



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOÃO PAULO DE SOUSA PEIXOTO

***Anemias hemolíticas hereditárias:
fisiopatologia, clínica, e diagnóstico***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO ANTUNES CRUZ RIBEIRO
DRA. TABITA PILAR BERNARDO MAGALHÃES ASCENSO MAIA

MARÇO/2017

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

**ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITÁRIAS:
FISIOPATOLOGIA, CLÍNICA, E DIAGNÓSTICO**

Investigadores:

João Paulo de Sousa Peixoto

Ana Bela Sarmiento Antunes Cruz Ribeiro

Tabita Pilar Bernardo Magalhães Ascenso Maia

E-mail: joaodesousapeixoto@gmail.com

Resumo

O objetivo deste projeto é realizar uma breve revisão e atualização teórica dos processos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento de uma anemia hemolítica hereditária, assim como estabelecer um algoritmo eficaz no diagnóstico destes doentes.

As anemias hemolíticas hereditárias constituem algumas das mais comuns entidades transmitidas geneticamente em todo o mundo. O seu panorama mundial está em constante alteração graças a uma maior mobilidade das populações, observada nas últimas décadas, e devido ao surgimento de comunidades multiétnicas. O desenvolvimento de novos exames complementares de diagnóstico permitiu o esclarecimento fisiopatológico de várias patologias, que, até à data, permaneciam idiopáticas, assim como, a determinação do diagnóstico definitivo de forma eficaz e menos invasivo.

Para o cumprimento dos objetivos propostos, foi realizada uma revisão narrativa sintetizando os principais achados da literatura, obtida através de bases de dados digitais, pesquisas manuais e livros.

Foram abordadas todas as categorias de doenças que se fazem acompanhar com anemia hemolítica hereditária, nomeadamente, os defeitos da membrana eritrocitária, os defeitos enzimáticos, as hemoglobinopatias, as microangiopatias trombóticas hereditárias, e as anemias deseritropoiéticas congénitas; dando especial enfoque a todos os elementos que podem auxiliar na identificação da patologia em causa.

Um algoritmo a ser usado em todos os doentes em investigação para anemia hemolítica hereditária é proposto na parte final deste projeto.

Palavras-chave: Anemia Hemolítica Hereditária; Anemia Hemolítica Congénita; Hemoglobinopatias; Enzimopatias; Membranopatias; Síndrome de Upshaw-Schulman; Síndrome Hemolítico Urémico Atípico; Anemia Deseritropoiética Congénita; Diagnóstico.

Abstract

The purpose of this project is to revise and update the physiopathological processes that lead to the development of an hereditary hemolytic anemia, as well as establishing a diagnostic algorithm that would be effective in the diagnosis of these patients.

Hereditary hemolytic anemias constitute some of the most common, genetically transmitted diseases of the entire world. Their global panorama is in constant change due to a larger migration mass across populations, observed in the last decades, as due to the development of multiethnic communities. The development of newer diagnostic techniques allowed the elucidation of physiopathological processes of several pathologies that remained idiopathic until now, as well as, achieving definitive diagnosis in a less invasive and more effective way.

To accomplish the proposed goals, a narrative overview synthetizing the findings of literature retrieved from searches of computerized databases, hand searches and books.

Every disease that is accompanied by hemolytic anemia was addressed, such as: membrane disorders, enzymatic disorders, hemoglobinopathies, hereditary thrombotic microangiopathies, and congenital diseritropoietic anemias, giving greater focus to all the elements that can help the identification of a specific pathology.

An algorithm, to be used on every patient being studied for an hereditary hemolytic anemia, is proposed on the final part of this project.

Keywords: Hereditary Hemolytic Anemia; Congenital Hemolytic Anemia; Hemoglobinopathies; Enzymopathies; Membranopathy; Upshaw-Schulman Syndrome; Atypical Hemolytic Uremic Syndrome; Congenital Dyserythropoietic Anemia; Diagnosis.

Índice

1. Introdução.....	7
2. Materiais e métodos.....	10
3. Anemia hemolítica.....	12
3.1. Definição.....	12
3.2. Abordagem clínica.....	12
3.3. Abordagem laboratorial.....	15
3.3.1. Hemograma.....	15
3.3.2. Parâmetros bioquímicos.....	16
3.3.3. Teste de Coombs direto (DAT).....	19
3.3.4. Esfregaço de sangue periférico (ESP).....	20
3.3.5. Outros exames complementares de diagnóstico e tratamento.....	20
4. Membranopatias.....	21
4.1. Composição da membrana eritrocitária.....	21
4.2. Esferocitose hereditária (HS).....	23
4.3. Eliptocitose hereditária (HE).....	32
4.4. Piropoiquilocitose hereditária (HPP).....	33
4.5. Ovalocitose do Sudeste Asiático (SAO).....	35
4.6. Estomatocitose hereditária (HSt).....	36
5. Hemoglobinopatias.....	39
5.1. Hemoglobina: estrutura, função e patologia.....	39
5.2. Hemoglobinas anormais que condicionam hemólise.....	40
5.2.1. Hemoglobinas instáveis (HbX).....	40
5.2.2. Hemoglobinas com solubilidade anormal.....	42

5.2.2.1. Anemia falciforme	43
5.3. Talassémias	48
5.3.1. α -talassémia.....	49
5.3.2. β -talassémia.....	51
5.3.3. $\delta\beta$ -talassémia.....	52
5.3.4. Variantes talassémicas – HbE/ β -talassémia.....	53
6. Enzimopatias	54
6.1. Metabolismo do glóbulo vermelho	54
6.2. Enzimopatias da via glicolítica (Embden-meyerothof) e do <i>shunt</i> Luebering-Rapoport	57
6.2.1. Piruvato Cinase (PK)	58
6.2.2. Hexocinase (HK)	60
6.2.3. Glicose-6-fosfato Isomerase (G6PI)	60
6.2.4. Fosfofruto Cinase (PFK).....	61
6.2.5. Aldolase	61
6.2.6. Triose-fosfato Isomerase (TPI)	62
6.2.7. Fosfoglicerato Cinase (PGK).....	62
6.2.8. Outras enzimas.....	63
6.3. Enzimopatias da via do metabolismo dos nucleosídeos	63
6.3.1. Pirimidina-5'-nucleotidase (P5N).....	62
6.3.2. Adenilato Cinase (AK)	65
6.4. Enzimopatias do metabolismo da glutatona e do <i>shunt</i> das pentoses-fosfato...	65
6.4.1. Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PD)	66
6.4.2. Glutaciona Redutase (GR).....	68

6.4.3.6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGD); γ -glutamil-cisteína-sintetase / Glutamato cisteína ligase (GCL); Glutaciona Sintetase (GS)	69
6.4.4.Outras enzimas	69
7. Microangiopatias Trombóticas Hereditárias (TMA) hereditárias / Anemia Hemolítica Microangiopática (MAHA) hereditária.....	70
7.1. Púrpura Trombocitopénica Trombótica Congénita (TTP congénita)	71
7.2. Síndrome Hemolítico Urémico Atípico (aHUS).....	73
8. Anemia Deseritropoiética Congénita (CDA)	76
8.1. Anemia Deseritropoiética Congénita tipo I (CDA-1)	76
8.2. Anemia Deseritropoiética Congénita tipo II (CDA-2).....	77
8.3. Anemia Deseritropoiética Congénita tipo III (CDA-3)	78
8.4. Variantes CDA	79
9. Conclusão e proposta de um algoritmo de diagnóstico	80
10. Agradecimentos.....	83
11. Referências bibliográficas	84

1. Introdução

Na prática clínica, a anemia é definida por uma diminuição do hematócrito, ou do valor da hemoglobina¹. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define anemia como uma redução da concentração de hemoglobina, dependente do sexo e da idade, sendo necessários valores de hemoglobina inferiores a 13g/dl em homens adultos, e inferiores a 12g/dl em mulheres adultas².

Uma possível forma de classificação da anemia, é a classificação funcional, que a divide em três grandes grupos: defeitos da produção medular (hipoproliferativas), defeitos da maturação do eritrócito (eritropoiese ineficaz) e diminuição da sobrevivência do eritrócito (anemia por hemorragia e anemia hemolítica)².

O glóbulo vermelho (GV) normal é fundamentalmente constituído por hemoglobina, proteínas de membrana especializadas, e vias metabólicas de obtenção de energia; cruciais na manutenção da capacidade de deformabilidade da célula, transporte de O₂ e proteção contra stresse oxidativo. Defeitos em qualquer um dos constituintes básicos do GV levam à redução da sua semivida¹, que habitualmente é de cerca 120 dias³.

A excessiva destruição periférica de eritrócitos, tem como consequência o aumento da produção medular de células eritropoéticas, que migram para o sangue periférico precocemente (reticulócitos), causando uma reticulocitose, alteração comum a todos os doentes com anemia hemolítica. No entanto, apesar da hemólise, a anemia não ocorre em todos os doentes², -dado que a medula óssea (MO) é capaz de compensar pequenas diminuições na sobrevivência do eritrócito, aumentando em até dez vezes a produção de reticulócitos⁴ sendo por vezes condição necessária a presença de outros fatores desencadeantes para causar doença².

A anemia hemolítica pode ser classificada de acordo com o seu tempo de evolução (agudo *versus* crônico), mecanismo (corpuscular *versus* extracorpúscular, imune *versus* não-imune) e local (intravascular *versus* extravascular) da destruição do GV e, finalmente de acordo com a natureza do evento primário – adquirida, ou hereditária^{2,4-6}. É também necessário avaliar a existência de outras comorbidades, por exemplo, a coexistência de uma insuficiência hepática⁵.

Com frequência, os distúrbios adquiridos são mediados imunologicamente, sendo rapidamente identificados através de um teste direto ou indireto de antiglobulina (DAT e IAT), ou através do título das crioglobulinas, para assim detetar a presença de anticorpos hemolíticos ou a destruição de eritrócitos mediado pelo complemento, respetivamente².

Se a presença de marcadores hemolíticos e a negatividade de um teste da antiglobulina aumentam a probabilidade de estarmos perante um distúrbio hereditário, a identificação de uma entidade nosológica específica pode ser mais desafiante, uma vez que, por vezes, duas ou mais entidades partilham a mesma apresentação clínica e hematológica⁷. Por este motivo, uma história pessoal e familiar exaustiva^{2,6}, microscopia para observação da morfologia eritrocitária^{2,5}, marcadores hemolíticos^{5,6}, e com base nestes parâmetros de *screening*, poderemos partir para testes discriminatórios como: estudo de hemoglobinas por focagem isoeletrico ou eletroforese, medição da atividade enzimática, citometria de fluxo, estudos da membrana eritrocitária ou estudos moleculares que podem ser necessários para o diagnóstico diferencial destas patologias⁶.

Apesar das anemias hemolíticas hereditárias estarem entre as etiologias menos comuns de anemia², afetam uma proporção substancial da população pediátrica global, sendo causa de hospitalização de muitas crianças devido a sequelas da doença⁷. Ainda -não obstante à sua prevalência na população pediátrica- a doença pode afetar todos os grupos etários e é caracterizada pela sua grande heterogeneidade clínica^{5,7}.

Pretende-se com este projeto, fazer uma atualização dos mecanismos fisiopatológicos de todas as classes de patologias que se incluem no grupo das anemias hemolíticas hereditárias: defeitos das proteínas da membrana eritrocitária, enzimopatias, hemoglobinopatias, microangiopatias trombóticas hereditárias e, finalmente, as anemias deseritropoiéticas congénitas.

Para além disto, tem-se ainda como objetivo a realização de um algoritmo diagnóstico que, de forma eficaz, permita fazer o diagnóstico de todas as patologias inseridas neste tema de forma a minorar o seu atraso diagnóstico assim como diminuir o custo em exames complementares desnecessários.

