fulcral para a resposta a estímulos do ambiente exterior e consequente adaptação do GV [11].

A membrana do eritrócito é constituída por uma dupla camada lipídica (colesterol e fosfolípidos) e por um conjunto de proteínas integrais, ou transmembranares, como as glicoforinas e a proteína de banda 3 (Figura 3) [12], que interagem com as proteínas do citoesqueleto através do complexo banda 3, anquirina, proteínas 4.1 e 4.2. O citoesqueleto é formado maioritariamente por espectrina α e β , mas também por outras proteínas como a anquirina, a proteína 4.1 e a actina.

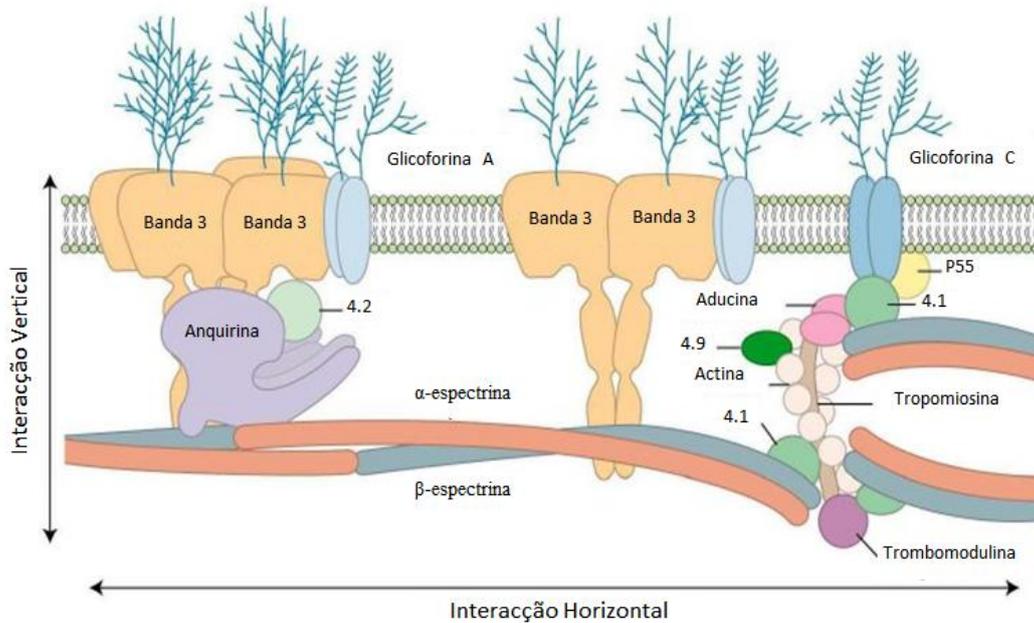


Figura 3: Estrutura da membrana eritrocitária. Adaptado de [10]

Os movimentos combinados, horizontais e verticais, entre estas proteínas, regulam a deformabilidade e a elasticidade do eritrócito em circulação (Figura 3) [12]. As interações verticais, perpendiculares ao plano da membrana, incluem interações entre espectrina-anquirina-banda3 e são responsáveis pela estabilização da dupla camada lipídica. As interações horizontais, paralelas ao plano da membrana, incluem o local de associação dos heterodímeros de espectrina e são responsáveis por manter a integridade estrutural da membrana, após a sua exposição a forças de cisalhamento [13].

5.2.1.2. Esferocitose Hereditária

A esferocitose hereditária (HS) é a anemia hemolítica mais comum nos caucasianos, com uma incidência de 1 em 3000 [14]. Aproximadamente 75% dos casos são de transmissão autossômica dominante, enquanto os restantes são de transmissão autossômica recessiva ou por mutações *de novo* [15]. As características mais comuns da HS (autossômica dominante)

são anemia ligeira a moderada, presença de esferócitos no esfregaço de sangue periférico e uma resposta favorável à esplenectomia. No entanto, é uma doença pautada pela heterogeneidade clínica, havendo desde formas assintomáticas, até formas graves que requerem tratamento desde a infância [13].

5.2.1.2.1. Fisiopatologia

A HS é provocada por mutações nos genes que codificam proteínas estruturais da membrana do eritrócito, nomeadamente espectrina, anquirina, proteína 4.2 e proteína banda 3, envolvidas nas suas interações verticais [14]. Esta alteração hereditária condiciona uma deficiência ou disfunção dessas proteínas, diminuindo a área de superfície da membrana e acelerando o processo de destruição do eritrócito. As hipóteses para a explicação da diminuição da área de superfície da membrana do eritrócito ainda não estão totalmente esclarecidas, mas pensa-se que esta deverá ocorrer devido a um enfraquecimento das interações verticais, entre o citoesqueleto e a dupla camada lipídica, ou à diminuição do efeito estabilizador das proteínas transmembranares sobre as moléculas lipídicas da membrana [13]. Estes distúrbios vão traduzir-se também numa alteração na forma do eritrócito, que fica mais pequeno e denso, adquirindo a forma esférica (esferócito), característico, mas não específico, desta patologia.

A HS pode ser classificada pela quantificação densitométrica das proteínas da membrana, separadas por electroforese de gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em: (1) défice isolado de espectrina; (2) défice combinado de espectrina e anquirina; (3) défice de proteína banda 3; (4) défice de proteína 4.2; (5) sem alteração identificada. [13].

Devido à diminuição da área de superfície dos eritrócitos normais de $140\mu\text{m}^2$ para cerca de $85\mu\text{m}^2$ nos esferócitos, os últimos são mecanicamente frágeis e têm uma menor deformabilidade [11]. Os eritrócitos normais têm a capacidade de se deformar para passar pelos capilares estreitos da microcirculação. Pelo contrário, os eritrócitos na HS, como têm diminuição da sua superfície, perdem a capacidade de se deformar nos capilares mais estreitos, ficando presos na circulação. A incapacidade de deformação é ainda agravada pela desidratação celular, característica das células da HS. Os eritrócitos mutados são selectivamente destruídos no baço, principalmente nas fenestrações da parede dos seios esplênicos, que actuam como filtros da microcirculação [11,13].

5.2.1.2.2. Manifestações Clínicas e Diagnóstico

A esferocitose hereditária é uma doença fenotipicamente muito heterogénea, podendo apresentar diferentes padrões clínicos. A gravidade da doença está relacionada com a extensão da diminuição da estabilidade mecânica da membrana e com a perda de superfície da membrana [14] e, portanto, está também relacionada com o tipo de mutação que lhe dá origem.

A clínica pode variar de anemia ligeira a moderada, podendo até não haver anemia, devido a hiperplasia compensatória da medula óssea. É também característica a existência de icterícia nas formas típicas, muitas vezes flutuante [10], bem como esplenomegália, que se agrava gradualmente. A icterícia neonatal é mais comum nos recém-nascidos com HS [14]. Nas formas mais graves há hemólise severa que pode levar a um estado de dependência transfusional no início da vida e na infância [13].

No esfregaço sanguíneo observam-se os característicos esferócitos e há um aumento da contagem absoluta de reticulócitos. As formas ligeiras de HS podem ser difíceis de

diagnosticar, uma vez que podem apresentar valores de hemoglobina e concentrações de bilirrubina normais [12].

Infecções concomitantes, como a mononucleose infecciosa [12] e a infecção por parvovirus B19, podem conduzir a uma crise aplásica, com exacerbação dos sintomas da HS e agravamento da anemia [14].

Em suma, o que encontramos nos exames laboratoriais são valores de hemoglobina de 8 a 11g/dL, nas formas moderadas, e de 6 a 8g/dL, nas formas graves; esferócitos no esfregaço sanguíneo; aumento dos reticulócitos, da bilirrubina não conjugada, da aminotransferase de aspartato (AST) e da LDH [14]. No entanto, estas alterações podem estar ausentes em indivíduos com formas ligeiras da doença.

O diagnóstico de HS ocorre frequentemente durante a infância, ou no início da idade adulta, mas pode ser feito em qualquer idade. Na presença de história familiar de HS e de uma forma de apresentação típica (história e exame físico típicos, esfregaço com esferócitos, reticulocitose e teste de Coombs negativo), assume-se o diagnóstico de HS, que deve ser confirmado por exames mais específicos. Nas formas de apresentação atípica, sem história familiar, e quando outras formas de hemólise foram excluídas, os exames laboratoriais indicados para fazer o diagnóstico definitivo são o teste da eosina-5-maleimida (EMA) e o teste de criohemólise. Em casos seleccionados pode ser necessária a confirmação do diagnóstico por SDS-PAGE. O teste da fragilidade osmótica não está indicado [12].

5.2.1.2.3. Tratamento

Para além do suporte transfusional, se a anemia for sintomática, a esplenectomia é o tratamento de eleição nos indivíduos com HS moderada e grave, já que aumenta a sobrevivência dos eritrócitos, diminuindo a gravidade da anemia e a da hiperbilirrubinémia.

Assim, os doentes devem ser seleccionados para serem sujeitos a esplenectomia de acordo com as manifestações clínicas e complicações da doença e não apenas pelo diagnóstico de HS. A esplenectomia está indicada em crianças com doença severa e em doentes com complicações, como litíase vesicular, e deve ser considerada em crianças com doença moderada. É preciso ter em conta os riscos da esplenectomia, nomeadamente de infecções durante toda a vida, principalmente por espécies pneumocócicas, meningocócicas e por *Haemophilus influenza* do tipo b, sendo necessário realizar profilaxia antibiótica e vacinação adequadas [12]. Todos os indivíduos com HS moderada a grave devem fazer terapêutica com ácido fólico (1mg/dia) [13].

5.2.1.3. Eliptocitose Hereditária

A Eliptocitose Hereditária (EH) é uma doença de hereditariedade autossómica dominante, provocada por um defeito nos heterodímeros de espectrina (mutações na α -espectrina, β -espectrina, glicoforina C, entre outras), que não se conseguem associar em heterotetrâmeros, provocando defeitos nas interações horizontais da membrana do eritrócito [16].

É uma doença comum em áreas endémicas de malária na África Ocidental (prevalência de 2%) [15]. A sua verdadeira incidência é difícil de avaliar, uma vez que a maioria dos doentes é assintomática.

Clinica e laboratorialmente, a EH tem características semelhantes à HS, excepto no esfregaço de sangue periférico que apresenta eliptócitos e poiquilocitose. Os doentes são geralmente assintomáticos, mas aproximadamente 10% podem ter uma forma moderada ou grave de anemia, particularmente nas formas homozigóticas ou duplamente heterozigóticas[15].

Tal como na HS, os doentes com eliptocitose hereditária com hemólise sintomática beneficiam do tratamento cirúrgico por esplenectomia. Devem ser tomadas as mesmas precauções em relação ao risco aumentado de infecções (vacinação e profilaxia antibiótica) [16].

5.2.2. Defeitos das Enzimas Eritrocitárias

O glóbulo vermelho, de forma a cumprir todas as suas funções, tem que ter a capacidade de gerar energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP); manter a capacidade de redução, conseguindo uma redução contínua da metahemoglobina a hemoglobina e protegendo o GV das agressões oxidativas, através da produção de uma razão elevada de NADH:NAD (nicotinamida-adenina-dinucleótido) e de NADPH:NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), respectivamente; e manter uma elevada concentração de 2,3BPG (2,3 bisfosfoglicerato), um metabolito crucial para a regulação da afinidade da hemoglobina pelo oxigénio. Estes 4 compostos são compostos intermediários de duas importantes vias metabólicas do GV: a via glicolítica de Embden-Meyerhof e a via das pentoses fosfato (Figura 4). Para o funcionamento destas vias metabólicas são essenciais as enzimas glicolíticas intervenientes, que no caso de se encontrarem deficientes, serão causa de patologia [16,17]. É também importante que o metabolismo dos nucleótidos esteja íntegro para a manutenção dos nucleótidos de purina e pirimidina.

As enzimopatias relacionadas com as vias acima descritas estão geralmente associadas a estados de anemia hemolítica crónica, à excepção das enzimopatias da via das pentoses fosfato e do metabolismo do glutatião, que podem cursar com crises agudas de hemólise após exposição a substâncias oxidantes [17]

As duas patologias mais comuns deste grupo são o déficit de G6PD (desidrogenase da glicose-6-fosfato) e o déficit de PK (cinase do piruvato) que serão discutidas sucintamente.