2. Materiais e métodos

As fontes de informações usadas para a realização desta dissertação estão apresentadas na **tabela 1**.

Tabela 1: Fontes usadas nesta dissertação.

Pesquisa Pubmed: 2006-2016; key words: ‘hereditary hemolytic anemia’; ‘congenital hemolytic anemia’; ‘hemolytic anemia’; congenital dyserythropoietic anemia’; ‘red cell membrane disorder’; ‘unstable hemoglobin’. Critérios de exclusão usados foram baseados no desenho do estudo (estudos de caso foram excluídos), assim como os artigos cujo principal objetivo era o tratamento destas patologias e com base no abstract do artigo.

Clínical Key: 2006-2016: ‘hereditary hemolytic anemia’; ‘congenital hemolytic anemia’; ‘hemolytic anemia’. Os critérios de exclusão foram os mesmos dos apresentados na pesquisa bibliográfica acima.

A equação de pesquisa usada foi a seguinte: “(((“Anemia, Hemolytic, Congenital/diagnosis”[Mesh] OR “Anemia, Hemolytic, Congenital/etiology”[Mesh] OR “Anemia, Hemolytic, Congenital/physiopathology”[Mesh]) AND (Review[ptyp] AND “2006/06/04”[PDat] : “2016/05/31”[PDat] AND (English[lang] OR Portuguese[lang]))) AND Review[ptyp] AND “last 10 years”[PDat])”. Sendo posteriormente selecionados os artigos que mais se adequem ao trabalho a desenvolver.

Pesquisas manuais das referências bibliográficas dos artigos usados, e selecionados aqueles que se acreditou serem relevantes.

Livros de texto são ocasionalmente citados para providenciar mais detalhes, entre os quais: ‘Longo, D.L.; Fauci, A.S.; Kasper, D.L.; Hauser, S.L.; Jameson, J.; Loscalzo J. eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 19e. New York, NY: McGraw-Hill; 2015’, ‘Hoffbrand, A.

Victor; Higgs, Douglas R.; Keeling, David M.; Mehta, Atul B. *Postgraduate Haematology*, 7e, West Sussex: Wiley Blackwell; 2016.”, e “Hoffman, R., Edward J. Benz, J., Silberstein, L. E., Heslop, H. E., Weitz, J. I., & Anastasi, J. (2013). *Hematology: basic principles and practice*. Philadelphia: Elsevier; 2013.”

3. Anemia Hemolítica

3.1 Definição

O termo hemólise indica uma destruição periférica aumentada dos eritrócitos^{5,7} com consequente diminuição da sua sobrevivência⁵. Esta destruição pode ser devido a causas mecânicas, químicas, autoimunes ou infecciosas e, se for grave o suficiente, pode levar à diminuição dos valores de hemoglobina, e anemia⁵.

Apesar da anemia hemolítica ser caracterizada, por um número elevado de reticulócitos no sangue periférico -reticulocitose- e por marcadores bioquímicos de hemólise², a ausência de reticulocitose nem sempre pode excluir a existência de uma anemia hemolítica⁵. Existem condições hemolíticas em que a reticulocitose compensatória é inadequada, ou ausente^{5,6}, como é o caso das anemias deseritropoiéticas congénitas⁶. Por outro lado, a existência de reticulocitose em sangue periférico, não pode ser vista como sinónimo de hemólise, visto poder estar presente em outras patologias como na hipoxia crónica, na doença pulmonar obstrutiva crónica ou na hemorragia aguda recente⁸. Contudo, a contagem de reticulócitos permanece uma ajuda fundamental tanto no diagnóstico⁸, monitorização da hemólise, resposta à terapêutica, e prognóstico⁵.

3.2 Abordagem clínica

O fenótipo clínico das anemias hemolíticas varia desde indivíduos clinicamente assintomáticos, a condições severas potencialmente fatais³. Estas apresentam-se de diferentes formas, e, de entre as diferentes características, a que mais influencia o quadro clínico do doente é a velocidade de instalação².

O doente poderá apresentar sinais e sintomas relacionados com o decréscimo da hemoglobina: palidez, cansaço, tonturas, taquicardia, sopro sistólico⁷; devido à destruição de

eritrócitos: icterícia⁷, alteração na cor da urina (colúria)⁵, esplenomegalia^{4,7}, litíase biliar; como consequência do aumento de produção de GV: expansão da MO com alterações morfológicas^{2,4}; e ainda, relacionados com o processo principal pela qual a hemólise ocorre, como por exemplo: acidente isquémico transitório ou acidente vascular cerebral, na anemia falciforme^{4,7}.

Como referido anteriormente, uma das formas de classificação da anemia hemolítica, é a caracterização do seu local de destruição (intravascular ou extravascular)^{2,4-6}; salvo algumas exceções, a hemólise intravascular está maioritariamente associada a patologia adquirida⁷, e esta pode-se manifestar por diminuição, ou ausência da haptoglobina (marcador de hemólise intravascular)⁵. Apesar de poderem ocorrer crises hemolíticas agudas (défice glicose-6-fosfato desidrogenase, ou anemia falciforme), se a patologia for de origem hereditária, os doentes normalmente apresentam-se com doença de longa duração^{1,2}, e podem ser observados estigmas de hemólise crónica, como a presença de cálculos biliares pigmentados (e complicações destes)⁷ ou esplenomegalia^{2,4}. O quadro clínico do doente pode ainda ser totalmente inocente, sem sinais ou sintomas de hemólise ou anemia, e o diagnóstico ser apenas conseguido através do esfregaço de sangue periférico, como é o caso da eliptocitose hereditária, em adultos⁶.

A maior parte das patologias hemolíticas adquiridas são imunologicamente mediadas, sendo relativamente fáceis de detetar através de exames laboratoriais simples². O desafio prende-se na exclusão de causas adquiridas não-imunes, entre as quais: hemoglobinúria paroxística noturna, secundária a infeções (através de múltiplos mecanismos fisiopatológicos) (**tabela 2**), a fármacos, a microangiopatias trombóticas adquiridas, a válvulas cardíacas mecânicas ou a hiperesplenismo⁶. A presença de hemoglobinúria, dor abdominal, hipertensão pulmonar ou episódios trombóticos podem sugerir o diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna; doença hepática, alterações neuropsiquiátricas e anemia hemolítica não

imune podem estar presentes na doença de Wilson; febre cíclica, esplenomegalia, anemia hemolítica e trombocitopenia pode ser indicativo de infecção parasitária por *Plasmodium* (que é provavelmente a causa mais comum de anemia hemolítica a nível mundial⁶); finalmente, as microangiopatias trombóticas adquiridas podem ser secundárias a fármacos, neoplasias, gravidez, infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana) e DIC (coagulação intravascular disseminada) ⁶.

Tabela 2. Microrganismos que podem estar associados a hemólise. Adaptado de [5]

<i>Aspergillus</i>	<i>Mycoplasma Pneumoniae</i>
<i>Escherichia Coli</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Shigella dysenteria</i>
<i>Leptospirans interrogans</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Toxoplasma spp.</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
Epstein-barr vírus	Vírus da pneumonia atípica
Coxsackie vírus	Citolomegavirus
Herpes simplex	Influenza A vírus
Rubéola vírus	Varicela vírus

A distinção entre causa adquirida e hereditária pode então ser conseguida através de uma anamnese e história familiar cuidadosa⁵. Desta forma, o questionário sistemático e abrangente torna-se de grande importância na orientação destes doentes.

3.3 Abordagem laboratorial

Os exames laboratoriais são uma ajuda inestimável na confirmação da doença hemolítica, exclusão de doença adquirida e diagnóstico de uma entidade nosológica específica.

3.3.1 Hemograma

Como já foi referido anteriormente, a anemia é caracterizada por uma diminuição do hematócrito (Ht) ou do valor da hemoglobina (Hb)¹ que se define, segundo a OMS, em função do sexo e da idade; em adultos define-se anemia com um valor de Hb inferior a 12g/dl em mulheres e inferior a 13g/dl em homens².

O valor da hemoglobina é o marcador mais representativo da severidade clínica, podendo estar dentro de valores próximos do normal, ou moderada a severamente reduzida. Um decréscimo rápido nos valores de hemoglobina origina sintomas relevantes ao passo que, diminuição crónica e progressiva pode ser melhor tolerada⁵.

Os índices eritrocitários como o volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM)) são parâmetros essenciais na avaliação da doença. Alterações na HGM e CHGM podem indicar uma alteração do volume e do estado de hidratação da célula e auxiliar na identificação de determinados defeitos como a esferocitose hereditária ou a estomatocitose hereditária^{3,6,9}, o VGM é um parâmetro chave na classificação da anemia^{1,2}. O coeficiente de variação eritrocitária (RDW) é um outro índice, que reflete a variação do tamanho celular da população eritrocitária, parâmetro de grande utilidade no diagnóstico diferencial de anemia¹⁰.

As anemias hemolíticas são geralmente classificadas como normocíticas, ou microcíticas (se se tratar de uma α ou β -talassémia)¹, podendo ser classificadas como macrocíticas quando a elevação do número de reticulócitos em sangue periférico é

marcada^{1,2,8} (por cada aumento de 1% de reticulócitos em sangue periférico haverá um aumento de cerca de 1% no VGM)⁸.

Os reticulócitos são os precursores imediatos dos GV (com maior volume que estes), representando apenas uma fração dos GV periféricos, sendo um índice da atividade eritropoiética da MO⁵. A reticulocitose é um importante marcador de hemólise, com valores absolutos a ultrapassar 100×10^9 células por litro^{7,10}. Nas condições hemolíticas hereditárias, mais crônicas, o valor de reticulócitos pode estar ligeiramente aumentado, contudo pode elevar-se de forma dramática no contexto de crises hemolíticas agudas⁵. A resposta reticulocitária pode não ocorrer se concomitantemente existirem outras patologias como: infecção por parvovirus B19, falência da MO¹, défices nutricionais severos⁷, ou síndromes deseritropoiéticas⁵.

Existem ainda outras condições patológicas e fisiológicas em que a reticulocitose pode ocorrer, como é o caso da hemorragia aguda, suplementação de ferro ou vitamina B12 e/ou folato em doentes com défices nutricionais severos¹ ou no parto⁵.

A diminuição do número de plaquetas poderá também ser indicativo de determinadas patologias, como por exemplo microangiopatias trombóticas (quer adquiridas, quer hereditárias) ou hiperesplenismo (que ocorre frequentemente no contexto de patologia hereditária das proteínas da membrana do GV)⁵.

3.3.2 Parâmetros bioquímicos

A destruição periférica de GV tem parâmetros bioquímicos únicos (**tabela 3**), quando comparado a outras etiologias de anemia⁵. Os aspetos laboratoriais da hemólise vão depender das consequências do aumento da destruição e produção de GV, assim como, do processo principal pela qual a destruição ocorre⁴.

Tabela 3: Marcadores de hemólise em diferentes anemias hemolíticas, adaptado de [4]

	Membranopatias/enzimopatias	Anemia desritropoiética congénita	Microangiopatias trombóticas
Hemoglobina	-/-	--/---	--/---
Reticulócitos	+ até +++	-/=	+
Esquizócitos	=	=	++
LDH	+	+	++
Haptoglobina	---	--	-
Bilirrubina	++	+	+
Ferritina	++	+++	=/+
Plaquetas	=/-	=	--
Contagem de Leucócitos	=	=	=
Hemosiderinúria	=	=	=/+

Os valores são expressos em formato semiquantitativo para indicar a diferente intensidade da alteração em várias síndromes hemolíticas, como: "+"/"++"/"+++" indica um aumento de intermédio a severo, "-"/"--"/"---" indica uma redução, e "=" indica valores dentro do intervalo de normalidade.

A lactato desidrogenase (LHD) é uma enzima citoplasmática presente em múltiplos órgãos e sistemas, incluindo no eritrócito. É um marcador inespecífico de hemólise, e é capaz de fornecer pistas diagnósticas acerca do local desta⁵. Dependendo do grau de aumento da enzima, é possível classificar a anemia hemolítica em intravascular (aumento significativo de LDH) ou extravascular (aumento ligeiro da enzima)⁶.

Devido a grande distribuição desta enzima, pode também estar elevada em contextos de necrose celular ou em patologias com aumento do *turnover* tecidual (enfarte agudo do miocárdio)⁵.

Outro parâmetro cujo aumento pode ser indicativo de hemólise, é a bilirrubina (especificamente, a fração não conjugada)^{5,7}. A grande maioria da bilirrubina em circulação é originária da degradação da hemoglobina (grupo heme) no sistema reticuloendotelial (SRE) e, deste modo, pode ser usada como um marcador indireto de hemólise extravascular (mediada pelo SRE⁷)^{1,5}.

Se se correlacionar a bilirrubina indireta com a hemólise extravascular (mediada por células fagocíticas)¹, então a haptoglobina pode ser usada como marcador sensível de hemólise intravascular¹. A haptoglobina é uma molécula de grande relevo no diagnóstico de hemólise; representando o parâmetro mais sensível para doença hemolítica, e o último a normalizar após instituição de tratamento⁵. Trata-se de uma glicoproteína com propriedades

antioxidantes e imunomoduladoras, e atua como uma proteína de limpeza, ligando-se irreversivelmente à hemoglobina livre circulante (libertada durante a lise do GV). Os complexos formados são então removidos pelo SRE prevenindo a formação de radicais livres^{1,5}. Esta proteína encontra-se diminuída ou indetectável nas anemias hemolíticas intravasculares, no entanto, no contexto de hemólise extravascular severa (onde uma ligeira lise intravascular de eritrócitos estruturalmente alterados que escapam à remoção pelo SER pode ter lugar), esta pode estar também reduzida⁵. Por outro lado, e por se tratar de uma proteína de fase aguda, pode-se encontrar aumentada em doenças inflamatórias, apesar da hemólise, mascarando-a^{1,5}.

A hemosiderinúria é outro marcador relativamente específico de hemólise intravascular. A presença de ferro no sedimento urinário (detetada através da coloração do azul da Prússia ou Perls)¹ é indicador de libertação de hemoglobina em quantidades grandes o suficiente para exceder a capacidade de fixação da haptoglobina⁵. A nível renal, o ferro é removido do heme e armazenado sob a forma de ferritina⁵ ou depositado na forma de hemossiderina^{1,5}. Quando ocorre descamação das células do túbulo contornado proximal, a hemossiderina é excretada na urina^{1,5}. Este fenómeno ocorre em contextos compatíveis com hemólise severa, como é o caso da hemoglobinúria paroxística noturna, hemoglobinúria da marcha, crise hemolítica na deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase e em queimaduras severas⁵. É observado 3 a 4 dias após início do episódio hemolítico e persiste por várias semanas⁵.

Finalmente, a ferritina, também uma proteína de fase aguda, intracelular, cuja função principal é o armazenamento de ferro. Pode-se encontrar aumentada em todas as anemias hemolíticas hereditárias. Ainda que o mecanismo concreto deste aumento não seja claro, sugere-se que o ferro libertado pela hemólise extravascular seja de eliminação difícil, e que a própria anemia funcione como um poderoso estímulo à sua absorção⁵.

Apesar de nenhum exame individual ser específico de hemólise, a combinação da elevação de LDH com um nível baixo de haptoglobina, tem uma sensibilidade de 90% para a confirmar. Por outro lado, LDH normal e haptoglobina com níveis superiores a 25mg/dl exclui doença hemolítica com sensibilidade superior a 90%^{1,5}. Independentemente da sua utilidade, a haptoglobina não pode ser usada como um marcador fiável em crianças com menos de 3 anos de idade⁷.

3.3.3 Teste de Coombs direto (DAT)

Este exame é fundamental na distinção de causas de hemólise, hereditárias de adquiridas, uma vez que uma proporção significativa das anemias hemolíticas de causa adquirida são imunologicamente mediadas². O teste de Coombs é capaz de detetar anticorpos IgG (típicos das anemias hemolíticas a quente) ou a fração C3 do complemento (típicos das anemias hemolíticas a frio) que revestem os eritrócitos nestas doenças^{1,2,5,7,10}. Este teste é capaz de diagnosticar grande parte das anemias hemolíticas e a sua relevância é indiscutível, porém aproximadamente de 0.1% da população geral e 8-10% dos doentes hospitalizados irão obter testes positivos, mesmo sem evidência clínica de hemólise^{1,10}. Contudo, um DAT negativo não pode também excluir doença hemolítica imunologicamente mediada, visto que em alguns casos, o uso de outros exames mais sensíveis terá resultados positivos¹⁰. Baixos títulos de anticorpos, sobrediluição da amostra ou anticorpos de baixa afinidade (IgA, ou células natural killer⁷) poderão estar na origem destes falsos negativos^{1,7}.

O uso de testes laboratoriais mais complexos no diagnóstico de anemias hemolíticas autoimunes DAT-negativas está para além do objetivo deste trabalho. Este subgrupo de patologias pode ainda ser diagnosticado com base na resposta a terapêutica imunomoduladora empírica¹.

3.3.4 Esfregação de sangue periférico (ESP)

Não obstante à utilidade dos meios complementares de diagnóstico (MCD) supracitados, a análise correta do ESP permanece um dos procedimentos diagnósticos mais informativos, e o primeiro a ser utilizado após a história clínica e o exame objetivo¹⁰.

Revela alterações morfológicas únicas que ocorrem com os vários tipos de distúrbios hemolíticos hereditários e que serão absolutamente fundamentais para o diagnóstico destes^{10,11}, permite avaliar inclusões intraeritrocitárias patognômicas -como as que ocorrem no caso da malária- e possibilita a avaliação de outras linhagens celulares¹⁰.

A observação do ESP permite também ultrapassar algumas limitações dos contadores automáticos como a identificação de eritroblastos *versus* linfócitos¹⁰ ou a perda de linearidade entre a relação do Ht e Hb, e número de GV, aquando da presença de aglomeração eritrocitária nas anemias hemolíticas a frio⁸.

Todas estas alterações serão discutidas em pormenor nos capítulos seguintes.

3.3.5 Outros exames complementares de diagnóstico

Apesar das técnicas anteriormente citadas serem capazes de fazer o diagnóstico de muitas patologias, estão ao dispor do clínico, outros exames complementares mais complexos que vão permitir um estudo mais aprofundado, como por exemplo: eletroforese das hemoglobinas, medição da atividade enzimática, citometria de fluxo, estudos de proteínas de membrana, estudo genético, ou até mesmo medulograma e biópsia óssea.

4. Membranopatias

4.1. Composição da membrana eritrocitária

A membrana eritrocitária é uma das mais bem estudadas, quer em termos de estrutura, função, ou distúrbios genéticos¹². Não se trata de uma estrutura estática, mas sim, altamente dinâmica¹³. As proteínas que a constituem têm múltiplas funções essenciais ao funcionamento da célula: controlam a resistência, deformabilidade, e o estado de hidratação desta^{3,6,9}. Para além do seu papel na estrutura celular, as proteínas de membrana tem ainda função de transporte, adesão, e antigénica⁹. A extensa deformabilidade da célula, que lhe permite a realização das suas funções fisiológicas durante o seu tempo de vida, é feita à custa da sua complexa, ordenada e específica organização estrutural⁹.

Uma possível e simplificada forma de caracterizar todas as interações que existem na membrana do eritrócito é através da sua classificação em ligações verticais e horizontais. As verticais são aquelas que são perpendiculares à bicamada lipídica, e tratam-se das proteínas envolvidas nos complexos de banda 3, anquirina e 4.1R; a perda destas ligações leva à perda da coesão membranar, formação de vesículas e diminuição da área de superfície^{9,10,14}. As ligações horizontais são aquelas paralelas à bicamada lipídica e incluem o local de associação dos heterodímeros de espectrina em tetrâmeros, assim como todas as interações que ocorrem no complexo juncional¹⁰; as proteínas que formam o complexo juncional, têm um papel chave na regulação da deformabilidade, estabilidade mecânica do eritrócito, e integridade em resposta a forças de cisalhamento (encontradas na vasculatura humana)^{9,10,12}.

Este modelo tem particular utilidade na caracterização dos distúrbios relacionados com a membrana¹⁰.

A bicamada lipídica (ocasionalmente penetrada por outras proteínas) é assimétrica^{12,15} e encontra-se unida às proteínas do citoesqueleto pelos complexo da anquirina, e da proteína 4.1R^{3,9} (**Figura 1**).

O complexo anquirina é composto por tetrâmeros de proteína de banda 3 (trocaador aniônico, de iões de cloro e bicarbonato), antigénios do grupo sanguíneo, CD47, glicoforina A, e pelo antigénio de Lansteiner Wiener. Para além destas, está presente ainda a proteína 4.2 que medeia a interação da proteína de banda 3, entre o citoesqueleto e a bicamada lipídica⁹.

No complexo 4.1R (ou juncional) estão presentes dímeros de banda 3, antigénios de grupos sanguíneos, glicoforina C/D, e p55, entre outras^{9,10,12}.

Por sua vez, o citoesqueleto de espectrina é formado por tetrâmeros de espectrina, composto por dois heterodimêros, α e β , articulados. As porções distais dos tetrâmeros de espectrina conectam-se à proteína 4.1R, à aducina, à proteína de banda 4.9 (dematina), à tropomiosina, e à tropomodulina, entre outras^{9,10,12}.

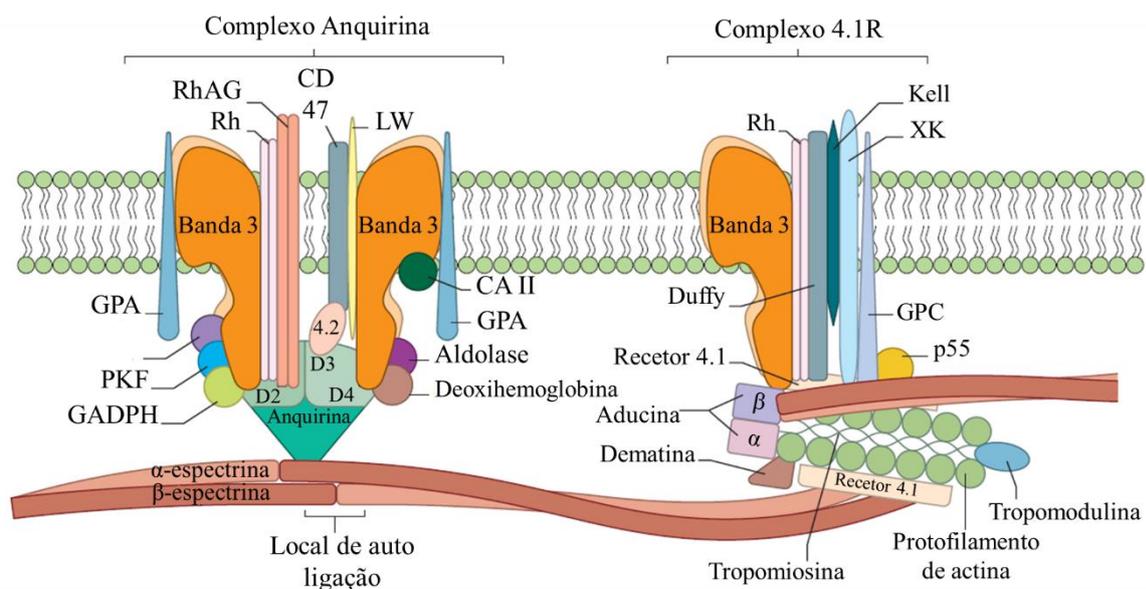


Figura 1: Estrutura da membrana eritrocitária. Adaptado de [10]

Os mecanismos que permitem ao eritrócito manter a sua forma bicôncava ainda não estão completamente esclarecidos¹⁶.