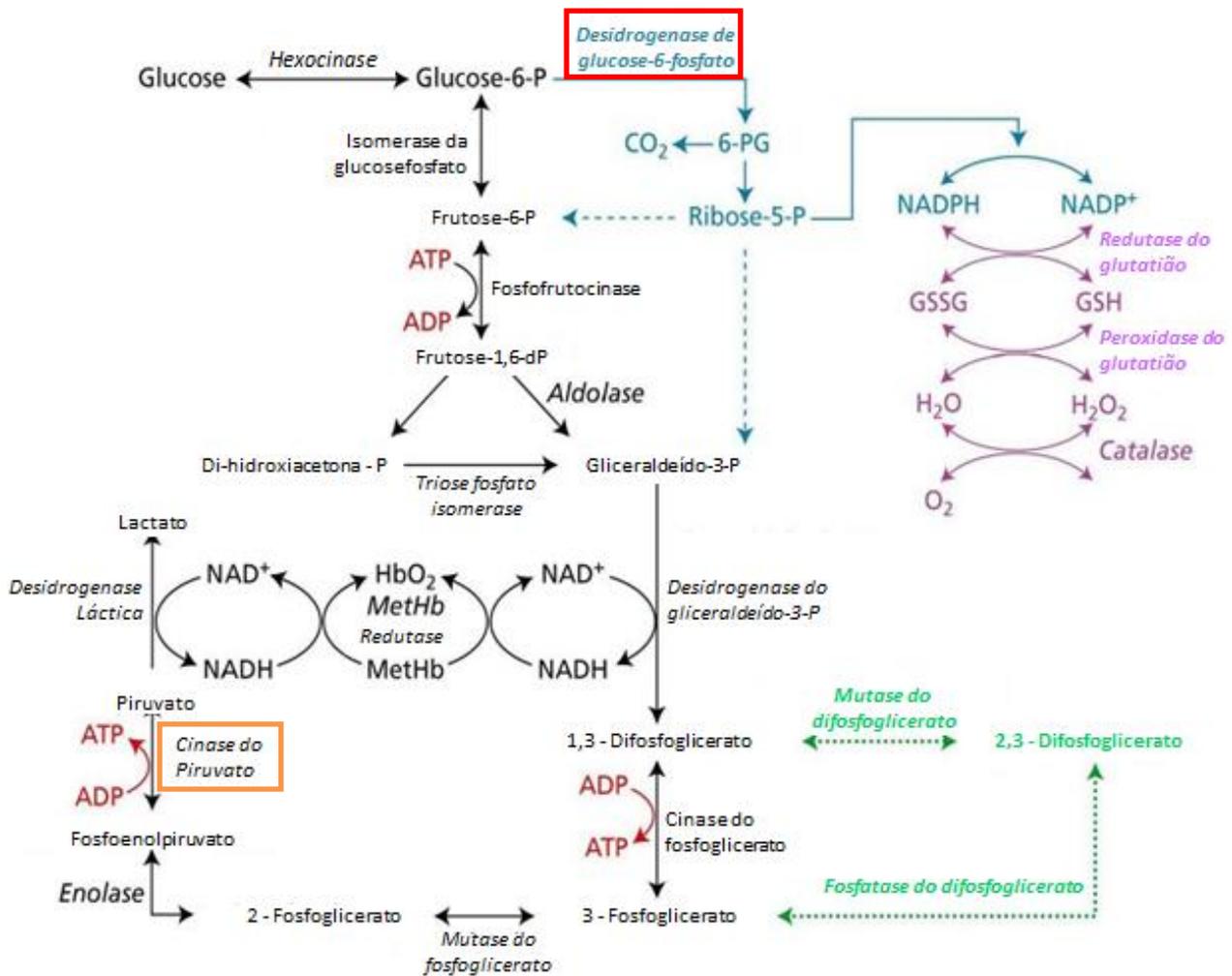


Figura 4: Via glicolítica de Embden-Meyerhof e as suas interações com a via da pentose fosfato e com o shunt Luebering-Rapoport. Adaptado de [10].

5.2.2.1. Déficit de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A G6PD (destacada com contorno vermelho na Figura 4) tem um papel importante na redução do NADP a NADPH, que é necessário para a produção do glutatião reduzido e, deste modo, o seu déficit origina um aumento da susceptibilidade do GV ao stresse oxidativo. A actividade da G6PD diminui à medida que o eritrócito vai envelhecendo, tendo uma semivida

de aproximadamente 60 dias. Os reticulócitos têm uma actividade enzimática 5 vezes superior à subpopulação de eritrócitos mais velhos [16].

O défice de G6PD é uma patologia comum, afectando cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo uma distribuição global muito semelhante à distribuição da malária (África, região mediterrânica, Médio Oriente e Ásia Subtropical), apoiando a hipótese que a patologia confere alguma resistência às complicações da infecção por *plasmodium*. No entanto, devido aos fenómenos de emigração, também é encontrada na América do Norte, América do Sul e Europa do Norte [14,17].

A doença tem um padrão de hereditariedade ligado ao cromossoma X, manifestando-se predominantemente em indivíduos do sexo masculino, podendo, no entanto, as mulheres heterozigóticas manifestar também a doença.

Foram identificadas mais de 300 variantes de G6PD e estas podem ser divididas em 3 categorias tendo em conta o tipo de hemólise que causam: variantes associadas a anemia hemolítica aguda intermitente (as variantes mais comuns, sendo algumas delas endémicas); variantes associadas a anemia hemolítica crónica (raras); variantes que não estão associadas ao risco de hemólise significativa (raras) [16]. As variantes mais prevalentes são a G6PD A- (encontrada nos africanos) e a GP6D Mediterrânica [14].

5.2.2.1.1. Manifestações Clínicas e Diagnóstico

As principais manifestações clínicas são anemia hemolítica aguda desencadeada por ingestão de fármacos, de favas, ou por infecções, e a icterícia neonatal. A anemia hemolítica pode ter gravidade variável, indo de moderada a grave com necessidade de transfusão. As crises agudas têm início um a três dias após o evento desencadeante e consistem em anemia, hemoglobinúria e icterícia. A hemoglobinúria que resulta de uma crise hemolítica despoletada

por ingestão de favas é comumente mais grave do que a que resulta da ingestão de fármacos ou da que é desencadeada por infecção, mas, geralmente, a concentração de bilirrubina é mais baixa. Até ao 7 a 8º dias após a suspensão do fármaco ainda se verifica um agravamento da anemia, constatando-se aproximadamente após o 12º dia, uma recuperação dos valores da hemoglobina. A hemoglobinúria pode provocar insuficiência renal aguda, principalmente em adultos. A icterícia neonatal é mais comum em indivíduos com défice de G6PD do que em indivíduos normais [14,16,17].

Uma pequena proporção de doentes pode apresentar anemia hemolítica crónica.

Laboratorialmente, e durante as crises agudas, é comum haver um aumento da contagem absoluta dos reticulócitos, da bilirrubina, da AST e da LDH, devido à hemólise. No esfregaço sanguíneo os achados inespecíficos como anisocitose e policromasia são frequentes, mas também podem ser observados corpos de Heinz que correspondem à precipitação da hemoglobina que é desnaturada devido à excessiva oxidação (“*bite-cells*”) [14,17].

O diagnóstico do défice de G6PD é baseado na detecção da metabolização de NADP a NADPH por análise espectrofotométrica quantitativa ou, mais convenientemente, por um teste de rastreio rápido por fluorescência [16]. Durante a crise aguda, ou imediatamente após a sua resolução, o teste de rastreio rápido pode dar um falso negativo, uma vez que há reticulocitose e uma população de GV mais jovens com actividade enzimática normal ou quase normal. Se se suspeitar fortemente de défice de G6PD, o teste deve ser repetido posteriormente, após resolução do episódio de hemólise [14].

5.2.2.1.2. Tratamento

O tratamento consiste na suspensão do agente etiológico do episódio de hemólise, nomeadamente fármacos ou favas. Na eventualidade de ter sido uma infecção a precipitar o

episódio hemolítico, deve tratar-se a mesma. Os doentes devem ser aconselhados sobre os fármacos e alimentos a evitar por poderem precipitar um episódio de anemia hemolítica aguda [14].

O suporte transfusional pode estar indicado quando a anemia é grave e sintomática [16].

5.2.2.2. Défice de Cinase do Piruvato

A cinase do piruvato (PK) (destacado com contorno laranja na Figura 4) é uma enzima reguladora da via glicolítica, responsável pela produção de ATP no eritrócito.

O défice de cinase do piruvato é a enzimopatia associada a anemia hemolítica crónica mais comum [17]. A prevalência estimada é de 51 casos por milhão na população caucasiana [17], sendo mais frequente em indivíduos do norte da Europa e da China [16].

É uma doença de hereditariedade autossómica recessiva e os indivíduos afectados podem ser homocigóticos para a mesma mutação, ou duplamente heterocigóticos para diferentes mutações. Existe uma correlação entre o local da mutação e a gravidade da doença. Já foram identificadas mais de 150 mutações diferentes [16].

5.2.2.2.1. Manifestações Clínicas, Diagnóstico e Terapêutica

O défice de PK está associado a anemia hemolítica crónica. A gravidade do processo hemolítico é muito variável, podendo ir, muito raramente, de anemia hemolítica dependente de transfusão desde o nascimento, a anemia hemolítica crónica de gravidade moderada a totalmente compensada. A anemia neste último grupo é geralmente bem tolerada, motivada por um desvio da curva de dissociação da hemoglobina para a direita, devido à acumulação de

2,3 BPG, um produto intermediário da via glicolítica, que diminui a afinidade da hemoglobina pelo O₂, fazendo com que o oxigénio se liberte mais facilmente para os tecidos [14].

Nas formas menos graves, manifesta-se desde a infância, com anemia, icterícia e esplenomegalia [14,16]. Os doentes com hemólise grave apresentam habitualmente icterícia crónica, podendo desenvolver complicações como cálculos biliares (normalmente na primeira década de vida e frequentemente assintomáticos), crises de anemia aplásica transitórias (associadas a infecção por parvovirus), défice de ácido fólico e, raramente, úlceras cutâneas [16].

Laboratorialmente os achados são os esperados numa situação de hemólise, com aumento da bilirrubina não conjugada, da LDH e dos reticulócitos. O esfregaço de sangue periférico apresenta achados inespecíficos como células pequenas, densas e espiculadas [14].

A suspeita clínica de défice de PK deve ser confirmada através de um teste enzimático quantitativo. Para a realização do teste é necessário remover os leucócitos da suspensão de eritrócitos antes de fazer o hemolisado destas células, uma vez que os leucócitos possuem 300 vezes mais actividade de cinase do piruvato do que os eritrócitos. Além disso, os leucócitos possuem uma isoenzima que tem actividade normal nos indivíduos com défice de PK. Na presença de um quadro clínico de anemia hemolítica crónica não esferocítica, deve ser considerada a existência de hemoglobina instável, pelo que é aconselhada a realização de um teste de instabilidade da hemoglobina [17].

Actualmente estes testes têm sido substituídos por testes de detecção da mutação específica da enzima no ADN_c (ácido desoxirribonucleico complementar) ou a nível genómico. É também pertinente fazer o estudo familiar do indivíduo afectado, uma vez que a maioria dos casos esporádicos da doença são heterozigóticos compostos, podendo esse estudo ajudar no diagnóstico [16]. Por outro lado, pode também oferecer-se a possibilidade aos pais da realização de diagnóstico pré-natal nas gravidezes subsequentes [14].

O tratamento vai depender da gravidade da anemia. É aconselhada a suplementação com ácido fólico em todos os doentes. Nos casos de maior gravidade com dependência transfusional associada a sobrecarga de ferro, deve ser realizada terapêutica de quelação do ferro. Deve considerar-se a hipótese de realizar uma esplenectomia, com as profilaxias já referidas anteriormente. Contudo, nos casos em que é possível, deve esperar-se até depois dos 3 anos de idade, quando a probabilidade de infecções por pneumococos, *Hemophilus influenza* e meningococos é menor [16].

Nos doentes com anemia moderada o suporte transfusional pode ser necessário, nomeadamente em situações infecciosas e de stresse fisiológico como a gravidez e no período pré-natal [14].

5.2.3. Distúrbios da Hemoglobina

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias da síntese das cadeias de globina, que incluem doenças em que há uma diminuição da produção das cadeias de globina (talassemias) e doenças em que se verifica uma alteração estrutural da cadeia de globina, resultando numa cadeia de hemoglobina estruturalmente anormal (variantes de hemoglobinas)[18].

As hemoglobinopatias são o distúrbio genético mais comum em todo o mundo, estimando-se que cerca de 7% da população seja portadora, sendo um problema *major* de saúde a nível mundial [19]. As hemoglobinopatias mais significativas e mais prevalentes são as talassemias e a doença de células falciformes. As talassemias ocorrem com maior frequência na região do Mediterrâneo, no Médio Oriente, no subcontinente Indiano e no Sudeste Asiático. Alguns estudos sugerem fortemente que existe uma associação entre a presença de um traço α ou β -talassémico e a protecção à infecção pelo *Plasmodium falciparum* em áreas em que este é ou foi endémico, explicando a elevada frequência de

portadores por selecção natural [20]. O gene das células falciformes está largamente distribuído em África, nas Caraíbas, região este da Arábia Saudita, região central e sul da Índia e no Mediterrâneo [14].

As síndromes talassémicas e as variantes de Hb podem ser herdadas ou causadas por mutações *de novo*, dominantes ou recessivas [21].

Existem vários genes responsáveis pela codificação das globinas, que estão localizados nos cromossomas 11 (*cluster* das globinas β) e 16 (*cluster* das globinas α).

As hemoglobinopatias podem ser classificadas primariamente em talassemias (distúrbios quantitativos) e variantes de hemoglobinas (distúrbios qualitativos). As talassemias podem, posteriormente, ser classificadas com base no gene envolvido (α e β talassemias). Estas podem ainda ser subdivididas em α^+ , β^+ ou α^0 , β^0 , consoante existe alguma síntese de globina (+), ou se não há produção da globina correspondente (0), resultante da mutação presente [21]. De acordo com a clínica, as β -talassemias podem ser divididas em β -talassemia *major* (anemia severa dependente de transfusões), β -talassemia *minor* (assintomático) e β -talassemia *intermedia* (com características intermédias) [22].

Por serem as doenças de maior relevo dentro das hemoglobinopatias e por uma das suas consequências ser a anemia hemolítica, a α -talassemia, a β -talassemia e a doença de células falciformes serão brevemente discutidas.

Além das doenças já referenciadas, existe ainda outro grupo de hemoglobinopatias que podem cursar com anemia hemolítica que são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Outras hemoglobinopatias que podem cursar com anemia hemolítica.

Adaptado de [18].

Tipo de hemoglobinopatia	Características do sangue periférico	Testes de diagnóstico necessários
Hemoglobina C homozigotia ou heterozigotia composta para HbC e β talassemia	Células em alvo e células irregularmente contraídas, hipocromia e microcitose variáveis, por vezes cristais de HbC; VCM e HCM por vezes reduzidos	CLAR, electroforese capilar ou CAM
Hemoglobinas instáveis	Células irregularmente contraídas, queratócitos, macrocitose, policromasia; VCM pode estar aumentado e diminuição do CHCM	CLAR, electroforese capilar ou CAM, teste de instabilidade por calor ou teste de instabilidade de isopropanol, preparação de corpos de Heinz (positivo em episódios agudos de hemólise, principalmente em esplenectomizados); análise de ADN ou espectrometria de massa

CLAR, cromatografia líquida de alta resolução; CAM, electroforese em membrana de acetato de celulose em pH alcalino.