As mutações que afetam a membrana eritrocitária são frequentemente causa de anemia hemolítica; são múltiplas e heterogêneas, contudo, o seu efeito no fenótipo pode ser classificado segundo quatro categorias: (i) esferocitose hereditária (HS), (ii) eliptocitose hereditária (HE) e a sua forma severa, piropoiquilocitose hereditária (HPP), (iii) ovalocitose do sudeste asiático (SAO), e (iv) estomatocitose hereditária (HSt).^{4,13}.

4.2 Esferocitose Hereditária (HS)

A HS é a membranopatia mais frequente no mundo^{3,6,9,12}, e a anemia hemolítica hereditária mais comum entre indivíduos do norte da europa^{11,14-16}. Estima-se, que sensivelmente 1% da população mundial, tenha um alelo mutado um defeito que cause HS, sendo completamente assintomático¹⁴.

A maior parte dos casos de HS são devido a um défice de banda 3, anquirina, proteína 4.2, ou α ou β -espectrina (**figura 1.**)^{3,6,9,11,12,16}. Em aproximadamente 70-80% dos casos, o defeito genético é herdado segundo um padrão de transmissão autossómico dominante (anquirina, banda 3, e β -espectrina)^{3,9,11,16-18}. Nos restantes 20-30% é transmitida com padrão não dominante (envolvendo mais frequentemente a proteína 4.2, e α -espectrina)^{6,11,12,14,17,18}. Através da eletroforese em gel, os defeitos proteicos na HS foram classificados segundo seis categorias: (1) deficiência isolada em espectrina; (2) deficiência combinada em espectrina e anquirina (mais comum na europa); (3) deficiência da banda 3 (presente em um terço dos doentes); (4) deficiência na proteína 4.2; (5) deficiência no complexo Rh (raro); (6) defeito não identificado¹⁴.

A doença é causada por mutações que afetam o acoplamento entre o citoesqueleto e a bicamada lipídica (interações verticais⁹), levando à instabilidade da membrana e consequente

vesiculação, traduzida por: diminuição do ratio superfície/volume (e formação de células em forma de esfera⁹), desidratação (com aumento do CHGM para valores >360g/L¹¹), e redução da deformabilidade, com conseguinte sequestração de células no baço e ulterior fagocitose por macrófagos esplênicos^{3,6,9,11,12,15}. O conteúdo das vesículas libertadas varia com o defeito molecular em causa: defeitos na anquirina, espectrina ou proteína 4.2 reduzem a densidade do citoesqueleto e originam microvesículas enriquecidas em proteína de banda 3; pelo contrário, se o defeito ocorrer na banda 3, as microvesículas vão ser deficitárias nesta molécula, levando à sua aglomeração na membrana do eritrócito, facilitando a opsonização in vivo por IgG, e aumentando a *clearance* imunomediada destes (**figura 2**)^{3,14}.

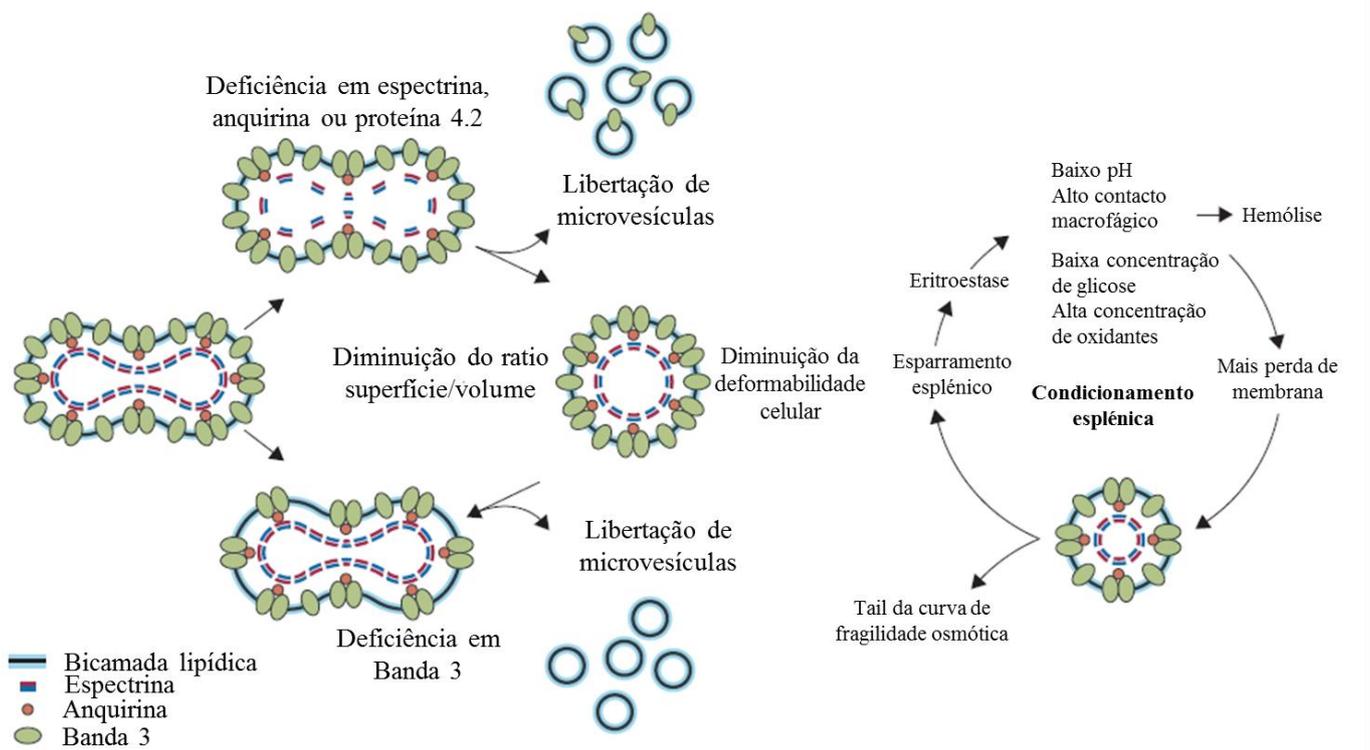


Figura 2: Fisiopatologia da HS. Adaptado de [15]

A expressão clínica desta patologia é relativamente uniforme entre a mesma família (a não ser que esteja envolvido outro defeito co-herdado¹⁴), no entanto a severidade da doença varia significativamente entre famílias¹⁸, devido à expressão desigual dos alelos mutados,^{6,14} pode-se apresentar em qualquer idade (inclusive no período fetal, se doença severa⁹) mas é mais frequentemente diagnosticada na infância^{9,11,16}. Na maior parte dos recém nascidos, não há sinais de anemia até às 3 semanas de vida, altura em que os valores de Hb decrescem rapidamente; até um quarto destas crianças necessitarão de transfusão sanguínea ao primeiro ano de vida¹⁴.

Um quarto dos doentes têm doença compensada com valores de Hb normais e reticulocitose, podendo apenas apresentar sintomas em contexto infeccioso ou gravidez^{6,11,14-18}. Cerca de dois terços dos doentes têm doença hemolítica moderada, palidez, icterícia (sinal mais importante no período neonatal⁹ e comumente associada a infeção viral ou outro stress¹¹), esplenomegalia, cálculos biliares, e, alguns doentes com mutação na proteína de banda 3, podem apresentar-se com pseudohipercalemiemia^{6,9,11,14,18}. Os restantes 10% têm doença severa com níveis de hemoglobina persistentemente baixos e necessidade de transfusões intermitentes^{11,14}; dentro destes, aproximadamente um terço demonstra doença muito severa, com valores de Hb inferiores a 60g/l e necessidade de transfusões regulares; este subgrupo de doentes tem, quase invariavelmente, doença não dominante (**tabela 4**)¹⁴.

Tabela 4: Classificação da esferocitose hereditária. Adaptado de [9,11,14,18]

Gravidade da doença	Ligeira	Moderada	Moderadamente severa	Severa
Hemoglobina (g/l)	110-150	80-120	60-80	<60
Reticulócitos (%)	<6	>6	>10	>10
Bilirrubina (µmol/L)	17.1-34.2	>34.2	>34.2	>51.3
ESP	Esferócitos ocasionais	Esferócitos	Esferócitos	Esferócitos e anisopoiquilocitose
Hereditariedade	AD	AD	AD	AR

No hemograma, observa-se que a maioria dos doentes tem valores de hemoglobina compreendidos entre 80-150 g/l (doença ligeira a moderada), reticulocitose em sangue periférico e o VGM está normal -ou ligeiramente diminuído. Em situações de doença severa, o VGM pode estar diminuído -apesar da marcada reticulocitose-, refletindo a exuberante perda de membrana, que também explica o aumento da HGM (410g/l) e da CHGM (>360 g/l); o RDW encontra-se também elevado (>14)^{9,11,17}. Dois outros parâmetros que poderão ser úteis no diagnóstico diferencial de HS e anemia hemolítica autoimune (AIHA), são o VGMr e HGMr (VGM e HGM reticulocitário), que se encontram reduzido e aumentado (respetivamente) na HS, mas não na AIHA^{9,14}.

São também encontradas alterações laboratoriais compatíveis com hemólise, como o aumento da bilirrubina, LDH e diminuição da haptoglobina^{9,11}. A hiperbilirrubinémia pode ser complicada pela presença do síndrome de Gilbert, que aumenta a severidade e frequência desta, dando a falsa impressão de maior gravidade da hemólise^{14,18}. A combinação destes parâmetros com um teste de Coombs direto negativo é o passo inicial e necessário à investigação de um diagnóstico hereditário de anemia⁹.

No ESP, observam-se esferócitos (células densas, redondas, hipercrômicas, sem palidez central¹⁴) (**figura 3**), que apesar de auxiliarem o diagnóstico, não são específicos uma vez que surgem também noutras situações mais frequentes como as anemias hemolíticas autoimunes⁹, ou em situações mais raras, como por exemplo na hiperfosfatémia severa^{3,6,11}.

A severidade da doença está diretamente relacionada com a extensão de área de membrana perdida e, conseqüentemente, com a extensão da esferocitose⁹. Apesar do esferócito ser a célula predominante em ESP, determinadas mutações estão associadas ao surgimento de ocasionais células de morfologia distinta: mutação na banda 3 e células em cogumelo, mutação na proteína 4.2 e ovalócitos e estomatócitos, mutação das proteínas do

complexo Rh e estomatócitos, mutação na β -espectrina e acantócitos (**figura 3.**), e mutação na α -espectrina e poiquilócitos^{9,12,14}(associada a doença severa^{11,12}).

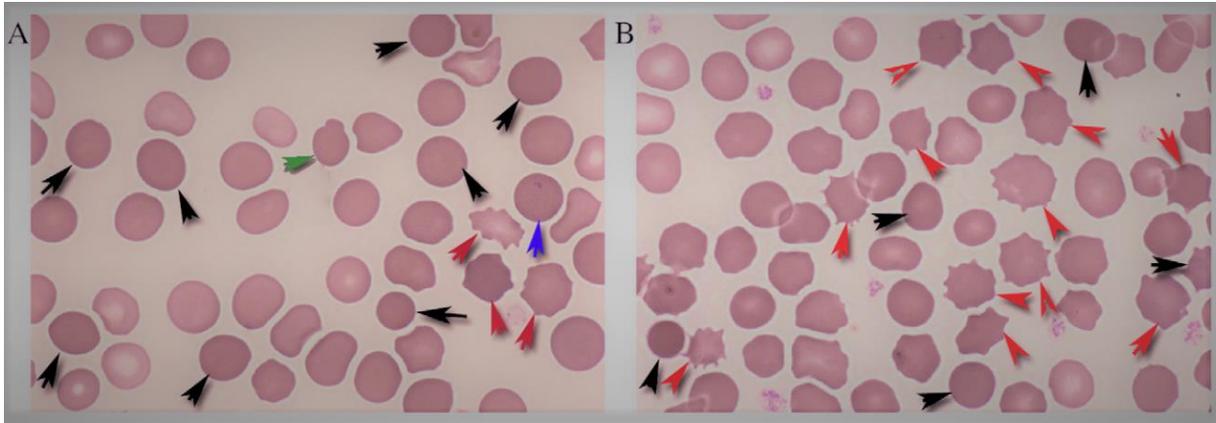


Figura 3: Esfregaço de sangue periférico em doente com HS. A) observa-se uma célula em cogumelo, clássica da deficiência da banda-3 (seta verde), associadas a células esferocítica típicas (setas pretas), alguns acantócitos (setas vermelhas) e um eritrócito basofílico (seta azul), devido ao stress hematopoiético. B) defeitos na β -espectrina com numerosos acantócitos (setas vermelhas) em associação a esferócitos (setas pretas). Adaptado de [13]

Apesar do diagnóstico ser possível através da análise da história familiar e do esfregaço de sangue periférico, conta-se também com testes especializados para auxiliar o diagnóstico desta entidade^{9,11}. Estes exames são particularmente importantes quando não existe história familiar sugestiva, ou a clínica não é típica¹⁸.

O teste de fragilidade osmótica (OF) mede a lise eritrocitária *in vitro* em soluções de osmolalidade decrescente. A sensibilidade deste é de apenas 61%⁹, aproximadamente 25% dos doentes com HS têm resultados normais (com amostras de sangue fresco), e pode-se obter um resultado positivo em qualquer outra patologia em que os esferócitos estejam presentes, limitando a sua utilidade^{11,14}. Atualmente, o uso rotineiro deste, não está recomendado^{9,18}.

O teste da lise pelo glicerol acidificado (AGLT) determina o intervalo de tempo necessário para que a lise de 50% das células em amostra ocorra, em soluções de glicerol com pH de 6.85^{15,16}. À semelhança do teste OF, este não distingue HS de outras patologias que

cursem com a formação de esferócitos¹⁶, mas a sua sensibilidade é comparável com o teste da eosina-5-maleimida (EMA)¹⁸.

O teste da criohemólise baseia-se na (específica) suscetibilidade dos esferócitos à hemólise em soluções hipertônicas quando ocorre rápida descida da temperatura de 37°C para 0°C¹⁶. É um bom teste de rastreio para a HS pelos seus altos valores preditivos¹⁸.

O teste da eosina-5-maleimida (EMA) (**figura 4**), é uma prova de citometria de fluxo que se baseia na quantificação relativa de fluorescência média, que vai depender do número de proteínas de banda 3 presentes na membrana^{9,11}. A diminuição não só de banda 3, mas também de anquirina e β -espectrina levam a uma redução da intensidade da fluorescência¹¹ e é considerado positivo se se verificarem diminuições na fluorescência superiores a 21% (no entanto este *cut-off* é motivo de muito debate). Valores de diminuição de fluorescência >15% e <21% devem ser objeto de investigação adicional^{9,13,15}. Tem alta sensibilidade e especificidade, é simples, de rápida execução, e não está dependente do fenótipo da doença, obtendo-se resultados positivos mesmo em doentes com hemólise compensada^{9,11,13}. Este exame deteta HS provocada por qualquer defeito de membrana a ela associado^{9,13}. Todavia, de salientar que existem outras patologias que reduzem a intensidade da fluorescência emitida (anemia deseritropoiéticas congénita tipo II, ovalocitose do sudeste asiático, e piropoiquilocitose hereditária)¹¹, que fazem diagnóstico diferencial com a HS pelo ESP, pelo que este exame permanece como a ferramenta de diagnóstico de escolha no rastreio de HS¹³.

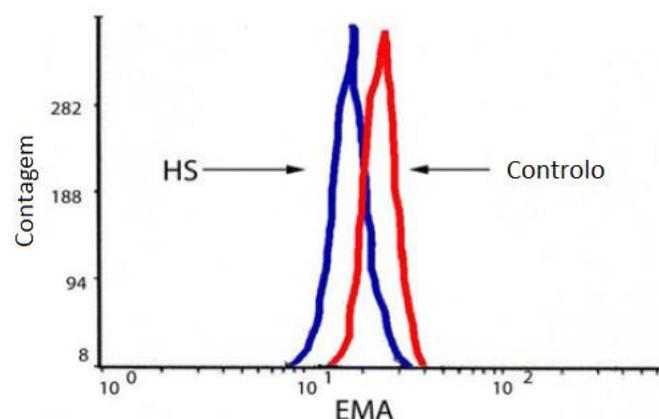


Figura 4: Teste de fixação da EMA. Adaptado de [14]

A Ectacitometria é uma outra técnica possível no diagnóstico desta patologia⁹, tão sensível e específico quanto o teste do EMA¹⁸. O ectacitómetro é uma técnica viscométrica, em que a deformabilidade das células é avaliada como uma equação contínua, que varia em função da osmolaridade⁹ (**figura 5**). Na HS, o índice de alongamento máximo (Elmax) está diminuído, a osmolaridade no ponto de alongação mínima (Omin) sofre um desvio para a direita e a osmolaridade no ponto igual a Elmax/2 (O') sofre um desvio para a esquerda (traduzindo a diminuição no ratio superfície/volume e o aumento da desidratação celular)^{9,13,19}. Para se poder firmar o diagnóstico de HS, o Omin tem que sofrer um desvio para a direita por mais de 21.5% e o AUC (área sobre a curva) tem que diminuir pelo menos 18.5%, com valores preditivos positivos de 94 e 93% respetivamente¹⁹. Valores alterados de O' não são estatisticamente significativos^{9,19}. As principais limitações deste exame é a insuficiente disponibilidade do aparelho⁹, e a incapacidade de análise até 3 meses após transfusão sanguínea¹³. Apesar deste método não permitir a distinção da HS e da AIHA, a grande vantagem é a capacidade de distinção entre diferentes tipo de membranopatias¹⁹. No entanto só existem 2 ectacitómetros a nível Europeu (França e Alemanha) que apresentam a enorme desvantagem de só processarem amostras a fresco (< 16h após a colheita) o que se torna uma limitação para todos os países.

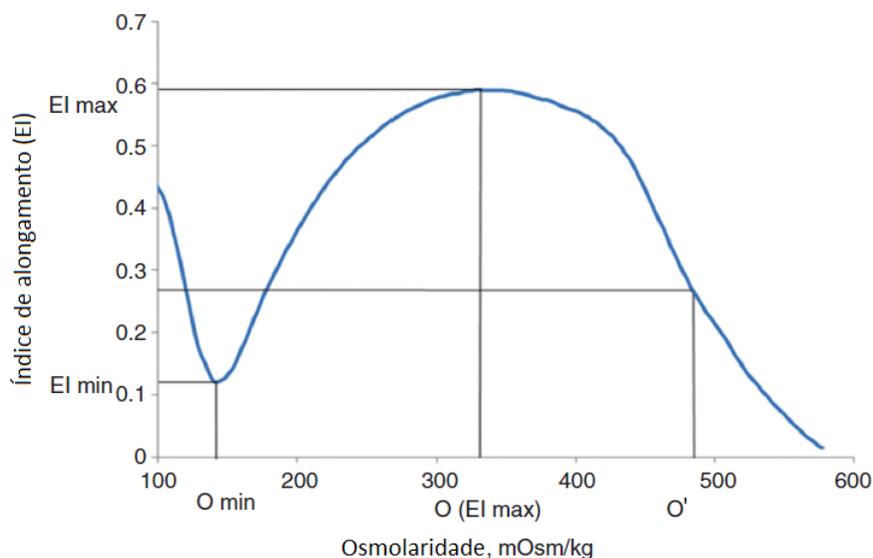


Figura 5: Curva de ectacitometria de um GV normal. Adaptado de [19]

O SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) permite detetar a proteína atingida na maior parte dos casos de HS⁹. A sua utilização está indicada quando: os testes de *screening* são equívocos, se pretende fazer diagnóstico pré-natal ou quando existe desproporcionalidade entre o fenótipo e as provas laboratoriais^{9,18}. Em cerca de 8-11%, o defeito não poderá ser identificado, especialmente em portadores assintomáticos ou doentes com HS muito ligeira^{9,15,16}. Se o defeito envolver a anquirina, este deve ser avaliado em conjunto com a contagem de reticulócitos, pois estas células apresentam em grande número esta proteína, podendo mascarar o defeito genético subjacente^{12,16}.

A identificação molecular direta da mutação em causa, através de técnicas de PCR (*polymerase chain reaction*), é também possível em doentes não diagnosticados, com doença severa; porém, uma vez que a maior parte das proteínas envolvidas são codificadas por genes de grandes dimensões, e com múltiplos exões, esta análise nem sempre é exequível¹⁴. Alternativamente, os genes candidatos podem ser identificados através da comparação do DNA genómico e mRNA reticulocitário (sob a forma de cDNA); este método é útil na identificação de mutações de *frameshift* ou *nonsense* -não produzem RNA mutante, ou proteína-, pelo que a comparação do DNA genómico com o RNA/cDNA, é capaz de comprovar a existência de um alelo nulo¹⁴.

O diagnóstico de HS não exige a confirmação da mutação genética do gene envolvido¹⁸.

Apesar de muitos exames distintos estarem ao alcance do clínico, não existe nenhum que consiga diagnosticar 100% dos casos de HS¹⁶ e, a positividade num destes, deve ser sempre confrontada com a clínica e com o ESP¹⁸ (**tabela 5**). Segundo as *guidelines* internacionais devem ser usados dois testes de *screening* em conjunto¹⁵: o EMA e o AGLT ou o teste da criohemólise. Dada a facilidade de diagnóstico pelos testes Gold-standard, o diagnóstico de HS continua a ser rápido e fácil de realizar.