5.2.3.1. α -talassemia

Em indivíduos normais, a síntese da globina α é regulada por quatro genes, dois em cada cópia do cromossoma 16 [23]. As síndromes α -talassémicas são normalmente causadas pela deleção de um ou mais genes de α -globina, sendo classificadas de acordo com o número de genes que são delectados ou mutados. A diminuição da produção de α -globina é directamente proporcional ao número de genes delectados [24]. Assim, a deleção de um gene corresponde a α^+ -talassemia; dois genes delectados no mesmo cromossoma, ou uma cis-delecção, originam α^0 -talassemia; três genes delectados corresponde à doença por HbH (β_4); se os quatros genes estiverem delectados, ocorre hidrópsia fetal por Hemoglobina de Bart (γ_4) [25].

Como resultado destas mutações, há uma diminuição dos tetrâmeros funcionantes de hemoglobina, uma vez que a α -globina é necessária à produção de Hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), Hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e Hemoglobina Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), importante no desenvolvimento fetal [26].

5.2.3.1.1. Manifestações Clínicas, Diagnóstico e Tratamento

As manifestações clínicas da maioria dos indivíduos com α -talassemia são muito ligeiras, e podem não ser notadas ao longo da vida, a menos que um hemograma de rotina seja analisado [23].

A deleção de um ou de dois genes é clinicamente assintomática, apesar de estar associada a diferentes graus de microcitose e anemia [24]. A α^0 -talassemia está associada a anemia microcítica hipocrômica ligeira, sem hemólise [25].

A doença da Hemoglobina H ocorre nos indivíduos que têm 3 genes delectados, sendo que estes produzem menos de 30% da quantidade normal de α -globina [23]. Estes doentes têm um aumento da hemólise, anemia ligeira a moderada (8,1-11,1 g/dL) e microcitose e hipocromia marcadas (VCM de 62-67fL e HCM de 19pg) [24]. A hemólise ocorre devido a um excesso de acumulação de subunidades de β -globinas que se associam em tetrâmeros β (Hemoglobina H). A HbH é relativamente instável e vai precipitando à medida que o eritrócito envelhece, formando corpos de inclusão que danificam a célula e diminuem a sua semivida [25]. É frequente haver esplenomegália, icterícia e colelitíase (15-34%) secundária à hemólise. Os níveis de hemoglobina podem descer abruptamente, mais comumente em crianças, em contexto infeccioso, em estados febris ou por exposição a agentes oxidantes [23,24]. A anemia pode ainda surgir devido a uma aplasia eritróide transitória induzida por vírus, nomeadamente por parvovírus. Por aumento da absorção intestinal de ferro, estimulada

pelo aumento da eritropoiese e da hemólise, os doentes adultos podem desenvolver sobrecarga de ferro [24]. As formas não delecionais da doença condicionam um quadro clínico mais grave do que os da forma, mais comum, delecional [23].

A Hidrósia Fetal por Hemoglobina de Bart é a forma mais grave de α -talassemia, sendo normalmente fatal durante a fase tardia da gravidez (23-38 semanas) ou pouco depois do nascimento [23,25]. A principal hemoglobina do feto ($\alpha_2\gamma_2$) está ausente por não existir síntese de α -globina. O feto passa então a ter HbBart (γ_4) (80% da hemoglobina do feto) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) [24]. A Hb Portland é a única hemoglobina funcional que o feto possui, permitindo a sua sobrevivência até ao terceiro trimestre de gestação. A Hb Bart não é eficiente como transportadora de oxigénio, apresentando uma elevada afinidade pelo oxigénio, não o libertando nos tecidos em condições fisiológicas, pelo que surge hidrósia fetal resultante da hipoxia grave [24,25]. Durante a gravidez dos fetos com Hb Bart podem surgir complicações tais como hipertensão induzida pela gravidez, toxemia, hemorragia anteparto, prematuridade e sofrimento fetal [24].

A suspeita diagnóstica de α -talassemia baseia-se em factores como a presença de anemia microcítica e hipocrómica com ferritina normal, história familiar de anemia e pela etnicidade dos doentes, principalmente se estes forem originários de locais como o Médio Oriente, Norte de África e Sudeste Asiático[27]. A investigação diagnóstica, nestes casos, deve então incluir um hemograma completo com estudo do ferro, cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) ou electroforese da hemoglobina e, eventualmente, medição da razão de α/β -globinas, sendo que este último método pode ser substituído pela análise de ADN [21,23].

A α^0 -talassemia e a α^+ -talassemia não necessitam de tratamento específico a menos que os doentes apresentem anemia, no entanto é necessário excluir um eventual défice nutricional de ferro como causa da anemia [23,27].

O tratamento da doença HbH passa pela suplementação com ácido fólico [27] e por transfusões sanguíneas periódicas, principalmente durante intercorrências infecciosas e por vezes durante a gravidez [23,24,27]. A necessidade crónica de transfusões não é comum mas, em formas mais graves da doença, pode ser necessário, mesmo a partir da infância. Em algumas situações, devido à gravidade da hemólise e da esplenomegalia, é necessário recorrer à esplenectomia [23,27].

A maioria das gravidezes em que se sabe que o feto tem síndrome de Hidrósia Fetal por Hemoglobina de Bart são interrompidas [23]. Nos últimos anos, foram reportados casos de crianças com esta síndrome que foram transfundidos logo após o nascimento ou que receberam transfusões intra-uterinas, e sobreviveram. Estas crianças continuam a ser tratadas com transfusões regulares e são bons candidatos para transplante de células progenitoras hematopoiéticas [23,24].

5.2.3.2. β -talassemias

As síndromes β -talassémicas são caracterizadas por diminuição ou ausência da produção de β -globinas, que resultam numa diminuição da quantidade de hemoglobina nos eritrócitos, diminuição da produção de eritrócitos e anemia [22].

Estima-se que 1,5% da população global seja portadora de β -talassemia e que nasçam 60000 crianças sintomáticas por ano, predominantemente em países em vias de desenvolvimento. A β -talassemia é prevalente nos países mediterrânicos, no Médio Oriente, na Ásia Central, na Índia e na região do sudeste chinês [20,22].

A síntese de β -globinas é controlada por dois genes β , um em cada cromossoma 11 e, como já foi referido, podem ser classificadas em β^0 -talassemia, quando há ausência de produção de β -globinas, ou em β^+ -talassemia quando há uma diminuição marcada da produção

de β -globinas [25]. Indivíduos com uma mutação β -talassêmica e um gene de β -globina normal têm traço β -talassêmico [14].

Apesar da heterogeneidade molecular marcada da β -talassemia, o fenótipo clínico destas doenças é bastante homogêneo, devido à base fisiopatológica da doença [25]. Assim, a síntese de cadeias de β -globinas é insuficiente para emparelharem com as cadeias de α -globina de modo a formar a HbA. As α -globinas ficam então em excesso e acabam por precipitar nos precursores eritróides na medula óssea, levando à sua destruição prematura e a eritropoiese ineficaz [20,22,25].

Os três fenótipos clínicos são a β -talassemia *major*, *intermedia* e *minor* e estão associados a mais de 200 mutações diferentes [20,22].

5.2.3.2.1. Manifestações Clínicas

5.2.3.2.1.1. β -talassemia *Major*

É a forma de apresentação das formas homozigóticas ou heterozigóticas compostas da mutação [25,27], e caracteriza-se por anemia grave ($<7\text{g/dL}$) hipocrômica ($\text{CHM}<20\text{pg}$) e microcítica ($\text{VCM}<70\text{fL}$), dependente de transfusões, condicionada por uma marcada ineficácia da eritropoiese, e que se manifesta entre os 6 e os 24 meses de idade [20,25]. Os doentes apresentam baixo crescimento ponderal, recusa alimentar, diarreia, crises febris recorrentes, irritabilidade e hepatoesplenomegália, que condicionam aumento progressivo do abdómen [20,22,27]. A talassemia *major* é caracterizada por atraso de crescimento e da maturação sexual, palidez, icterícia, diminuição da massa muscular, hepatoesplenomegália, úlceras dos membros inferiores e alterações esqueléticas resultantes da expansão medular, características da doença (deformidades dos ossos longos dos membros inferiores, bosseladura do crânio, proeminência malar, hipertrofia da maxila, depressão da cartilagem do

septo nasal e tendência para a presença de epicanto) [22]. Na ausência de tratamento ou se fizerem uma terapêutica parcial, estes doentes morrem na primeira ou segunda década de vida [20].

5.2.3.2.1.2. β -talassemia *Intermedia*

A talassemia *intermedia* manifesta-se mais tardiamente que a talassemia *major*, por volta dos 2 aos 6 anos [20]. Os doentes apresentam anemia hemolítica moderada a grave (Hb 7-10g/dL), parcialmente compensada, com VCM de 50-80fL e HCM entre 16 e 24pg, que não necessita de transfusões crônicas [20,22,25]. Tem um espectro clínico que varia desde doentes que sobrevivem sem transfusões sanguíneas periódicas, mas com atraso do desenvolvimento e crescimento, a doentes que são assintomáticos até à idade adulta, altura em que manifestam anemia ligeira [22]. Estes doentes podem também apresentar sintomas relacionados com a eritropoiese extramedular e com a hipertrofia medular, como compressão da medula vertebral com paraplegia, deformidades ósseas e da face, osteoporose, fracturas patológicas dos ossos longos e massas eritropoiéticas [20,22]. Também têm maior predisposição para desenvolver úlceras dos membros inferiores e para eventos tromboembólicos que os doentes com talassemia *major*, principalmente se forem esplenectomizados. Devido à hemólise, é comum apresentarem esplenomegália e colelitíase. Pode haver compromisso cardíaco devido ao estado de alto débito e à hipertensão pulmonar [22].

5.2.3.2.1.3. β -talassemia *Minor*

Os portadores de beta-talassemia *minor* são frequentemente assintomáticos. Podem ter anemia microcítica e hipocrômica ligeira, que não compromete a sua qualidade de vida [20,22,27].

5.2.3.2.2. Diagnóstico

Perante uma anemia microcítica e hipocrômica, após excluída sideropenia, deve suspeitar-se de uma hemoglobinopatia. A β -talassemia *major* deve ser uma hipótese de diagnóstico a colocar perante uma criança, de origem étnica apropriada, que desenvolve este tipo de anemia, icterícia e hepatoesplenomegalia, antes dos dois de idade. Deve suspeitar-se de β -talassemia intermédia em crianças mais velhas, também de origem étnica apropriada, com características clínicas semelhantes, mas mais ligeiras [18,22].

A partir do momento em que há suspeita clínica, deve fazer-se um hemograma completo, esfregaço sanguíneo, seguido da aplicação de uma técnica primária de diagnóstico como a CLAR, ou electroforese em membrana de acetato de celulose ou electroforese capilar, com quantificação de HbF e HbA₂ [18]. Na β -talassemia *major* a HbA está ausente, ou presente numa pequena percentagem, a HbF constitui cerca de 92 a 95% da Hb total e a HbA₂ é variável. Na β -talassemia intermédia é identificada uma pequena percentagem de HbA (maior que na talassemia *major*), estando também presente HbF em grandes quantidades (70 a 90%) e a HbA₂. Na talassemia *minor* a HbA₂ é superior a 3,2% [18,22]. Em ambos os casos é necessário estudar os pais da criança e, no caso de ambos serem heterozigóticos para a mutação, fazer o aconselhamento em relação a futuras gravidezes [18,20,22]. No esfregaço de sangue periférico podem encontrar-se várias alterações morfológicas dos eritrócitos como hipocromia, microcitose, poiquilocitose, anisocitose e eritrócitos nucleados. A quantidade de eritrócitos nucleados está relacionada com a gravidade da anemia e estão mais elevados após esplenectomia [22].

5.2.3.2.3. Tratamento

O tratamento da β -talassemia *major* assenta na terapia transfusional regular acompanhado de uma terapêutica de quelação do ferro eficaz [19,20,22,27]. O objectivo das

transfusões é a correcção da anemia, supressão da eritropoiese e inibição da absorção intestinal de ferro [22]. As transfusões devem ser iniciadas quando há anemia grave (Hb <7g/dL), excluindo outras causas que contribuam para a anemia [22,27], com o objectivo de atingir valores de Hb entre 13 e 14g/dL pós-transfusão, de modo a manter valores basais de 9 a 10 g/dL [20]. A terapêutica curativa da β -talassemia *major* é o transplante de células progenitoras hematopoiéticas, se for encontrado um dador compatível [19,20,22,27]. Há que ter em conta também a terapêutica das complicações, tanto da doença, como da terapêutica, nomeadamente a sobrecarga de ferro, que tem como consequência complicações multiorgânicas. Tanto na β -talassemia *major* como na β -talassemia *intermedia* há, em algumas situações, a necessidade de submeter o doente a uma esplenectomia. O objectivo desta é proteger contra os efeitos da hematopoiese extramedular ao aumentar os níveis de Hb, ao diminuir a necessidade de transfusões e, conseqüentemente, diminuir a sobrecarga de ferro [27]. Em doentes com β -talassemia *major*, a esplenectomia está indicada se forem necessários mais de 200mL/kg de concentrado eritrocitário num ano para manter uma concentração de Hb superior a 10g/dL, assumindo que não existem outras razões para o aumento do consumo de glóbulos vermelhos. Outras indicações incluem, tanto nas *major* como nas *intermedia*, leucopenia, trombocitopenia e sobrecarga de ferro que persiste mesmo com o tratamento [20].

A terapêutica da β -talassemia *intermedia* é sintomática [22] e pode também incluir transfusões sanguíneas regulares, sendo avaliada a sua necessidade em cada caso [19,20]. A terapia de quelacão do ferro é não só necessária devido à sobrecarga de ferro que advém das transfusões, mas também por um aumento da absorção de ferro ao nível do tracto gastrointestinal, por eritropoiese ineficaz [20,22,27].

A β -talassemia *minor* não tem tratamento específico e devem ser evitados os suplementos de ferro, a menos que haja um défice de ferro concomitante [19,20,27]. As

grávidas com β -talassemia *minor* podem necessitar de suplementação com ácido fólico e transfusões sanguíneas, usualmente no terceiro trimestre de gravidez [27].

5.2.3.3. Anemia de Células Falciformes

Nascem cerca de 250 000 crianças com doença de células falciformes por ano, sendo que a maioria é originária do continente africano, apesar de, com os fenômenos de emigração, esta se ter tornado também comum nos Estados Unidos da América e na Europa [28]. A doença tem maior prevalência em africanos negros, negros da região das Caraíbas e britânicos negros, embora também seja prevalente no Médio Oriente, Índia e subcontinente indiano [29].