Tabela 5: testes de rastreio no diagnóstico diferencial da HS e outras doenças do eritrócito associadas à membrana. Adaptado de [15, 16, 18]

<u>Diagnóstico</u>	<u>OF</u>	<u>AGLT</u>	<u>Ectacitometria</u>	<u>Criohemólise</u>	<u>Fixação de EMA</u>
<u>Esferocitose hereditária</u>	Aumento	Diminuição do tempo de lise (<900s)	Perfil HS	Aumento	Diminuído
<u>Anemia hemolítica autoimune</u>	Normal/Aumento	Diminuição do tempo de lise	Perfil HS	?	Normal/Aumentado
<u>Esferocitose Hereditária (não hemolítica)</u>	Normal	Normal	Perfil HE	?	Normal
<u>Piropoiquilocitose hereditária</u>	Aumento	Diminuição do tempo de lise	Perfil distinto	?	Muito diminuído (abaixo do intervalo da HS)
<u>Estomatocitose hereditária hiperhidratada</u>	Aumento	?	Perfil distinto	?	Aumentado
<u>Estomatocitose hereditária desidratada</u>	Diminuída	Tempo de lise normal	Perfil distinto	?	Normal/Aumentado
<u>Criohidrocitose</u>	?	?	? ¹⁵ /Perfil distinto	?	Diminuído (dentro do intervalo HS)
<u>Anemia deseritropoiética congénita tipo II</u>	Aumento	Normal/diminuição do tempo	Não deformável/perfil <i>HS-like</i>	Normal/Aumentado	Normal/diminuído (dentro do intervalo HS)
<u>Ovalocitose do sudeste asiático</u>	Diminuição da fragilidade	?	Não deformável/padrão distinto	Aumento	Diminuído (dentro do intervalo da HS)

4.3 Eliptocitose Hereditária (HE)

A eliptocitose hereditária é a membranopatia mais comum em regiões endêmicas da malária^{6,16,20}, presumivelmente, porque os eliptócitos conferem resistência a esta doença^{11,20}. A sua verdadeira incidência é desconhecida¹¹.

É causada por mutações nos genes da α (60%²⁰) e β -espectrina (mais frequente em doentes de raça negra¹⁵), da proteína 4.1 (mais frequente em doentes caucasianos¹⁵), ou da glicoforina C/D¹¹, transmitidas de forma dominante^{3,6,16}, com casos raros relatados de mutações *de novo*¹¹.

Estas mutações afetam o citoesqueleto celular, interferindo no processo de dimerização da espectrina, ou alterando a função do complexo juncional (interações horizontais)⁹. Os defeitos genéticos podem levar a erros quantitativos, originando uma redução da expressão de genes que codificam a proteína normal, ou qualitativos, criando alterações das proteínas supracitadas, e resultando num aumento da fragilidade eritrocitária face a forças de cisalhamento^{3,6}. O desenvolvimento da suscetibilidade do GV a estas, leva a fragmentação e perda de membrana, com conseqüente progressiva transformação do GV para uma morfologia elítica³.

Os sintomas podem variar substancialmente dentro da mesma família, devido à influência de alelos modificadores da expressão da espectrina¹¹. Todavia, e apesar de um exuberante ESP, a vasta maioria dos doentes são assintomáticos, e o diagnóstico feito incidentalmente^{9,11,12,15}, conquanto, no período neonatal, pode surgir doença expressiva com marcada icterícia e anemia⁶, que regredem passadas algumas semanas a meses⁶. Neste período de vida -devido à grande quantidade de hemoglobina fetal- há uma intensificação na concentração de 2,3-difosfoglicerato na célula, molécula esta, que leva a instabilidade adicional a nível do complexo juncional, justificando assim os sintomas observados⁹. A HE neonatal pode ser difícil de distinguir de HPP⁹.

Apenas 10% apresentarão doença hemolítica, com anemia leve a moderada e, ocasionalmente, esplenomegalia e coledocolitíase¹¹.

O hemograma pode ser completamente inocente ou revelar uma diminuição ligeira do VGM¹³.

No ESP, 10-100% dos GV observados são elíticos^{11,15}. A forma destes pode ser exageradamente alongada, caso a mutação em causa seja a da proteína 4.1^{9,12}. Na minoria dos doentes com HE e sintomas hemolíticos, podem ser observados esquizócitos, para além dos eliptócitos, no ESP.¹¹.

O teste da OF é negativo em doentes assintomáticos e pode ser positivo em doentes com HE severa ou HPP²⁰.

O teste do EMA na HE foi semelhante ao de indivíduos saudáveis, não se observando qualquer correlação estatisticamente significativa²⁰. Nos doentes com hemólise, o teste da EMA é anormal, com diminuição da imunofluorescência emitida^{9,11}.

Por ectacitometria encontramos uma curva trapezóide, com padrão específico de HE, diminuição do valor de EImax, refletindo uma diminuição da deformabilidade^{9,15}.

A eletroforese em gel (em doentes com mutações na proteína 4.1) revela uma ausência desta, da p55 e sensivelmente apenas 30% do conteúdo normal de glicoforina C/D⁹. Caso a mutação seja nos genes da espectrina, observa-se uma diminuição nesta¹², e um aumento do ratio dímeros/tetrâmeros da proteína⁹.

4.4 Piropoiquilocitose hereditária (HPP)

Traduzido de forma literal, piropoiquilocitose refere-se às alterações eritrocitárias, causadas por extensas queimaduras corporais¹².

A HPP é uma patologia bialélica, ocorrendo em casos raros de homozigotos ou heterozigotos compostos (combinação de um alelo de baixa expressão (α^{LELY}) com um alelo

mutado da α -espectrina)¹⁶ para mutações que causam eliptocitose hereditária^{6,9,15,16}. Existe então uma forte associação entre a HE e a HPP, com aproximadamente um terço dos familiares de doentes com HPP, a apresentar sintomas de HE¹¹.

A clínica desta entidade é caracterizada por doença hemolítica severa, dependente de transfusões, começando na infância, com valores de Hb variando entre 60-100 g/l¹⁵. Contrariamente à HE, quase todos os doentes vão apresentar sintomas e sinais compatíveis com hemólise¹¹.

Na análise do hemograma destes doentes, encontramos um volume globular médio muito diminuído (entre 50-60 fl) à custa da extensa fragmentação eritrocitária (característica fundamental), em razão da maior quantidade de dímeros de espectrina na membrana^{9,15,16}.

O ESP pode ser semelhante àquele encontrado na HE, apresentando também poiquilócitos, picnócitos e microsferócitos^{11,20}.

Alguns fragmentos podem ser contabilizados como plaquetas, dando origem a uma pseudotrombocitose; nestas circunstâncias, as contagens plaquetares devem ser feitas manualmente⁹.

O teste do EMA é positivo podendo-se observar diminuições da fluorescência superiores a 21%, contudo, esta diminuição pode ser explicado pela fragmentação eritrocitária (“células” com área de superfície muito reduzida); não obstante a esta redução, se os esquizócitos forem excluídos, não se observa diminuição da fluorescência associada à membrana¹³, sendo portanto dispensável, este exame, na avaliação de um doente com suspeita de HE ou HPP^{13,20}.

No estudo eletroforético pode-se verificar adicional diminuição no ratio espectrina/banda 3 explicando assim a presença de esferócitos em sangue periférico⁹.

A identificação de um alelo α^{LELY} (através de técnicas de PCR) num doente com história familiar de HE ou HPP, e clínica e ESP compatíveis confirmam o diagnóstico de

HPP. Este polimorfismo é extremamente comum, sendo encontrado em heterozigotia e homozigotia em 42 e 9%, respectivamente, na população caucasiana Europeia. A presença do alelo α^{LELY} , mesmo em homozigotia, não é suficiente para causar doença -uma vez que a molécula em causa é sintetizada em grandes quantidades⁹.

Estudos moleculares não são necessários para o diagnóstico, mas podem ser úteis em formas particularmente graves⁹.

4.5 Ovalocitose do Sudeste Asiático (SAO)

Pode ser também considerada como um subtipo de HE, é descrita em populações originárias da região geográfica que lhe dá nome⁶ e, à semelhança da HE, presumivelmente confere resistência à malária^{9,12}.

É causada por uma única deleção -transmitida de forma dominante- no gene SLC4A1, que codifica a banda 3^{6,9,21}. Esta deleção condiciona uma alteração no transporte de bicarbonato e cloro no GV, assim como, a formação oligómeros lineares únicos na membrana celular²¹. Pensa-se que é a oligomerização de banda 3 que determina a redução décupla da deformabilidade e o aumento da estabilidade em 30-50%²¹.

É completamente assintomática em heterozigotos e -quase sempre- letal em homozigotos (total desequilíbrio iónico no GV¹²), como tal, o diagnóstico é normalmente feito acidentalmente^{6,9,13}. Em recém-nascidos, pode existir clínica de hemólise (de curta duração)⁹.

O hemograma pode ser normal, e não haver sinais bioquímicos de hemólise^{6,13}. Ao ESP surgem ovalócitos (células de morfologia oval com uma banda transversa de palor²¹) e ovaloestomatócitos. Este, constitui o ECD mais valioso no diagnóstico da SAO^{6,9,13}.

Em razão da alteração genética que caracteriza a SAO, o teste de fixação da EMA à proteína 3 irá apresentar diminuição na fluorescência emitida superior a 21%¹³.

Esta entidade nosológica apresenta um padrão de deformabilidade distinto ao ectocitómetro, que representa a dramática diminuição da deformabilidade das células^{9,13,15}.

Ainda não foi completamente explicada a discrepância que se observa entre o fenótipo leve e o robusto efeito que o defeito genético tem sobre a rigidez da membrana^{9,12}.

O teste da OF e o SDS-PAGE são normais⁶.

4.6. Estomatocitose Hereditária (HSt)

A HSt é um espectro de doenças, cerca de 30-40 vezes menos comuns que a HS, causadas por defeitos no transporte iónico, transmitidas de forma dominante^{3,6,9,15} (ou de novo, no caso da OHSt¹²).

Observa-se um efluxo catiónico que resulta em alteração na concentração de catiões (Na^+ e K^+) intracelulares, e no volume globular^{3,6,9,15}. Esta alteração altera o gradiente osmótico na membrana e, por conseguinte, o volume e deformabilidade eritrocitária³.

Tal como ocorre nas restantes membranopatias, a variabilidade clínica é grande, podendo-se apresentar de assintomática, a hemólise severa e anemia^{3,9}. Estão identificados quatro tipos de patologias: estomatocitose hereditária hiperhidratada, estomatocitose hereditária desidratada, criohidrocitose, e pseudohipercalemiemia familiar (não apresenta sinais ou sintomas de hemólise)^{15,16}.

A forma mais rara é a HSt hiperhidratada (OHSt), estando apenas descritos vinte casos a nível mundial⁹. Pode ser causada por mutações na proteína banda 3, na glicoproteína transportadora de amónia associado ao Rhesus (RhAG), ou no GLUT-1, provocando um desequilíbrio no transporte do Na^+/K^+ na célula^{3,15}, e caracteriza-se, clinicamente, por hemólise expressiva, anemia, aumento significativo do VGM (110-150 fl⁹) e diminuição do CHGM (refletindo o alterado estado de hidratação celular) e transformação da célula em

estomatócitos não deformáveis^{3,6}. O número de estomatócitos (forma de boca) no ESP é muito superior ao presente na DHSt e, portanto, o diagnóstico é fácil de estabelecer⁹.

A mais comum é a HSt desidratada (xerocitose ou DHSt), causada por uma mutação no gene PIEZO1 levando a um ganho de função nas proteínas PIEZO (são subunidades formadoras de poros dos canais catiónicos^{3,9}), ocasionando efluxo de potássio e água resultando em desidratação celular e aumento do CHGM^{6,15}. Nestes, a Hb pode ser normal, o CHGM está elevado (>360g/l⁹), há reticulocitose e hemólise ligeira. Observam-se xerócitos (células de tamanho normal com a aparência de uma fenda ao longo de toda a célula) no ESP^{9,12,15}. Pseudohipercalémia pode estar presente, devido à perda de potássio dos eritrócitos armazenados a temperatura ambiente, sem quaisquer consequências clínicas^{6,16}. Para além dos sintomas típicos de doença hemolítica, podem surgir edemas perinatais que resolvem espontaneamente (mecanismo desconhecido) e está tipicamente associada a sobrecarga de ferro com hepatosiderose^{6,12,16}.