A hemoglobina S (HbS) resulta da substituição de um aminoácido, o ácido glutâmico por valina, no 6º resíduo da subunidade de β -globina: $\beta^6\text{-Glu}\rightarrow\text{Val}$. Esta condição é transmitida de forma autossômica recessiva [25].

O termo “doença de células falciformes” refere-se tanto à anemia de células falciformes (homozigotia para o alelo HbS, doença da hemoglobina SS), como a estados heterozigóticos compostos, como a doença da hemoglobina SC e a S β -talassemia, isto é, quando são herdadas duas hemoglobinas anormais, em que pelo menos uma é a HbS, deixando fora desta definição a heterozigotia para HbS, também chamado traço falciforme, que não apresenta anomalias clínicas [14,18,28].

A HbS polimeriza quando é desoxigenada, distorcendo a morfologia do eritrócito que assume a característica forma em foice ou crescente alongado [14,25,28]. A reação de polimerização, e conseqüente falciformação, é irreversível com a reoxigenação da hemoglobina. Os ciclos repetidos de falciformação danificam a membrana dos eritrócitos, levando a alterações da permeabilidade e a desidratação celular que causam uma destruição prematura das células (semivida de 16-20 dias [29]). Por outro lado, as células falciformes são rígidas, aumentando a viscosidade sanguínea e obstruindo o fluxo sanguíneo capilar,

causando hipoxia tecidual [14,25]. Além da rigidez, há também todo um enquadramento complexo de inflamação crónica, com libertação de grandes concentrações de mediadores de inflamação e radicais livres, que contribuem para a alteração do fluxo sanguíneo e para a agressão tecidual [29]. Existem ainda situações que precipitam a falciformação: infecções, febre, situações de hipoxia, desidratação e exposição ao frio [14,28].

Clinicamente, as formas mais graves da doença são a HbSS e HbSβ [14,28,29].

5.2.3.3.1. Manifestações Clínicas

A clínica da doença é muito variável, sendo que uma minoria tem uma forma da doença com poucas complicações, uma maioria tem formas intermédias e outra minoria tem formas graves da doença com complicações graves. A sobrevivência nas formas mais ligeiras pode ir até aos 60 ou 70 anos, enquanto nas formas mais graves há lesão orgânica substancial e morte precoce [28]. Os sintomas não são comuns antes dos 6 meses de idade, devido à elevada concentração de HbF, que reduz a polimerização da HbS [14].

As principais características da doença são a anemia hemolítica crónica, com uma Hb de 60 a 90g/dL (na doença HbSS), as crises agudas de dor (nas crianças e jovens ocorre com maior frequência nos ossos das mãos e pés – dactilite – e nos adultos ocorre mais comumente nos ossos longos, coluna vertebral e região pélvica) devido à isquémia tecidual e inflamação aguda por vasocclusão [14,28,29]. As crises de dor são responsáveis por mais de 90% das hospitalizações em doentes adultos com doença de células falciformes [28]. A síndrome torácica aguda, definida como dor torácica, hipoxia, febre, tosse e taquipneia e/ou dispneia e o aparecimento de um infiltrado pulmonar de novo na radiografia torácica, é a segunda causa mais comum de hospitalização nestes doentes [14]. Outras possíveis manifestações clínicas da doença estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Manifestações Clínicas da Doença de Células Falciformes. Adaptado de [14,28–30].

Sistema	Manifestação Aguda	Manifestação Crônica
Sistema Nervoso Central	AVC (isquêmico ou hemorrágico)	Doença de Moyamoya Migraine
Olho	Hemorragia do vítreo Descolamento da retina	Retinopatia proliferativa
Sistema Cardio-pulmonar	Síndrome torácica aguda	Hipertensão pulmonar
Sistema Hepatobiliar	Hepatopatia	Colelitíase Hepatopatia
Sistema Geniturinário	Necrose papilar renal Priapismo Nefropatia	Enurese noturna Proteinúria Nefropatia Necrose papilar renal
Sistema Musculosquelético	Osteomielite	Necrose avascular (cabeça do fêmur, ossos longos) Osteomielite
Pele		Úlceras
Outro	Sequestro esplênico Crise aplásica Défices de crescimento e atraso pubertário Maior susceptibilidade a infecções	

5.2.3.3.2. Diagnóstico

Atualmente, há países que têm testes de rastreio para esta doença, que são aplicados a bebês originários de populações em que a prevalência da mutação é elevada [18,28,29]. Estudos observacionais estabeleceram que o rastreio neonatal leva a uma diminuição significativa da morbidade e da mortalidade [28]. Nos casos em que o rastreio não é realizado, o diagnóstico é feito quando o doente apresenta uma complicação da doença [18,28,29] ou incidentalmente em exames pré-operatórios [29].

Quando um doente se apresenta com clínica suspeita de doença de células falciformes (crises agudas de dor, dactilite, sequestro esplênico, crises aplásicas devido a infecção por

parvovírus), a investigação diagnóstica deve prosseguir com um hemograma completo, esfregaço de sangue periférico, um teste de solubilidade falciforme (apenas nos casos urgentes) e um teste confirmatório como a CLAR, electroforese em membrana de acetato de celulose ou electroforese capilar [18].

5.2.3.3.3. Tratamento

As complicações da doença de células falciformes começam nos primeiros anos de vida, pelo que é importante iniciar medidas terapêuticas desde cedo, de forma a melhorar a qualidade de vida dos doentes e prolongar a sua sobrevivência. Devem ser sujeitos com regularidade, a exames complementares de diagnóstico como hemograma, testes de função renal e hepática, ecografia transcraniana com Doppler, ecocardiograma e ecografia hepática [28].

A abordagem destes doentes deve incluir a educação dos pais e dos doentes sobre as complicações da doença e como as reconhecer precocemente; profilaxia com penicilina e imunização para pneumococos; terapêutica das crises dolorosas; programas de rastreio de forma a detectar lesões nos diferentes órgãos precocemente; terapêutica com hidroxiureia, transfusões sanguíneas e transplante de células estaminais [31].

A hidroxiureia é considerada um agente modificador da doença, actualmente usado eficazmente em adultos e crianças, que condiciona um aumento da síntese de HbF [14,31]. Clinicamente, este agente diminui as crises dolorosas, a frequência da síndrome torácica aguda, a necessidade de transfusões [14,28,31], reduz o número de hospitalizações [28,31] e a mortalidade da doença [14,28,31].

A terapia das crises dolorosas é um desafio, deve ser agressiva e baseia-se em hidratação, oxigenação, uso de analgésicos (paracetamol, AINE's [Anti-Inflamatórios não

Esteróides] e opióides) e terapêuticas não farmacológicas [31], procurando sempre a causa e tendo em conta as suas possíveis complicações [14,28].

O único tratamento curativo é o transplante de células estaminais [14].

5.3. Anemias Hemolíticas Adquiridas

5.3.1. Hemoglobinúria Paroxística Nocturna

A Hemoglobinúria Paroxística Nocturna (HPN) é uma doença da célula estaminal hematopoiética, que resulta da expansão clonal não maligna de uma ou mais células progenitoras hematopoiéticas que têm uma mutação somática adquirida do gene *PIGA* do cromossoma X [32–35]. É uma doença que afecta além dos eritrócitos, os granulócitos, monócitos, plaquetas e linfócitos [35].

A HPN é uma doença rara, com uma prevalência global que ronda os 1 a 5 casos por milhão, independentemente da etnia [36], em que homens e mulheres são igualmente afectados, com idade média de 40 anos à altura do diagnóstico. No entanto, os doentes com anemia aplásica adquirida têm um risco de 20 a 30% de desenvolver HPN [32].

A partir do diagnóstico a sobrevivência média é de 10 a 15 anos e factores como trombose, pancitopenia grave, evolução para Síndrome Mielodisplásica (SMD) ou leucemia, idade avançada ou trombocitopenia ao diagnóstico conferem mau prognóstico [32].

5.3.1.1. Fisiopatologia

O gene *PIGA*, mutado na HPN, é necessário para a síntese de Glicosilfosfatidilinositol (GPI). A GPI funciona como âncora que liga várias glicoproteínas de superfície celular à membrana celular. Estas glicoproteínas podem ter várias funções, podendo ser antigénios de grupos sanguíneos, proteínas que regulam o sistema complemento, enzimas e moléculas de

adesão [32]. Duas das proteínas mais importantes na fisiopatologia da doença são o CD55 e o CD59, sendo os principais reguladores da actividade do complemento na membrana eritrocitária [32–35]. O sistema complemento faz parte da imunidade inata, sendo o seu principal efector, e a sua activação, realizada através de uma cascata complexa, resulta na produção de anafilatoxinas, quimiotaxinas e do Complexo de Ataque à Membrana (CAM) [34]. Existem três vias de activação do complemento, que convergem para a clivagem de C5 em C5a, que são a via clássica (faz parte da imunidade adquirida), a via da lectina e a via alternativa (Figura 5) [34,35]. A via alternativa do complemento está num estado de activação contínua e pode ser dividida em dois componentes funcionais, a amplificação das C3 e C5 convertases e a CAM [35]. Uma vez que a via alternativa do complemento está sempre activa, os mecanismos de reconhecimento e protecção do hospedeiro contra a lesão mediada por esta via foram evoluindo. Os eritrócitos estão protegidos da citólise provocada pela activação do complemento pela via alternativa principalmente pelo CD55 e pelo CD59 [35]. O CD55 também chamado Factor Acelerador de Degradação, é responsável pela regulação da actividade da C3 e C5 convertases, acelerando a sua taxa de destruição. Isto vai levar a uma inibição da activação do complemento. O CD59, ou Inibidor da Lise da Membrana, previne a formação do Complexo de Ataque à Membrana por bloquear a agregação de C9 a C5b-8. Assim, o CD59 inibe a função citolítica do complemento [32–34]. Das duas proteínas, o CD59 é mais importante na protecção das células do complemento. Devido à mutação no gene *PIGA*, os eritrócitos HPN são mais vulneráveis à lise mediada pelo complemento, uma vez que há uma redução, ou mesmo ausência, de CD59 e CD55 [32]. A activação do complemento, mais especificamente da via alternativa do complemento, leva então a hemólise intravascular, que por sua vez provoca a anemia hemolítica crónica, uma das manifestações características da doença [32,34,35].

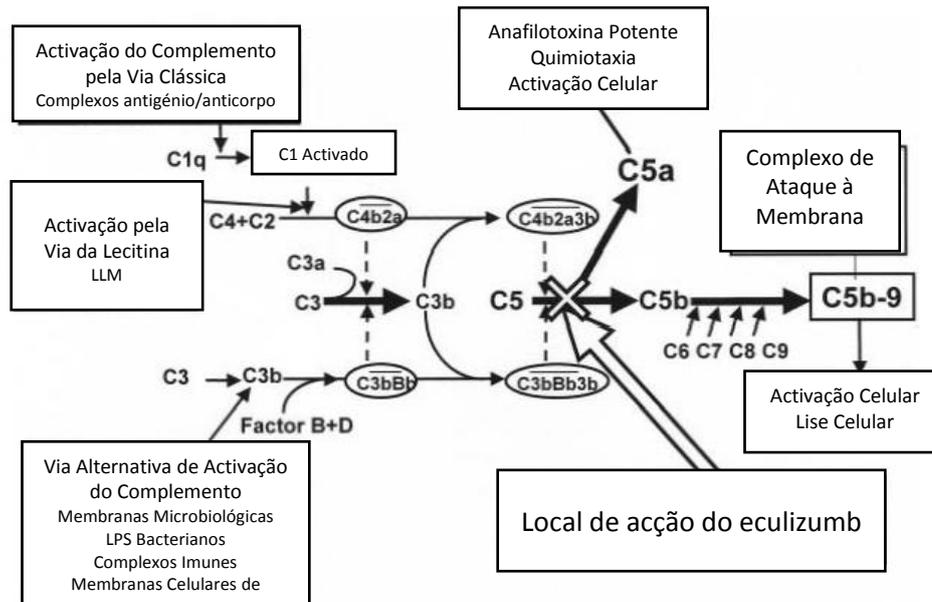


Figura 5: Ativação do Sistema Complemento e local de ação do eculizumab.

Adaptado de [34].

A HPN é caracterizada por mosaicismos, havendo um mosaico de células normais e anormais no sangue periférico, e, por outro lado, nas células anormais, que derivam de um clone com mutação no gene *PIGA*, há um mosaicismos fenotípico baseado no genótipo *PIGA* que determina o grau de déficit de proteínas ancoradas por GPI [32,35]. Assim, as células podem ter três fenótipos: células tipo I, que têm uma expressão normal de proteínas ancoradas por GPI; células tipo II, que têm uma expressão intermédia de proteínas ancoradas por GPI; células tipo III, que não têm expressão de proteínas ancoradas por GPI [32]. Os doentes podem apresentar células do tipo I e III (fenótipo mais comum), células do tipo I, II e III (segundo fenótipo mais comum), ou podem apresentar células do tipo I e II (fenótipo menos comum). A clínica é determinada pelo tamanho do clone mutado (definido pela percentagem de neutrófilos deficientes em proteínas ancoradas por GPI através de análise por citometria de fluxo), pelo fenótipo dos eritrócitos HPN [32,33,35], pelo grau de insuficiência da medula óssea associado [32,33] e pelo grau de ativação do complemento[32]. Os doentes que

apresentam clones pequenos no sangue periférico têm poucos sintomas ou são assintomáticos, enquanto os que têm clones grandes têm hemólise crônica e respondem bem à terapêutica inibitória do complemento [35]. Por outro lado, os eritrócitos com fenótipo III são mais susceptíveis à lise do que os eritrócitos do tipo II e constituem, quase sempre, uma grande percentagem das células HPN. Assim, os doentes com uma grande percentagem de células do tipo II tendem a ter mais hemólise do que os doentes com uma maior percentagem de células do tipo I ou do tipo III [32].

Alguns autores propõem que, para se desenvolver a doença, a mutação no gene *PIGA* é necessária, mas não suficiente. Assim, serão necessárias duas condições para que se desenvolva a doença: a existência de um clone com déficit de GPI que deriva de uma célula hematopoiética multipotente; ocorrência de um evento que leva à expansão de um clone de HPN, em vez da hematopoiese normal, ou seja, uma vantagem relativa de crescimento para as células HPN [34,36].

Há uma associação entre a HPN e a anemia aplásica adquirida [32,33], havendo estudos que demonstram que, em mais de 70% dos doentes com anemia aplásica adquirida, são encontrados clones ligeiros a moderados de HPN [32]. Além disso, todos os doentes com HPN têm evidência de disfunção da medula óssea [33].

Apesar de a HPN não ser uma doença maligna, há um risco aumentado de transformação clonal nestes doentes, nomeadamente para leucemia mielóide aguda e para síndrome mielodisplásica [32].

5.3.1.2. Manifestações Clínicas

A HPN é caracterizada por uma tríade de manifestações clínicas, que são a hemólise intravascular, os eventos tromboembólicos e a insuficiência medular, embora possam não estar presentes em todos os doentes [33,36].

A hemólise intravascular é responsável pelas crises paroxísticas de hemoglobinúria, normalmente à noite, que dão o nome à doença, mas que são encontradas em apenas uma minoria dos doentes [32,33]. Normalmente a hemólise é crónica, devido à activação espontânea do complemento, com exacerbações (os paroxismos), que resultam de uma activação maciça do complemento, normalmente devido a um evento precipitante, como uma infecção [36]. Devido à hemólise crónica, os doentes apresentam os sintomas característicos da anemia (astenia, fraqueza, palidez e dispneia de esforço) e, em doentes com hemólise proeminente, a astenia pode ser desproporcional ao grau de anemia. A morfologia dos eritrócitos pode ser normal, podendo haver macrocitose ligeira, havendo casos em que há poiquilocitose e anisocitose ligeira a moderada. Além disso, é também comum haver trombocitopenia e/ou neutropenia [32]. Laboratorialmente encontra-se elevação da LDH, podendo chegar a valores dez vezes superiores ao normal, aumento da bilirrubina não conjugada, aumento das aminotransferases [36] e diminuição da haptoglobina [32]. Os valores de hemoglobina podem variar de normais até gravemente diminuídos e a contagem de reticulócitos é normalmente elevada, mas mais baixa do que era de esperar para o grau de anemia. [32]. A contagem de reticulócitos depende da função medular do doente e, conseqüentemente, o grau de anemia também depende dessa mesma função, entre outros factores [36].

Devido à hemólise intravascular, há uma libertação de grandes quantidades de hemoglobina livre no plasma. Essa hemoglobina livre tem uma afinidade 10^6 vezes superior para o NO do que para o oxigénio, incorporando grande parte desse composto presente no plasma [34]. Disto resultam sintomas como astenia, dor abdominal e espasmo esofágico, que resultam da disfunção do músculo liso, devido a distúrbios do metabolismo do NO [34], disfunção eréctil e possivelmente trombozes [32].

Os eventos tromboembólicos são os que têm maior morbidade (40% dos doentes [32,36]) e mortalidade na HPN [32,33,36], sendo uma das complicações mais temidas da doença. Os doentes com uma elevada percentagem de células HPN e que têm sintomas clássicos (anemia hemolítica e hemoglobinúria) têm uma maior predisposição aos eventos tromboembólicos do que os doentes com uma pequena percentagem de células HPN [32]. A fisiopatologia do tromboembolismo na HPN ainda não está bem esclarecida. No entanto, existe evidência de que há envolvimento das plaquetas com défice de GPI, que são activadas pelo complemento mais facilmente do que as plaquetas normais [34]. Além disso, também a falta do receptor da urocinase, que é uma proteína ancorada a GPI, nas células HPN pode perturbar a fibrinólise [32]. Os episódios tromboembólicos são predominantemente venosos [32,33] sendo mais frequentes nas veias abdominais, veias cerebrais e dos membros, podendo também ocorrer a nível pulmonar e arterial, embora sejam apresentações raras [32,33,36]. A recorrência dos episódios de trombose é comum. A trombose da veia hepática (Síndrome de Budd-Chiari) é muito comum na HPN e manifesta-se por dor abdominal, icterícia, ascite, hepatomegalia e aumento ponderal [32]. O processo trombótico afecta, inicialmente, pequenas veias, mas progressivamente, vai afectando veias de maior calibre, com o desenvolvimento de manifestações graves como hemorragias de varizes, icterícia, ascite e insuficiência hepática [36]. A trombose da veia porta também é comum na HPN e manifesta-se por náuseas, vómitos, dor abdominal e disfunção hepática [32].

Uma elevada percentagem de doentes com HPN pode apresentar alterações renais, nomeadamente da função tubular e declínio da clearance da creatinina [32]. Pode ocorrer insuficiência renal aguda após as crises hemolíticas, como resultado da hemoglobinúria maciça, que tende a resolver espontaneamente após alguns dias ou semanas [32]. As alterações renais são consequência da intensa deposição de hemossiderina nos túbulos proximais ou devido a fenómenos trombóticos na microcirculação renal [32,36].

Radiologicamente os doentes podem exibir rins com dimensões aumentadas, com enfartes corticais, diminuição da espessura cortical e necrose papilar [32].

As infecções são também comuns devido à neutropenia e ao condicionamento funcional dos neutrófilos [36].

5.3.1.3. Diagnóstico

A HPN deve ser suspeitada em doentes que apresentem anemia ligeira a grave com parâmetros laboratoriais que indiquem que existe uma anemia hemolítica não imune (teste de Coombs negativo, aumento da LDH, reticulocitose, aumento da bilirrubina). A presença de haptoglobina muito baixa ou mesmo indetectável, hemossiderinúria e hemoglobinúria, consequência da hemólise intravascular, reforçam a suspeita de HPN. Devem ser considerados igualmente os aspectos clínicos referidos anteriormente, principalmente os eventos tromboembólicos não explicados, e a presença de leucopenia e trombocitopenia ligeiras [36]. Todos os doentes que apresentem trombose das veias hepática, porta ou mesentérica devem fazer um rastreio para excluir HPN [32].

O teste de Ham, que é baseado no aumento da susceptibilidade dos eritrócitos à acção do complemento através da acidificação do soro, foi um dos primeiros testes de diagnóstico. É um teste que é relativamente específico para a HPN, mas não é muito sensível. Nos últimos anos, tem-se tornado obsoleto, tendo sido substituído pela citometria de fluxo [32,34,36]. O teste *gold-standard* para o diagnóstico da HPN é, actualmente, a análise das moléculas ligadas a GPI na superfície de células hematopoiéticas por citometria de fluxo [34,35]. A citometria de fluxo é um teste com elevada sensibilidade e especificidade, permitindo aferir o tamanho do clone de células HPN nas diferentes linhas celulares, fornecendo informações sobre a gravidade do défice de antigénios nas células HPN (células tipo I, II ou III), que são determinantes importantes da apresentação clínica [32,34]. O requisito mínimo para o

diagnóstico de HPN é que haja a demonstração de que uma população de eritrócitos com um défice de, pelo menos, duas moléculas ligadas a GPI [34]. Para analisar o tamanho do clone HPN, deve usar-se a proporção de granulócitos HPN, uma vez que estes têm uma semivida mais pequena e são menos afectados por hemólise e por transfusões, reflectindo melhor o tamanho do clone HPN [32,34].

Ultimamente, tem sido cada vez mais usado um novo teste, o teste da aerolisina fluorescente (FLAER), que usa uma toxina produzida pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, a Aerolisina, que se liga à estrutura GPI [32,34]. É um teste que permite a detecção da expressão de GPI, em virtualmente qualquer tipo de célula que a expresse, à excepção dos eritrócitos, o que pode ser explicado pelo facto de tanto os eritrócitos normais como os eritrócitos HPN expressarem grandes quantidades de glicoforina, uma proteína que se liga fracamente à aerolisina [32]. Além disso, é um teste com grande sensibilidade para a detecção de pequenas populações de células com HPN [36] e elimina a necessidade de, na análise de células mononucleares, serem usados anticorpos mononucleares específicos para as várias linhagens celulares [32].

A avaliação inicial dos doentes deve incluir, além do teste da citometria de fluxo, um hemograma completo, quantificação da LDH, bilirrubina e haptoglobina, estudo do ferro, biópsia e aspirado medular e estudo citogenético. Estes parâmetros vão determinar a classificação da doença numa de três categorias, de acordo com o *International PNH Interest Group* (Tabela 6) [35]. Esta classificação será importante para determinar a abordagem terapêutica ao doente.

Tabela 6: Classificação da Hemoglobinúria Paroxística Nocturna [35].

Categoria	Taxa de hemólise intravascular	Medula Óssea	Análise por citometria de fluxo	Benefício com eculizumab
Clássica	Elevada (LDH marcadamente anormal, frequentemente com episódios de hemoglobinúria)	Hipo celular com áreas de hiperplasia eritróide e morfologia normal ou quase normal	População grande de PMN com déficit de proteínas ancoradas por GPI (50-100%)	Sim
HPN no contexto de outra síndrome de insuficiência medular	Ligeira (normalmente com anomalias mínimas nos marcadores bioquímicos de hemólise)	Evidência de um síndrome de insuficiência medular concomitante	População moderada de PMN com déficit de proteínas ancoradas por GPI (25-50%)	Tipicamente não, mas alguns doentes desta subcategoria podem ter hemólise clinicamente significativa e podem ter benefício no seu uso
Subclínica	Sem evidência clínica ou bioquímica de hemólise	Evidência de um síndrome de insuficiência medular concomitante	Pequena população de PMN com déficit de proteínas ancoradas por GPI (<25%)	Não

LDH, lactato desidrogenase; PMN, polimorfonucleados; HPN, Hemoglobinúria paroxística nocturna

5.3.1.4. Tratamento

A terapêutica na HPN depende da categoria da doença (Tabela 6). No geral, o tratamento é essencialmente de suporte, de forma a controlar a anemia e a hemólise [34,36]. É também necessário tratar as complicações, como os episódios tromboembólicos e as infecções, sendo igualmente importante tentar prevenir as mesmas, de forma a conseguir prolongar a sobrevivência [36].

A anemia deve ser tratada tendo em conta a sua causa predominante. Nos doentes com a forma clássica da doença, cujo factor predominante para a anemia é a hemólise intravascular, pode ser tentada a terapêutica com corticosteróides [32,36]. Se não forem observados benefícios após 1 a 2 meses de tratamento, o corticosteróide (prednisona) deve ser descontinuado. Os doentes refractários à terapêutica devem ser submetidos a transfusões sanguíneas. Nos doentes com HPN associada a insuficiência medular, a anemia é predominantemente de causa autoimune. Nesse sentido, podem responder a terapêutica imunossupressora (50% dos doentes), nomeadamente a ciclosporina e a globulina anti-timócito [32]. Os doentes devem tomar um suplemento de ácido fólico, devido ao elevado *turnover* celular [32,36] e, quando necessário, devem ser suplementados com ferro [32].

Em relação aos processos tromboembólicos que podem ocorrer, a profilaxia é controversa. Dado o elevado risco de trombose deve-se ponderar caso a caso a profilaxia primária com anticoagulante, e perante um evento trombótico o doente deve ficar anticoagulado *ad eternum*. As indicações para profilaxia anticoagulante primária são: clone de granulócitos superior ou igual a 50%; existência de outro factor de trombofilia hereditária ou adquirida; e em situações de risco, como a gravidez ou cirurgias.

A abordagem terapêutica à forma clássica da doença passa pelo tratamento com eculizumab [35]. O eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga a C5 (Figura 5), impedindo a sua activação em C5b, pela via alternativa do complemento, inibindo assim a formação de CAM, principal responsável pela hemólise nas células HPN [36]. O tratamento com eculizumab diminui a necessidade de transfusões porque, ao travar o processo hemolítico, melhora a anemia. Além disso, promove a melhoria da qualidade de vida ao eliminar os sintomas constitucionais relacionados com a activação crónica do complemento, diminuindo as complicações tromboembólicas [32–34]. Alguns dados indicam que cerca de

um terço a metade dos doentes atingem o estado de independência transfusional [33,35], e outros referem a cessação completa dos episódios de hemoglobinúria, imediatamente após o início do tratamento com este fármaco [34]. Verifica-se que a LDH atinge valores normais ou quase normais após o início do tratamento [33,34], mas, em quase todos os doentes, persiste uma anemia, ligeira a moderada, hiperbilirrubinémia e reticulocitose [35]. Esta persistência da anemia é explicada por um processo de hemólise extravascular que ocorre como efeito do próprio fármaco. O eculizumab, ao inibir a formação de CAM, previne a citólise directa dos eritrócitos HPN, permitindo que se manifeste o défice do Factor Acelerador de Degradação, que se reflecte por uma regulação aberrante de C3 convertase da via alternativa do complemento e, como consequência, com uma deposição de C3 activado na superfície da célula. A activação da ligação covalente e os produtos de degradação de C3 servem de opsoninas, que são reconhecidas por receptores especiais em células do sistema reticuloendotelial, o que resulta em hemólise extravascular [35]. Os doentes tratados com eculizumab podem não ter que fazer anticoagulação para prevenir os efeitos tromboembólicos [33,35]. No entanto, os doentes que já experimentaram um episódio de trombose e estavam a fazer anticoagulação antes de iniciar a terapêutica com eculizumab, devem manter essa terapêutica [35]. Os doentes em tratamento com eculizumab têm um risco aumentado de infecção por microrganismos encapsulados [33,34]. No entanto, apesar de todos os benefícios deste fármaco, este não elimina o clone HPN e é um fármaco muito dispendioso [37].

Os doentes com HPN no contexto de outra síndrome de insuficiência medular que têm clones pequenos de HPN (inferiores a 10%) [35] tem um quadro clínico que é dominado pelas manifestações de insuficiência medular, sendo a hemólise intravascular um achado incidental. Estes doentes não necessitam de tratamento específico para a HPN [33,35] e o eculizumab não melhora a sua função medular, pelo que não é muito eficaz [37]. Os doentes que apresentam HPN sintomática (clones de HPN > 25%) no contexto de uma síndrome de

insuficiência medular devem fazer terapêutica com eculizumab se houver hemólise, ou anticoagulação, se houver episódios de trombose [33].