A criohidrocitose /criocitose (CHC) é outra forma rara de estomatocitose que se pode fazer acompanhar por hemólise. Esta patologia é descrita em doentes com mutações que transformam o transportador aniónico banda 3, num transportador catiónico⁹. O traço mais característico é o vazamento de catiões monovalentes, dependente da temperatura¹²: há lise de até 70% das células armazenadas em temperatura de refrigeração (4-8°C), após 48h^{15,16}. A hemólise encontrada nestes doentes é ligeira a moderada.⁹

Finalmente, a Pseudohipercaliémia Familiar (FP) é um traço assintomático, ou ligeiramente hemolítico com hipercaliémia artefactual¹². A pseudohipercaliémia deve-se ao efluxo de iões de potássio que ocorrem nos GV armazenados por várias horas¹⁵. O hemograma é normal¹⁶.

O diagnóstico da OHSt e da DHSt pode ser conseguido pelos seus padrões específicos de ectacitometria, ou pela sequenciação dos genes envolvidos^{9,12,15}. A importância do

diagnóstico da DHSt prende-se com o facto destes doentes não serem candidatos a esplenectomia, pelo aumento do risco de fenómenos trombóticos, estando esta cirurgia contraindicada¹⁵.

O diagnóstico da CHC e da FP pode ser conseguido pela sequenciação dos genes envolvidos, ou pela fotometria de emissão de chama para quantificar $[K^+]$ plasmático, e $[K^+]$ e $[Na^+]$ intracelular de amostras armazenadas (em temperatura ambiente e em temperatura de refrigeração) e frescas¹⁵.

5. Hemoglobinopatias

5.1 Hemoglobina: estrutura, função e patologia

A hemoglobina (Hb) é o principal transportador de oxigénio em humanos³. É uma proteína tetramérica composta por dois pares de cadeias globínicas diferentes³. No adulto saudável, a maior parte das moléculas de hemoglobina são do tipo A (constituídas por duas cadeias α e duas cadeias β), e uma pequena parte do tipo A₂ (constituídas por duas cadeias α e duas cadeias δ) e do tipo F^{3,22}. Durante o período fetal, a hemoglobina predominante é do tipo F (constituída por duas cadeias α e duas cadeias γ)²². As cadeias α -globínicas são codificadas por dois genes altamente homólogos localizados no braço curto do cromossoma 16; as cadeias globínicas β , δ , e γ são codificadas pelos seus respetivos genes localizados no braço curto do cromossoma 11, no chamado *cluster* de genes β ^{22,23}. Os genes estão organizados de acordo com a ordem com a qual são expressos durante o desenvolvimento, para produzir tetrâmeros de Hb²³. O *switch* da HbF para HbA e HbA₂ é extremamente complexo e resulta da interação centenas de diferentes proteínas²³. Tanto a concentração de Hb, a sua integridade, solubilidade, e afinidade pelo O₂ são características fundamentais pela manutenção da sua principal função³.

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias causadas principalmente por mutações dos genes das cadeias globínicas¹⁰. Com cerca de 7% da população portadora destas patologias, trata-se da doença monogénica mais comum no mundo e um dos maiores problemas de saúde a nível mundial²⁴. Ocorrem com incidência particularmente alta em países em desenvolvimento em razão da sua seleção pela malária endémica, porém, em consequência das grandes movimentações populacionais das últimas décadas, a sua frequência em países em desenvolvimento tem vindo a aumentar²⁵. Devido à sua alta prevalência e relativa severidade da doença, muitos países em todo o mundo começaram a

adotar programas para identificar portadores adultos e rastreios neonatais para identificar crianças portadoras e doentes²².

As mutações podem ser classificadas como qualitativas (HbS e outras Hb instáveis), quando a mutação leva à produção normal de uma cadeia estruturalmente anormal; quantitativas (talassémias), quando há redução da produção de cadeias globínicas estruturalmente normais^{3,25}; ou podem ter características de ambas as categorias (como por exemplo a HbE)²⁴. Existem mais de 1500 mutações identificadas que causam hemoglobinopatias qualitativas (sendo que a maioria não tem tradução fenotípica), mais de 330 que causam β -talassémia e mais de 200 que causam α -talassémia²². O fenótipo clínico, originado por mutações nos genes das cadeias globínicas, vai depender não só do tipo de mutação em causa, assim como, o local da molécula onde estas ocorrem: deleções, e mutações pontuais que modifiquem radicalmente a estrutura da proteína, dão origem a alterações quantitativas; por outro lado, mutações pontuais em locais específicos da molécula de Hb (superfície, bolso heme, ou pontos de contacto) levam a alterações qualitativas, que estão intrinsecamente relacionadas com o local mutado da proteína^{22,25}.

Dentro do espectro de hemoglobinopatias, aquelas que condicionam anemia hemolítica hereditária são: as que têm alteração na solubilidade (HbS), as que oxidam rapidamente (Hb instáveis), e as formas graves de talassémia¹⁰.

5.2 Hemoglobinas anormais que condicionam hemólise

5.2.1 Hemoglobinas Instáveis (HbX)

Este grupo de hemoglobinopatias transmitidas dominantemente (no entanto, até 40% dos casos descritos parecem tratar-se de mutações *de novo*⁶), são causadas por defeitos estruturais que resultam de alterações da sequência de aminoácidos nas cadeias α ou β da

hemoglobina²⁴. Estas são causa rara de anemia hemolítica e levam a um quadro clínico severo quando presentes em indivíduos heterozigotos, e muitas vezes fatal se presentes em homozigotia²⁴.

Foram identificadas mais de 150 variantes que causam instabilidade da molécula de hemoglobina, e hemólise²⁴. As mutações que vão levar a hemoglobinas instáveis são localizadas próximas do bolso do heme, ou, no contacto entre as cadeias $\alpha_1\text{-}\beta_1$ (maior parte⁶)²⁵.

Clinicamente, a anemia é de gravidade variável, com doença crónica, e exacerbações intermitentes, por vezes precipitadas por infeções virais, ou fármacos^{24,26}. Estão presentes ainda, sinais e sintomas típicos de doença hemolítica⁶.

Ao hemograma, observam-se valores altamente variáveis de hemoglobina²⁴; o VGM pode apresentar-se aumentado, o CHGM, diminuído e o RDW invariavelmente aumentado²⁶.

O ESP apresenta-se com inúmeras formas e tamanhos (anisopoiquilocitose) mas com predomínio de macrócitos e policromasia. São ainda observados, na coloração supra-vital, corpos de Heinz (que vão ser o reflexo da instabilidade da hemoglobina mutada que precipita)²⁶.

A análise da Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) revela a hemoglobina instável (HbX) em cerca de 50% dos casos. Independentemente da sua identificação no HPLC o estudo molecular é obrigatório e inicia-se pelo gene da cadeia β -globínica (bastante mais frequente que as Hb Instáveis por alterações nas cadeias α -globínicas)⁶.

O diagnóstico deve ser suspeitado quando perante doentes com anemia hemolítica crónica, inexplicada por outras patologias mais comuns²⁶, e, se observa no ESP, corpos de Heinz com o uso de coloração supra-vital. O estudo da família pode ser de extrema utilidade²⁵. Testes específicos como o teste da estabilidade ao calor ou ao isopropanol

confirmam o diagnóstico (tendo em atenção que valores superiores a 3% de HbF podem levar a resultados falsamente positivos devido à sua instabilidade)^{6,25,26}.

5.2.2 Hemoglobinas Com solubilidade Anormal

As variantes clinicamente mais relevantes, e comuns, são a HbS, HbE, HbC, HbD-Punjab, e HbO^{-Arab}, cada uma delas causada por substituições de nucleosídeos específicos no gene que codifica a cadeia β -globínica (HBB)²². Estas patologias são raras e, em heterozigotia, ou não têm fenótipo clínico, ou causam doença ligeira²⁴.

A homozigotia da mutação que gera HbC, é chamada também de doença da HbC, e tem um fenótipo semelhante ao da anemia falciforme, com anemia microcítica, e clínica menos severa^{22,24}.

A HbE é uma variante extremamente comum do Sudeste asiático e, em homozigotia produz um fenótipo semelhante ao da β -talassémia intermédia, com microcitose, células em alvo no ESP e >81% de HbE no estudo de hemoglobinas por HPLC^{24,27}. Além disso, visto tratar-se ainda de uma molécula instável, podem ocorrer fenómenos hemolíticos na presença de determinados fármacos, ou em contexto de infeções virais²⁴.

As restantes variantes apenas ganham importância quando herdadas em heterozigotia composta com o alelo β^S .²⁸

O diagnóstico destas variantes pode ser feito através de estudos das diferentes hemoglobinas, por HPLC ou por cromatografia de fase inversa (que permite o estudo das cadeias globínicas de forma individual)²⁵. Estes estudos não fornecem o diagnóstico definitivo pelo que outros métodos (confirmatórios) devem ser utilizados para especificar a variante nucleotídea presente, uma vez que variantes menos comuns podem não ter tempos de retenção específicos à HPLC e serem incorretamente diagnosticados²². O teste confirmatório mais

comumente utilizado nas variantes de Hb é o estudo molecular com recurso à sequenciação do gene HBB²².

5.2.2.1 Anemia falciforme

A anemia falciforme refere-se à forma mais comum de doença falciforme, e é causada pela transmissão em homozigotia do alelo β^S ^{24,28}.

Em determinadas populações, a anemia falciforme representa até 70% dos casos de doença falciforme, sendo que os restantes são representados pela doença HbSC, ou pela co-herança de alelos β^S e β^0 (talassémia). Existem muitos outros genótipos capazes de produzir fenótipo falciforme, no entanto, são raros^{24,28}. Salvo invulgares exceções, indivíduos com apenas um alelo β^S , são assintomáticos, clínica e hematologicamente^{3,24}. Uma vez que tanto a anemia falciforme, como os restantes síndromes falciformes são semelhantes, serão discutidos em conjunto, de forma indiscriminada.

A distribuição mundial da anemia falciforme é indicativo de dois fatores: seleção dos indivíduos portadores pela sua resistência à malária -cujo mecanismo ainda não está totalmente esclarecido- e pela subsequente migração populacional²⁸. A sua prevalência é maior na África subsariana, onde cerca de 0.74% dos nados vivos são afetados pela doença²⁸. Estima-se que em Portugal, 0.5-1% da população seja portadora de um alelo β^S , e que esta percentagem suba para 5% entre a população imigrante²⁴.

A HbS é causada por uma mutação no 17º nucleosídeo -timina para adenina- que leva a uma substituição no sexto aminoácido da cadeia β -globínica (de ácido glutâmico, hidrofílico, para valina, hidrofóbica)^{28,29}. Esta mutação resulta numa nova ligação entre as cadeias β_1 - β_2 da molécula de hemoglobina, que, no estado desoxigenado, leva à cristalização e expansão desta, preenchendo completamente o eritrócito. A polimerização da HbS resulta em disrupção da arquitetura e flexibilidade da célula, e promove a desidratação celular. A taxa à

qual a cristalização ocorre depende principalmente da concentração de HbS, mas também do intervalo de tempo de desoxigenação, e da concentração de hemoglobina fetal na célula - que, pela ausência de cadeias β , diminui a concentração de HbS²⁸.

A formação destes longos polímeros ativa uma cascata de alterações celulares, entre as quais, a desregulação da homeostasia dos cátions -resultando em efluxo de potássio e desidratação celular-, e a libertação do grupo heme e de Fe^{3+} promovendo a existência de um microambiente oxidativo, que leva à disrupção da normal assimetria da membrana, e culmina na lise do GV²⁹.