O transplante alogénico de células estaminais é o único tratamento curativo para a HPN [32,34,36,37] e foi demonstrado que elimina o clone de HPN em doentes com HPN clássica e doentes com HPN e anemia aplásica [37]. No entanto, esta terapêutica está associada a uma morbidade e mortalidade significativas [32,35,37]. Devido à introdução do eculizumab na terapêutica da HPN, pela sua eficácia na redução dos episódios tromboembólicos e hemolíticos, as indicações para o transplante alteraram-se [35,37]. O transplante não deve ser oferecido como terapêutica inicial nos doentes com a forma clássica de HPN [37]. Os melhores candidatos para o transplante são os doentes jovens com pancitopenia ou trombose grave, que tenham um irmão com HLA (antigénio leucocitário humano) compatível [32]. Os doentes que têm HPN e anemia aplásica concomitantemente são candidatos razoáveis para o transplante, se tiverem citopenias graves [37].

5.3.2. Anemia Hemolítica Autoimune

A anemia hemolítica autoimune (AHAI) é uma doença imune causada por anticorpos (Ac) dirigidos a eritrócitos autólogos normais, que origina um aumento da destruição dos mesmos, com ou sem activação do sistema complemento [38–40]. A AHAI pode ser classificada com base na temperatura óptima de ligação dos autoanticorpos aos eritrócitos em AHAI por anticorpos quentes (anticorpos reagem de forma óptima a 37°C), AHAI por anticorpos frios (anticorpos reagem de forma óptima a <30°C) ou AHAI devido a autoanticorpos bifásicos (hemoglobinúria paroxística por frio – anticorpos reagem de forma óptima <30°C e activam o complemento a 37°C) [38]. As três formas podem ocorrer de forma idiopática (primária) ou secundária a outra doença, como por exemplo a doenças autoimunes, como o lupus sistémico eritematoso, linfomas não Hodgkin de células B e leucemia linfóide

crónica B (LLC B), ou serem induzidas por fármacos [40]. Em cerca de 6 a 8% das AHAI desenvolvem-se, em simultâneo, AHAI por anticorpos quentes e AHAI por anticorpos frios. A estes casos dá-se o nome de AHAI do tipo misto [41].

A AHAI é das formas mais raras de anemia, mesmo se considerarmos apenas as anemias hemolíticas [39]. Destas, as AHAI por anticorpos quentes é a mais prevalente, compreendendo 80 a 90% de todos os casos [42]. Tem uma incidência estimada de 1:100,000, em que mais de 50% são formas secundárias [38]. Cerca de dois terços dos doentes com AHAI têm mais de 50 anos e, enquanto nas formas idiopáticas a maioria são do sexo feminino, nas formas associadas a LLC predomina o sexo masculino [39].

5.3.2.1. Fisiopatologia

A hemólise na AHAI pode ser intravascular, extravascular ou ambas, sendo a sua gravidade influenciada pelo anticorpo e pelo antígeno [40]. Os mecanismos que explicam o papel dos autoantígenos como causa da AHAI são a reactividade cruzada ou o mimetismo molecular entre antígenos ambientais e autoantígenos. Outros mecanismos, como o sistema complemento, apresentação de autoantígenos ineficaz e anomalias funcionais nas células B e T, também têm um papel importante na patogenia da doença [42].

O isotipo do autoanticorpo é determinante na fisiopatologia e na clínica [38]. Os anticorpos IgM (imunoglobulina M) formam uma estrutura pentamérica, sendo muito eficientes na activação do complemento. As IgA (imunoglobulina A), IgG1 (imunoglobulina G1) e IgG3 (imunoglobulina G3), também são eficientes na activação do complemento [38,40]. A activação do complemento pode culminar na formação e introdução do CAM na membrana dos GV, o que leva a um processo de hemólise intravascular. No entanto, geralmente, devido a proteínas reguladoras (CD55 e CD59), a cascata do complemento é travada antes da formação do CAM. Nesses casos, os produtos de degradação do

complemento (C3c e C3d) mantêm-se ligados à membrana do eritrócito, sendo alvos dos fagócitos do SRE, resultando em hemólise extravascular [38,40]. Os eritrócitos que têm na sua superfície IgG, com ou sem C3c/C3d, são preferencialmente removidos por fagocitose mediada pelo receptor Fc- γ no baço, enquanto os eritrócitos que têm à superfície C3c/C3d, na ausência de IgG, são destruídos por fagocitose mediada por receptor de complemento no fígado [38].

A AHAI por anticorpos quentes é comumente mediada por IgG, mas também pode ser mediada, mais raramente, por IgM e IgA [38]. Os anticorpos IgG são panreactivos e dirigidos a antígenos Rh (Rhesus), glicoforina A ou outros antígenos dos eritrócitos [39]. A AHAI por anticorpos quentes mediada por IgM é rara, sendo mais habitual existir em conjunto com IgG. Estes doentes podem apresentar hemólise potencialmente fatal [40]. A existência isolada de anticorpos IgA é rara, representando 0,2% dos casos, mas surgem em conjunto com IgG em 14 a 21% dos casos [40], e apresentam hemólise grave [39]. O mecanismo da hemólise intravascular mediada por IgA ainda não é totalmente conhecido [40].

A AHAI por anticorpos frios (ou doença de aglutininas a frio) é mediada, na maior parte das vezes, por IgM, mas também pode ser mediada por IgG e IgA, que se ligam preferencialmente aos eritrócitos a baixas temperaturas, podendo ser ou não causa de hemólise. Estes Ac são também denominados aglutininas a frio visto que causam aglutinação dos eritrócitos a 3°C [43]. Os antígenos que reagem com os anticorpos a frio são polissacarídeos ou partes de glicoproteínas que são polissacarídeos. No caso da doença de aglutininas a frio, os antígenos são o antígeno i e o antígeno I, que fazem parte do grupo ABH, ou antígeno Pr [34,43]. O antígeno I é formado por uma enzima que adiciona ramos ao antígeno i e, como a enzima responsável por este processo não está activa até ao nascimento, as células do cordão umbilical expressam o antígeno i e os eritrócitos do adulto

expressam o antígeno I [34]. As aglutininas a frio estão presentes em virtualmente todos os indivíduos saudáveis em títulos baixos [34,40].

As IgM que originam doença hemolítica podem ser policlonais ou monoclonais. Sendo policlonais, têm geralmente um curso benigno, estando caracteristicamente associados a estados pós-infecciosos virais (mais frequentemente em idade pediátrica), infecção por micoplasma e mononucleose infecciosa. Os anticorpos associados à mononucleose infecciosa têm frequentemente especificidade anti-i, enquanto os anticorpos produzidos após infecção por *Mycoplasma pneumoniae* têm habitualmente especificidade anti-I [34,40,43]. As aglutininas monoclonais ocorrem por expansão clonal de células B, sendo geralmente patogénicas, podendo progredir para linfoma [40]. A maioria destes doentes apresenta uma forma subclínica de linfoma não Hodgkin, ou de uma gamopatia monoclonal de significado indeterminado. Num estudo efectuado na Noruega, cerca de 94% dos doentes com doença de aglutininas a frio primária apresentava imunoglobulinas monoclonais, com 90% destas paraproteínas da subclasse IgM *kappa*. A análise da histologia medular e a fenotipagem imunológica revelaram que 76% dos doentes tinham linfoma não Hodgkin (50% linfoma linfoplasmocítico e os restantes linfomas de células marginais ou linfoma linfocítico de pequenas células) [39].

As IgM são muito eficientes na activação da via clássica do complemento, no entanto, devido à dependência térmica do anticorpo, há uma contenção do seu efeito patogénico. Na circulação das extremidades, onde a temperatura é mais baixa, a aglutinina mantém-se no eritrócito por alguns segundos, activando a cascata do complemento, ocorrendo assim a fixação das proteínas do complemento à membrana do eritrócito [40,43]. Na circulação hepática (também no baço, pulmões e gânglios linfáticos), os eritrócitos revestidos com C3b ligam-se a receptores de macrófagos, sendo formados esferócitos, que vão ser destruídos por hemólise extravascular. Algumas células não são destruídas e o C3b é clivado em C3d, que é

resistente à hemólise [43], uma vez que os macrófagos se ligam a essa proteína com menor avidéz [40]. A hemólise pode ser agravada pelo aumento da produção de complemento durante uma reacção de fase aguda, ou por produtos de sangue que contenham plasma [43].

A hemoglobinúria paroxística a frio (HPF) está associada ao anticorpo anti-P (anticorpo Donath-Landsteiner), que era frequentemente detectado em doentes com sífilis secundária ou terciária. Hoje em dia é uma situação rara, e este anticorpo encontra-se mais comumente em crianças após doença viral [43] e raramente após infecção bacteriana [40]. Normalmente, a causa viral não é identificada, mas a doença está associada a uma infecção do trato respiratório superior. Foram reportados casos de HPF, em adultos e crianças, secundários a varicela [40]. O anticorpo anti-P é um anticorpo policlonal da subclasse IgG que reage com os eritrócitos a temperaturas baixas, havendo a fixação do complemento. A cascata do complemento é completada a temperaturas elevadas (37°C), condicionando a ocorrência de hemólise intravascular [39].

5.3.2.2. Manifestações Clínicas

A clínica depende da taxa de hemólise e, frequentemente, os doentes apresentam sinais de anemia como palidez, fadiga, dispneia de esforço e palpitações, podendo apresentar também icterícia [38]. Normalmente, a anemia surge de forma aguda, por vezes podendo ameaçar a vida do doente, com astenia intensa e dispneia, com necessidade de hospitalização [44]. A AHAI por anticorpos quentes pode ocorrer de forma aguda ou crónica, e podem existir sinais associados a uma circulação hiperdinâmica, secundária à anemia, como hepatomegalia e, em casos mais severos, edema agudo do pulmão, letargia e obnubilação. Se forem detectadas linfadenopatias, febre, hipertensão, insuficiência renal, exantema, equimoses ou petéquias, deve pôr-se a hipótese de AHAI secundária, devendo pesquisar-se uma possível causa subjacente [40].

Na doença das aglutininas a frio, além da anemia, que pode ser crónica ou aguda e autolimitada (formas associadas a infecções), pode surgir acrocianose precipitada pela exposição ao frio, fenómeno de Raynaud e livedo reticular [38,40,43].

A HPF aguda pós-viral em crianças é caracterizada por hemólise fulminante e manifesta-se tipicamente por anemia grave com reticulocitopenia relativa, palidez, hemoglobinúria, icterícia ligeira e por vezes insuficiência renal [40,43].

5.3.2.3. Diagnóstico

Perante a suspeita de AHAI, pode organizar-se a investigação diagnóstica em 4 passos: (1) avaliar se a anemia é hemolítica; (2) diferenciar a anemia em imune ou não imune; (3) identificar o tipo de anticorpo; (4) diferenciar a anemia hemolítica em primária ou secundária [39].

Na AHAI o grau de anemia é variável, tal como os parâmetros laboratoriais de hemólise. Na AHAI por anticorpos quentes a anemia pode ser macrocítica, devido à marcada reticulocitose e, em alguns casos, também devido ao défice de folato [40,42]. O esfregaço de sangue periférico apresenta tipicamente policromatofilia, anisocitose, esferócitos, eritrócitos fragmentados e eritrócitos nucleados [40]. Pode não haver reticulocitose no início do quadro, quer por um atraso na resposta medular, quer quando há uma disfunção medular. A ausência de reticulocitose não exclui o diagnóstico de AHAI, mas é um preditor de mau prognóstico [40]. A doença de aglutininas a frio pode ser sugerida por macrocitose extrema resultante da aglutinação dos eritrócitos [43].

Os parâmetros laboratoriais caracterizam-se por um aumento da LDH e da bilirrubina indirecta e por uma diminuição dos níveis de haptoglobina [39]. Valores normais de LDH não excluem a presença de hemólise [38]. Os valores de LDH são marcadores úteis na aferição da

gravidade da hemólise, pelo que podem ser usados para a monitorização da resposta à terapêutica [42].

Para avaliar se a anemia é imune deve realizar-se o teste da antiglobulina directo (TAD) ou teste de Coombs directo. Este teste consiste na adição de um reagente poliespecífico com anti-globulina humana (AGH) (anti-IgG e anti-complemento) aos eritrócitos do doente. A reacção é positiva se ocorrer uma aglutinação dos GV do doente. Posteriormente, adicionam-se reagentes AGH mono-específicos para detectar individualmente se a reacção é positiva com IgG, anti-C3d [45], IgA, IgM ou C3c [38]. O teste pode ser positivo, mesmo confirmado com um reagente anti-IgG específico, em cerca de 1:1000 a 1:14000 indivíduos saudáveis. Assim, a significância do TAD requer correlação clínica [45]. Por outro lado, um TAD negativo não exclui com certeza a presença de anemia mediada imunologicamente [38–40,45]. Isto pode ocorrer por várias razões: autoanticorpos do tipo IgA e IgM podem causar hemólise com TAD negativo, porque o teste apenas detecta eritrócitos revestidos com IgG e C3d; o teste pode não ter sensibilidade adequada para detectar níveis baixos de anticorpos potentes; anticorpos de baixa afinidade com relevância clínica podem ser removidos durante o teste [45]; outros erros técnicos [40]. Em aproximadamente 80% dos doentes com AHAI existem anticorpos no soro, além dos presentes na membrana dos eritrócitos. Esses anticorpos podem ser detectados pelo teste da antiglobulina indirecto (TAI) ou teste de Coombs indirecto [40].

O próximo passo é a identificação do tipo de anticorpo que origina a AHAI. A especificidade do anticorpo pode ser determinada por técnicas de eluição. No entanto, em muitos casos não é possível identificar um anticorpo específico (especificidade indeterminada) [38].

A diferenciação entre AHAI primária e secundária deve ser feita considerando a história clínica e os factores precipitantes (exposição a fármacos, infecções, doenças

autoimunes). Os exames complementares de diagnóstico podem ser muito informativos, nomeadamente o esfregaço de sangue periférico (informação sobre doenças linfoproliferativas), doseamento de imunoglobulinas e imunofixação séricas (identificação de gamopatias monoclonais ou de défice de imunoglobulinas) [39].

No caso a HPF, o TAD é quase sempre negativo, bem como o TAI [40]. Pode realizar-se o teste de Donath-Landsteiner (hemólise bi-térmica dos eritrócitos normais), embora este apenas seja positivo com elevados títulos de anticorpos no soro. A melhor técnica para a sua detecção é o uso de IgG radiomarcada, mas geralmente não está disponível [34].

5.3.2.4. Tratamento

5.3.2.4.1. AHAI por Anticorpos Quentes

A transfusão com concentrados de eritrócitos pode ser necessária nestes doentes, principalmente nos sintomáticos e nos mais idosos, especialmente nos que têm doença coronária, mas deve ser evitada sempre que possível, uma vez que há um risco de exacerbação da hemólise e da formação de aloanticorpos induzida pela transfusão [38,42]. Para minimizar as incompatibilidades das transfusões, no sentido de obter melhores resultados, há vários testes de compatibilidade que podem ser utilizados [42], sendo que os requisitos mínimos são que o produto a transfundir seja compatível com os antígenos Kell e Rhesus [38]. No entanto, a transfusão nunca deve ser atrasada se os testes não estiverem prontamente disponíveis ou completos [40].

O tratamento de primeira linha na AHAI por anticorpos quentes é a corticoterapia [38,40,42,44]. A resposta clínica à prednisolona resulta da sua acção sobre os macrófagos, que deixam de ter a capacidade de remover da circulação os eritrócitos com IgG, C3b inactivado ou C3b à superfície. Os corticosteróides interferem tanto na expressão como na

função dos receptores Fc dos macrófagos [40]. Verifica-se ainda uma diminuição da intensidade do TAD e do TAI, mas esta é uma alteração tardia [42].

O esquema terapêutico é iniciado normalmente com 1mg/Kg/dia de prednisolona e, dependendo da resposta, a dose vai sendo diminuída progressivamente [38,42,44]. A dose inicial é administrada até que o hematócrito chegue aos 30% ou até haver uma hemoglobina superior a 10g/dL. Se estes objectivos não forem atingidos até 3 semanas após o início do tratamento, deve iniciar-se uma terapêutica de 2ª linha, já que a melhoria do quadro clínico com corticosteróides após esse tempo é improvável [44]. Se houver resposta aos corticosteróides, a dose de prednisolona deve ser diminuída para 20 a 30mg/dia ao longo de algumas semanas [38,42,44]. Após essa redução, e mantendo-se os valores de hemoglobina estáveis, a dose deve ser diminuída lentamente (2,5 a 2mg/dia por mês), com monitorização cuidadosa da hemoglobina e da contagem dos reticulócitos. Nesta altura pode iniciar-se um regime em dias alternados, com o objectivo de diminuir os efeitos adversos do uso de corticosteróides a longo prazo [44]. A duração do tratamento pode variar de 3 a 12 meses [42]. Cerca de 60 a 70% dos doentes tratados com corticosteróides atingem uma resposta parcial, enquanto 10 a 15% atingem resposta completa [38]. Segundo o Colégio Americano de Reumatologia, todos os doentes a fazer corticoterapia devem tomar vitamina D, cálcio e bisfosfonatos. Além disso, devem fazer suplementação com ácido fólico [44]. Os doentes com diabetes, hipertensão, hiperlipidemia, insuficiência cardíaca, glaucoma e úlcera péptica, devem ser vigiados com atenção, já que a corticoterapia pode exacerbar estas doenças [42]. Quando se verifica que os doentes são refractários à corticoterapia deve fazer-se uma reavaliação diagnóstica a fim de perceber se há uma patologia subjacente [44].

A esplenectomia é provavelmente a melhor terapêutica de 2ª linha para a AHAI por anticorpos quentes [42], principalmente em doentes mais jovens [40]. Este procedimento é muito eficaz, uma vez que é removido o principal local de destruição de eritrócitos, além de

eliminar muitos macrófagos e células B produtoras do autoanticorpo [40]. As indicações para esplenectomia são: doentes que não têm uma resposta satisfatória à corticoterapia; recidiva após resposta com corticoterapia; e doentes que necessitam de mais de 10 a 15mg/dia de prednisolona para manter um nível de hemoglobina aceitável [42].

A eficácia a curto-prazo da esplenectomia é muito boa, com 38 a 82% dos doentes a atingirem resposta parcial ou resposta completa. Apesar de não haver estudos de elevada qualidade para avaliar o sucesso desta terapia a longo prazo, existem evidências de que um número substancial de doentes mantenha a resposta, sem necessidade de qualquer tratamento médico, durante anos [44]. Os doentes esplenectomizados que tenham uma recidiva frequentemente necessitam de uma menor dose de corticosteróides do que aquela que necessitavam anteriormente, para manter um nível de hemoglobina aceitável [42]. Devido ao risco de infecções por microrganismos encapsulados, os doentes devem ser vacinados, idealmente, 2 semanas antes da esplenectomia para *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* do tipo B e *Neisseria meningitidis*. Após a esplenectomia, é recomendada a vacinação para pneumococos a cada 5 anos [42,44].

O Rituximab, um anticorpo monoclonal quimérico dirigido contra o antígeno CD20 (expresso nas células B no sangue, gânglios linfáticos e medula) é também uma terapêutica de segunda linha para esta doença [42]. O mecanismo de acção do rituximab é multifacetado, complexo e não está completamente esclarecido [40]. Nos adultos, o rituximab tem uma eficácia de 25 a 100%, com um tempo de resposta que pode variar de muito rápido até semanas a meses [42]. Este fármaco tem uma boa relação risco/benefício [42] e, apesar de os estudos de eficácia terem um viés de publicação e de não existirem estudos prospectivos controlados, deve vir a ser considerado como terapêutica de escolha para as AHAI por anticorpo quentes corticóide-resistentes [38]. Uma complicação rara é a leucoencefalopatia multifocal progressiva, que pode ser fatal [44].

Os doentes que não respondem ao rituximab devem fazer esplenectomia, bem como os doentes que atingiram a resposta com rituximab, mas tiveram uma recidiva em menos de um ano. Nos doentes que tiveram uma recidiva após uma resposta de longa duração, um novo tratamento com rituximab deve ser considerado [44].

Além destas terapêuticas de segunda linha, existem outras alternativas para os casos resistentes. Uma das opções é o uso do anticorpo monoclonal dirigido ao antigénio CD52, o alemtuzumab. A experiência com a terapia da AHAI por anticorpos quentes com alemtuzumab é muito limitada. Testes preliminares indicam que este anticorpo pode induzir uma resposta em casos de doença grave, que não respondeu à imunossupressão convencional [42]. Devido à eficácia demonstrada do alemtuzumab no tratamento da LLC B, o uso deste fármaco deve ser considerado em doentes com AHAI e LLC progressiva com necessidade de citorredução [40].

A terapia imunossupressora é também uma alternativa de tratamento. Os fármacos mais usados são os agentes alquilantes (ciclofosfamida e clorambucil) e as tiopurinas (azatioprina). Estes fármacos são usados por provocarem um efeito inibitório no sistema imunitário [40]. Uma análise crítica de casos de doentes tratados com azatioprina ou ciclofosfamida mostrou que provavelmente em menos de um terço dos doentes houve uma resposta. A durabilidade dessas respostas é desconhecida na maioria dos estudos [44].

A terapêutica com γ -globulina intravenosa teve eficácia em casos seleccionados de AHAI. Esta actua saturando os receptores Fc dos macrófagos, aumentando assim a sobrevivência dos eritrócitos revestidos com IgG [40,42]. Apesar de não ser indicada por rotina no tratamento da AHAI, pode estar indicada como forma de estabilizar os doentes antes de ser realizada a esplenectomia ou em casos de AHAI grave que pode por em risco a vida dos doentes [38,40].

A plasmaferese remove a IgG e a IgM que medeiam a hemólise na AHAI. No entanto, a grande distribuição extravascular e a rápida produção de IgG são um obstáculos à eficácia a longo-prazo desta técnica. Assim, deve ficar reservada para doentes que não respondam a transfusão sanguínea que estão numa situação clínica crítica devido à rápida *clearance* de eritrócitos [40].

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas também foi tentado, mas existe pouca informação sobre esta terapêutica na AHAI [42]. Os resultados do transplante autólogo de células estaminais hematopoiéticas foram decepcionantes [44].

5.3.2.4.2. AHAI por Anticorpos Frios

A terapêutica das síndromes de aglutininas a frio depende da gravidade dos sintomas, das características serológicas do auto-anticorpo e da doença subjacente [40]. Nestes doentes, a anemia é frequentemente ligeira, sem necessidade de correcção [38–40], sendo inevitável o tratamento em cerca de 50% dos doentes [44]. Além disso, os doentes devem ser alertados para evitarem a exposição ao frio e a prevenirem as infecções, de modo a reduzir o risco de exacerbações de hemólise, sendo estas muitas vezes as únicas medidas necessárias [38–40,44]. Alguns doentes precisarão também de suplementação com ácido fólico [39].

Ao contrário da AHAI por anticorpos quentes, nesta patologia não há resposta eficaz aos corticóides (foram eficazes em alguns doentes com títulos baixos de aglutininas de grande amplitude térmica e doença mediada por anticorpos IgG reactivos aos frio [40]) [38,39,44]. Também a esplenectomia não apresenta benefícios nestes doentes, uma vez que o local principal de sequestro de eritrócitos é o fígado, e não o baço [40].

Existem estudos que indicam que o uso de rituximab é uma terapêutica eficaz, com atingimento de uma resposta parcial na maioria dos doentes, e que, os que tiveram recidivas, obtiveram uma boa resposta com o retratamento [44]. Por outro lado, há estudos que indicam

que a resposta completa é rara e que as recidivas são frequentes [38]. No entanto, há que ter em conta que os critérios de resposta completa e resposta parcial não estão bem definidos e, além disso, os estudos sobre o rituximab foram realizados com amostras pequenas [44]. Foram reportados resultados prometedores com o uso de eculizumab e bortezomib em doentes refractários ao rituximab [44]

Em casos mais agudos a plasmaferese pode ser uma terapêutica eficaz, já que a IgM é maioritariamente intravascular, podendo levar a uma rápida diminuição dos seus níveis séricos. No entanto, é uma técnica que levanta algumas dificuldades nestes doentes, uma vez que é necessário bastante rigor na técnica para que o sangue não fique frio [38,40]. Em situações agudas mais graves, em que seja necessária a realização de uma transfusão sanguínea, esta deve ser realizada de forma a manter a unidade transfundida a uma temperatura de 37°C, por um sistema de aquecimento controlado [38].

A fludarabina tem efeitos terapêuticos benéficos [34,40], mas os doentes podem desenvolver AHAI por anticorpos quentes e púrpura trombocitopénica imune. Outros agentes como o clorambucil ou a ciclofosfamida podem ter um efeito benéfico nos doentes com AHAI por anticorpos frios secundária, mas apenas têm benefício ocasional nas formas primárias [40].

Quando associada a linfomas, a anemia responde bem à quimioterapia para o linfoma [44]. Quando associada a infecção por micoplasma a hemólise tende a ser autolimitada, mas se a infecção for tratada, há uma diminuição da sua duração [40].

5.3.2.4.3. Hemoglobinúria Paroxística a Frio

Não existe tratamento específico para a HPF, pelo que o tratamento é de suporte com transfusões, tendo em atenção a temperatura do sangue transfundido, mantendo o doente quente [40].

A hemólise da HPF é predominantemente intravascular, pelo que a esplenectomia não tem lugar na sua terapêutica. Os corticosteróides podem ser úteis, bem como o rituximab e a ciclofosfamida [34,43].

6. Conclusão

A anemia é um problema de saúde à escala mundial, pelo que todos os médicos devem estar atentos e reconhecer as suas manifestações clínicas e as suas características laboratoriais. As anemias hemolíticas, que são classificadas como anemias regenerativas, correspondem a 17,5% de todos os casos de anemia, devendo por isso ser sempre consideradas no diagnóstico diferencial. As suas manifestações clínicas são inespecíficas, semelhantes a outras anemias, pelo que se devem procurar sinais ou sintomas-chave orientadores do diagnóstico. Igualmente, um bom conhecimento das suas características laboratoriais é essencial, na medida que pode indicar a provável causa etiológica, ou orientar para um grupo mais restrito de etiologias.

As hemoglobinopatias são o distúrbio genético mais comum em todo o mundo, estimando-se que cerca de 7% da população seja portadora. Nesse sentido, torna-se necessário que os clínicos conheçam os seus sintomas, manifestações laboratoriais e entendam a importância da história familiar dos doentes quer na hora do diagnóstico, quer no momento em que uma família afectada decida ter descendência.

A hemoglobinúria paroxística nocturna, apesar de ser uma doença rara, tem fascinado os hematologistas pela sua variabilidade clínica e pela sua fisiopatologia cativante. A investigação científica tem levado a uma melhor compreensão dessa mesma fisiologia, permitindo o desenvolvimento de novas terapias dirigidas, nomeadamente o eculizumab, que alterou o curso natural da doença, oferecendo aos doentes uma melhor qualidade de vida. Serão necessários mais estudos nesta área de forma a perceber melhor a relação entre a HPN e as síndromes de insuficiência medular, que poderão levar à descoberta de novas terapias que actuem ao nível das células progenitoras hematopoiéticas.

As anemias hemolíticas autoimunes são raras, mas potencialmente graves. Por ser uma patologia rara, há pouca informação sobre a mesma, tendo os estudos séries pequenas com

viés de selecção. Assim, deve ser feito um esforço, até no sentido da cooperação internacional, no sentido da realização de mais estudos científicos nesta área. Também é importante que haja uma definição consensual do que é uma resposta parcial e completa à terapêutica, de forma a uniformizar os resultados dos estudos realizados.

7. Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento, minha orientadora, e à Dra. Marília Gomes, co-orientadora, pela disponibilidade, compreensão e amizade que demonstraram desde sempre e pelo seu inestimável contributo científico para este trabalho.

Ao Pedro Martins, João Gomes, e Pedro Teixeira, por terem sido os meus companheiros nesta saga, partilhando bons e maus momentos e ajudando na organização, revisão e correcção, linguística e científica, do texto final.

8. Referências Bibliográficas

1. Benoist B de, McLean E, Egli I, Cogswell M. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia. [Internet]. Benoist B de, McLean E, Egli I, Cogswell M, editors. World Health Organization Press; 2008. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf
2. Beutler E, Waalen J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2013 Nov 12];107(5):1747–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Lambert J-F, Beris P. Pathophysiology and differential diagnosis of anaemia. *ESH Handbook on Disorders of Iron Metabolism* [Internet]. 2009. p. 109–41. Available from: http://www.esh.org/files/doc/IRON2009_CAP.4%28108-141%29.pdf
4. Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM. Hemolytic anemia. *Am Fam Physician* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2014 Feb 20];69(11):2599–606. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15202694>
5. Papayannopoulou T, Migliaccio AR, Abkowitz JL, D'Andrea AD. Biology of Erythropoiesis, Erythroid Differentiation and Maturation. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 276–94.
6. Vandekerckhove J, Courtois G, Coulon C, J.-A. Ribeil JA, Hermine O. Regulation of erythropoiesis. *ESH Handbook on Disorders of Iron Metabolism*. 2009. p. 44–87.
7. Steinberg MH, Benz EJ, Adewoye HA, Ebert BL. Pathobiology of The Human Erythrocyte and Its Hemoglobins. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Fifth Edit. 2009. p. 427–38.
8. Xavier Pipa SI. *Caracterização Clínica e Laboratorial das Anemias Microcíticas e Hipocrômicas*. Universidade de Coimbra; 2012.
9. Marks PW, Glader B. Approach to Anemia in the Adult and Child. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 439–46.
10. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EG, Green AR. *Postgraduate Haematology* [Internet]. 6th editio. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EG, Green AR, editors. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010 [cited 2014 Jan 2]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781444323160>
11. Delaunay J, Cartron J-P. Disorders of the red cell membrane. *ESH Handbook on Disorders of Iron Metabolism*. 2009. p. 402–35.
12. Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King M-J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update. *Br J Haematol*

- [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Dec 16];156(1):37–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22055020>
13. Gallagher PG, Jarolim P. Red Blood Cell Membrane Disorders. Hematology: Basic Principles and Practice. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 623–43.
 14. Roberts-Harewood M. Inherited haemolytic anaemias. Medicine (Baltimore) [Internet]. Elsevier Ltd.; 2009 Mar [cited 2014 Jan 14];37(3):143–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.01.002>
 15. Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects. Blood Transfus [Internet]. 2011 Jul [cited 2014 Feb 5];9(3):274–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3136593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 16. Gregg XT, Prchal JT. Red Blood Cell Enzymopathies. Hematology: Basic Principles and Practice. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 611–22.
 17. Vives Corrons J-L. Red blood cell enzyme defects. ESH Handbook on Disorders of Iron Metabolism. 2009. p. 436–53.
 18. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. Blood Rev [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Sep [cited 2014 Feb 5];25(5):205–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596464>
 19. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Dtsch Arztebl Int [Internet]. 2011 Aug [cited 2014 Feb 13];108(31-32):532–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3163784&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 20. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassemia. Lancet [Internet]. 2012 Jan 28 [cited 2014 Feb 11];379(9813):373–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908035>
 21. Trent RJA. Diagnosis of the haemoglobinopathies. Clin Biochem Rev [Internet]. 2006 Feb [cited 2014 Feb 4];27(1):27–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1390791/>
 22. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Jan 24];5:11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2893117&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 23. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassemia. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Jan 24];5:13. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1710-1492-7-S1-S2.pdf>

24. Singer ST. Variable clinical phenotypes of alpha-thalassemia syndromes. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Feb 17];9:615–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19618088>
25. Forget BG, Bunn HF. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Feb [cited 2014 Feb 4];3(2):a011684. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378597>
26. Higgs DR. The molecular basis of α -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Feb 11];3(1):a011718. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284078>
27. Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia. *Blood* [Internet]. 2011 Sep 29 [cited 2014 Jan 23];118(13):3479–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21813448>
28. De Montalembert M. Management of sickle cell disease. *BMJ* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Feb 19];337(September):a1397. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779222>
29. Kesse-Adu R, Howard J. Inherited anaemias: sickle cell and thalassaemia. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Apr [cited 2014 Feb 20];41(4):219–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.01.012>
30. Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Oct [cited 2014 Feb 20];3(10):a011783. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23813607>
31. McGann PT, Nero AC, Ware RE. Current management of sickle cell anemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Aug [cited 2014 Feb 5];3(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23709685>
32. Brodsky RA. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 385–93.
33. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2012 May [cited 2014 Jan 31];19(3):141–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395662>
34. Rosse WF, Hillmen P, Schreiber AD. Immune-mediated hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2004 Jan [cited 2014 Feb 25];48–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561676>
35. Parker CJ. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Feb 25];2011(Figure 1):21–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160008>
36. Risitano AM. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria [Internet]. Silverberg DD, editor. InTech; 2012. Available from: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/30557.pdf>

37. Brodsky R a. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 Feb 25];95(6):855–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878778&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Zeerleder S. Autoimmune haemolytic anaemia - a practical guide to cope with a diagnostic and therapeutic challenge. *Neth J Med* [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 Mar 6];69(4):177–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527804>
39. Valent P, Lechner K. Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wien Klin Wochenschr* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Mar 6];120(5-6):136–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18365153>
40. Powers A, Silberstein LE. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 645–57.
41. Mayer B, Yürek S, Kiesewetter H, Salama A. Mixed-type autoimmune hemolytic anemia: differential diagnosis and a critical review of reported cases. *Transfusion* [Internet]. 2008 Oct [cited 2014 Mar 8];48(10):2229–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18564390>
42. Barros MMO, Blajchman MA, Bordin JO. Warm autoimmune hemolytic anemia: recent progress in understanding the immunobiology and the treatment. *Transfus Med Rev* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 Jul [cited 2014 Feb 9];24(3):195–210. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2010.03.002>
43. Gertz MA. Management of cold haemolytic syndrome. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2014 Mar 10];138(4):422–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17561970>
44. Lechner K, Jäger U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. *Blood* [Internet]. 2010 Sep 16 [cited 2014 Jan 26];116(11):1831–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20548093>
45. Zantek ND, Koepsell SA, Tharp DR, Cohn CS. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2014 Mar 1];87(7):707–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566278>

9. Anexos

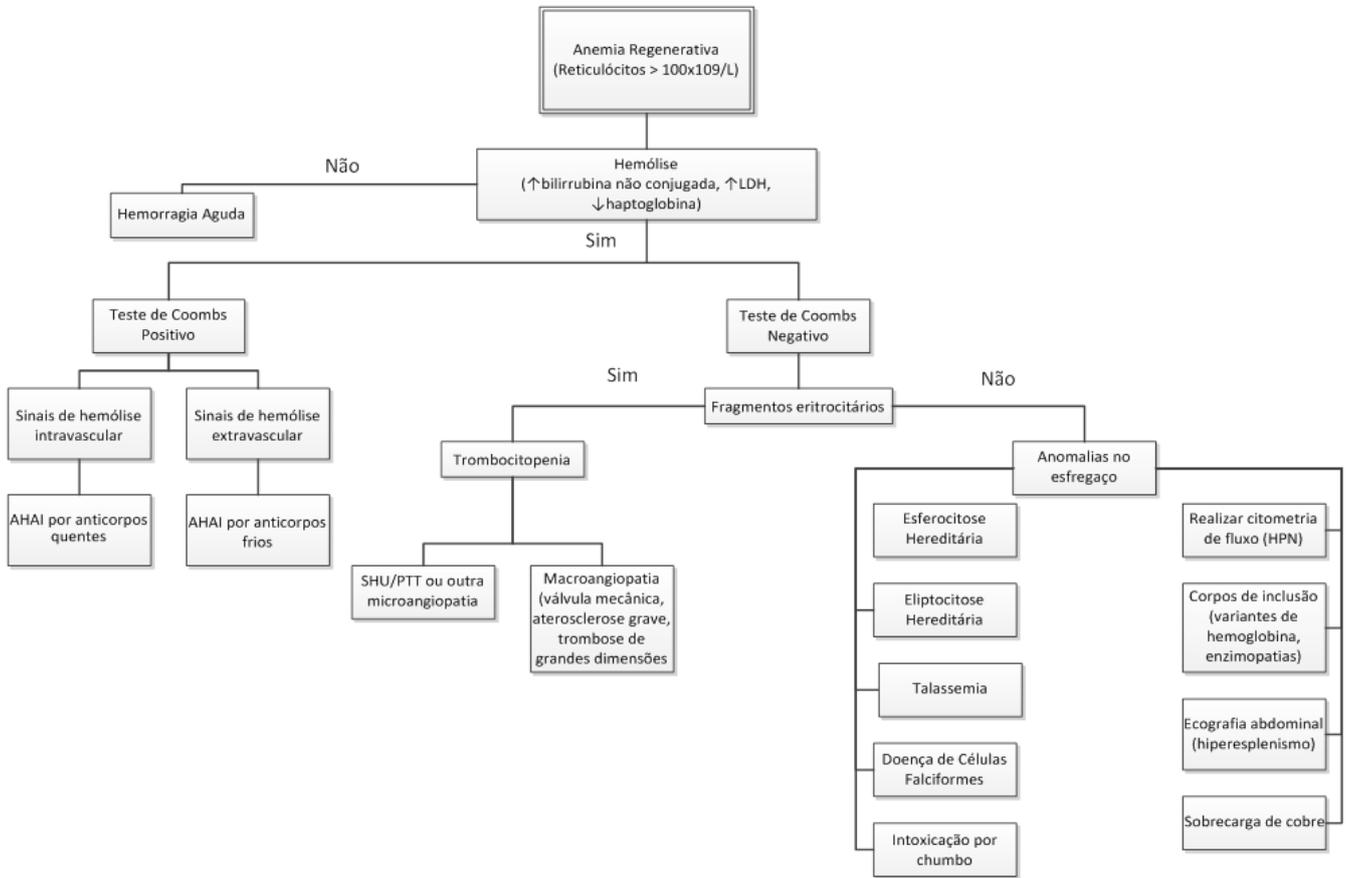


Figura 6: Algoritmo diagnóstico de anemias regenerativas. Adaptado de [3].

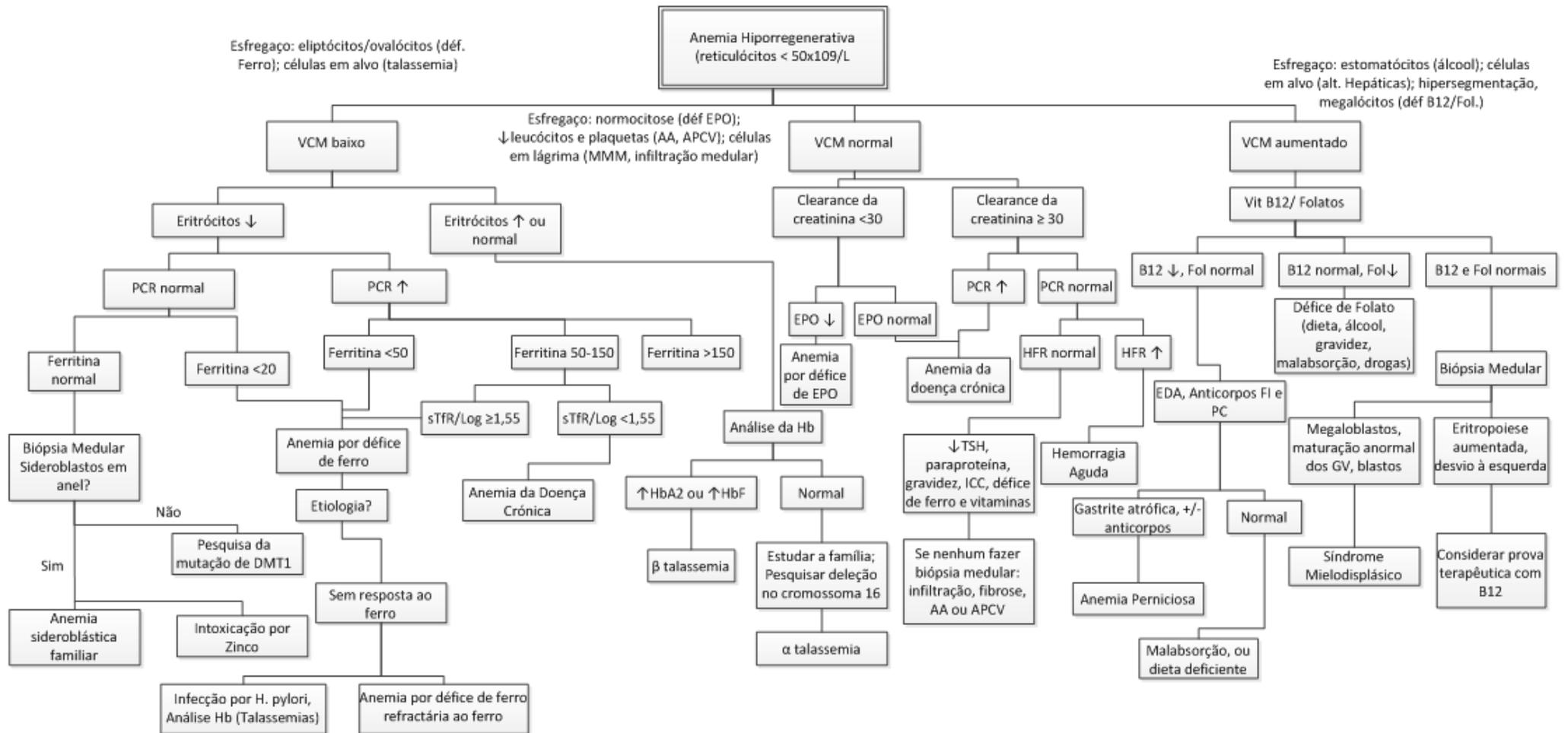


Figura 7: Algoritmo diagnóstico de anemias hiporregenerativas. Adaptado de [3].