As manifestações clínicas desta patologia são essencialmente devidas a dois fenómenos: oclusão vascular com lesão isquémica (causada pela deformação dos GV e consequente aumento da rigidez eritrocitária²⁹), e hemólise²⁸. A oclusão vascular é causada pelo aprisionamento dos GV na microcirculação causando obliteração do vaso. Pensa-se que é a inflamação (com envolvimento de neutrófilos e células endoteliais²⁹), o evento primário, que leva à lentificação do fluxo sanguíneo na microcirculação, aumentando o tempo que os GV estão sujeitos a condições hipoxémicas permitindo a polimerização da HbS com alteração morfológica do GV e que eventualmente resulta em vaso-occlusão, no entanto, este é ainda motivo de estudo^{28,29}.

Novas evidências sugerem que a própria hemólise pode ser também um fator etiológico para o desenvolvimento de vasculopatia (caracterizada por hipertensão pulmonar, disfunção vascular, e alterações proliferativas na íntima dos vasos), uma vez que, estas alterações foram observadas noutras patologias que condicionam hemólise crónica²⁸. A hemoglobina livre no plasma gera espécies reativas de oxigénio que esgotam as reservas de óxido nítrico (NO)²⁸⁻³⁰. A depleção crónica de NO leva à perda do seu efeito vasodilatador, e facilita a ativação plaquetar contribuindo para o estado de hipercoagulabilidade e hiperviscosidade observado²⁸⁻³⁰. Para além da alteração do metabolismo do NO, a hemólise

intravascular e subsequente libertação de ferro livre, pelo heme, é também fonte de stresse oxidativo, que, por via da ativação de múltiplos fatores de transcrição, permite o aumento da expressão de moléculas de adesão a nível do endotélio vascular^{29,30} (**figura 6**).

Apesar de manifestações clínicas dramáticas, aproximadamente 39% dos doentes não reportam episódios de dor, contudo, 1% reporta mais de seis episódios por ano. Esta variabilidade fenotípica pode ser parcialmente explicada pelos dois modificadores genéticos mais bem estabelecidos: concentração de hemoglobina fetal e o traço α -talassémico²⁸. O traço α -talassémico pode ser observado em até 30% dos doentes de origem africana e até 50% dos doentes com origem indiana; reduz a concentração de HbS na célula permitindo um decréscimo das taxas de cristalização e hemólise²⁸. A concentração de HbF no doente com anemia falciforme varia entre 1% e 30% e esta variação vai explicar a parece explicar a variabilidade clínica observada nestes doentes²⁸.

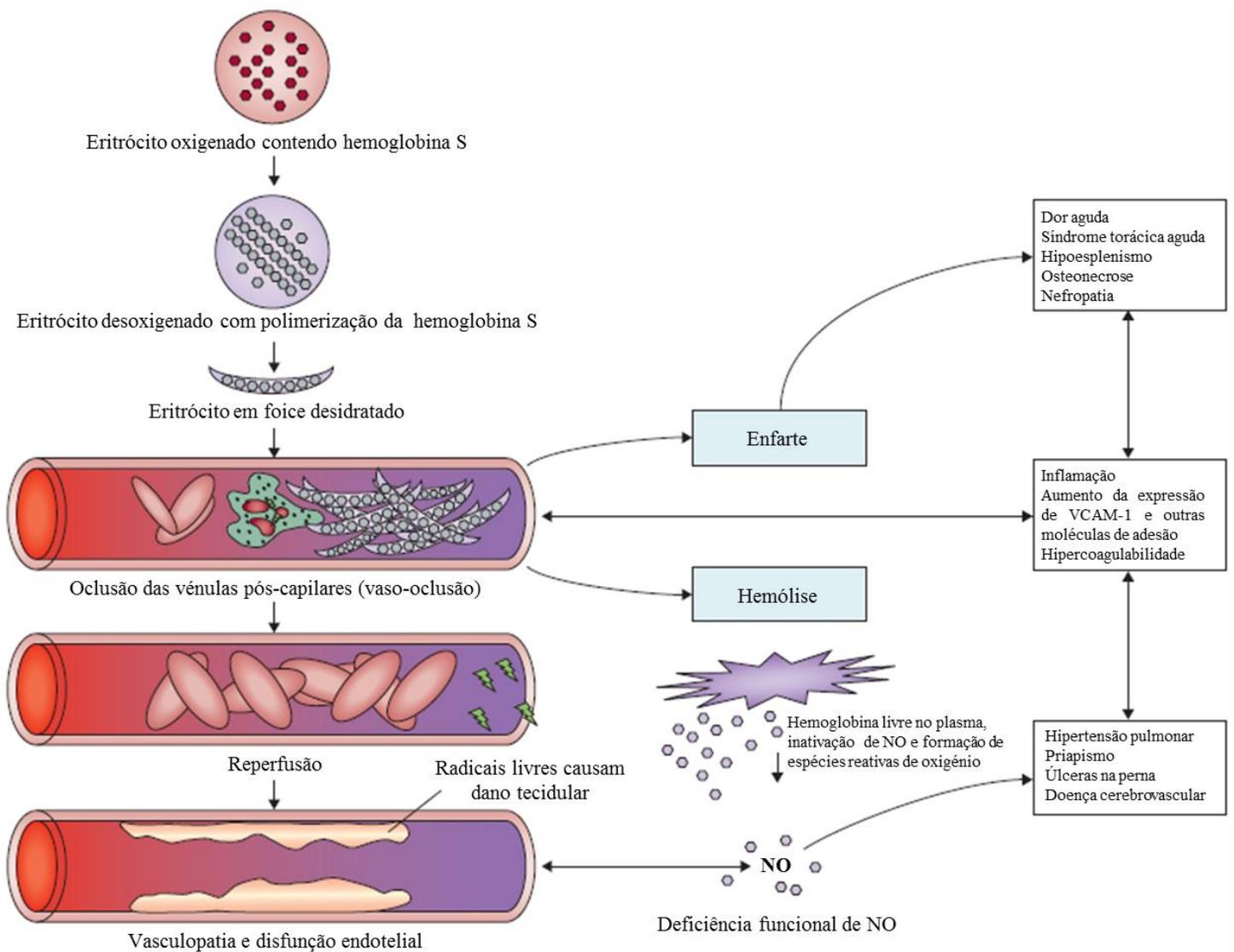


Figura 6: Fisiopatologia da anemia falciforme. NO = óxido nítrico; VCAM-1 = molécula de adesão celular vascular. Adaptado de [39].

O valor de hemoglobina dos doentes com drepanocitose está compreendido entre 60-90g/l, e o VGM está dentro de parâmetros normais, traduzindo assim a presença de uma anemia normocítica²⁴. Os doentes com anemia falciforme têm leucocitose com neutrofilia, de forma quase invariável, ao hemograma²⁹. Os marcadores de hemólise encontram-se também, previsivelmente, aumentados³⁰.

A avaliação da LDH é um bom biomarcador na avaliação da hemólise intravascular e correlaciona-se com a elevação da velocidade do jato regurgitante da tricúspide (JRT) (melhor preditor da mortalidade). Velocidade de 2.5m/segundo ou mais do JRT está associada a 40% de taxa de mortalidade a 3 anos em adultos³⁰.

Se a necessidade de diagnóstico for urgente, este pode ser conseguido através da conjugação do quadro clínico (crises álgicas, síndromes agudas de órgão, e anemia hemolítica crónica), esfregaço de sangue periférico -através da observação de eritrócitos em forma de foice-⁶, e pelo teste de falciformização eritrocitária²⁶. Este último não deve ser realizado em crianças com menos de 6 meses de vida uma vez que a maior concentração de HbF levará a resultados falsos negativos²⁶.

O diagnóstico desta patologia é extremamente simples e baseia-se na observação e quantificação da HbS quer através da eletroforese (HPLC) e da sua confirmação por um teste de solubilidade ou de falciformização. Pode ainda ser utilizada a sequenciação do gene HBB²⁸. O padrão da hemoglobina desta entidade por eletroforese ou HPLC mostra-se com 55-90% de HbS²⁴.

No caso de coexistir uma mutação β -talassémica (β^0), a anemia será hipocrômica e microcítica, a eletroforese da hemoglobina revela >80% de HbS e o doente apresentará um fenótipo severo²⁴.

De notar que existem pelo menos 13 outras variantes hemoglobínicas que resultam de mutações adicionais, para além daquela presente na anemia falciforme, e que mantêm a

capacidade de polimerização. O seu padrão eletroforético, contudo, pode ser diferente daquele da HbS, e portanto é prudente realizar teste de falciformização eritrocitária quando há suspeita de uma variante hemoglobínica não identificada²⁶.

5.3 Talassémias

As talassémias são das doenças genéticas mais comuns em todo o mundo, com mais de 60 000 nascimentos anuais de indivíduos severamente afetados²³. Múltiplos estudos relacionam o elevado número de doentes e portadores com uma diminuição da suscetibilidade à infecção por *Plasmodium falciparum*³¹.

São um grupo heterogêneo de anemias hereditárias que resultam da redução da biossíntese das cadeias α ou β globínicas, necessárias para formar o tetrâmero de hemoglobina^{3,31}.

As consequências fisiopatológicas destas entidades surgem secundariamente à diminuição da concentração de Hb da célula (com consequente diminuição da sobrevivência e da capacidade de transporte de O₂), mas mais importante, do desequilíbrio que se observa entre as cadeias α ou β -globínicas³¹, resultando na precipitação das subunidades globínicas no folheto interno da membrana celular levando a uma diminuição da deformabilidade do GV. Ao nível dos precursores eritrocitários, a rápida destruição de cadeias globínicas livres resulta na destruição destes, na MO, o que significa que o quadro clínico da anemia por uma talassémia não é só devido à anemia hemolítica, mas também à eritropoiese ineficaz³. O fenótipo destes doentes é altamente variável, estando descritos indivíduos completamente assintomáticos, a doentes severamente anémicos com necessidade de transfusões repetidas³¹.

5.3.1 α -talassémia

É causada maioritariamente por deleções (mais frequentes) ou mutações pontuais²² no gene da α -globina, que levam a uma diminuição ou ausência de síntese^{24,31}. Estão descritas sensivelmente 200 mutações/deleções deste gene²². Em cada cromossoma 16, existem 2 alelos que codificam a α -globina e a gravidade clínica vai depender do número de alelos afetados, assim como do tipo de mutação presente³¹. As deleções eliminam total (α^0) ou parcialmente (α^+) a produção de α -globina num determinado cromossoma (em Portugal as mais comuns são a $\alpha^{3.7}$ e a $\alpha^{4.2}$)²⁴; as restantes mutações resultam ou em redução, ou ausência da produção de α -globina, ou na síntese de cadeias estruturalmente aberrantes, associadas a um fenótipo clínico mais grave^{31,32}.

A quantidade de alelos mutados vai ser proporcional à quantidade de cadeias α produzidas. Assim, indivíduos com apenas um alelo mutado, são portadores silenciosos, ou apresentam índices eritrocitários *borderline*; indivíduos com dois alelos mutados (traço α -talassémico), transmitidos em *cis* ou em *trans* (a identificação do tipo de transmissão é irrelevante clinicamente falando, no entanto, pode ser essencial o seu esclarecimento no âmbito da medicina reprodutiva)³¹, apresentam anemia ligeira, não hemolítica³².

Deleção dos quatro alelos da α -globina resulta em Hb Bart hidrósia fetal, uma condição geralmente incompatível com a vida^{32,33}.

A doença da hemoglobina H é causada pela mutação em 3 dos 4 alelos da α -globina com diminuição de mais de 70% da produção desta^{31,32}. Durante o desenvolvimento fetal, as cadeias γ em excesso vão formar homotetrâmeros (γ_4), chamados de Hb de Bart; 6 meses após o nascimento, são as cadeias β que formam tais homotetrâmeros (β_4), a HbH, que devido à sua instabilidade, precipitam nas células ainda em desenvolvimento³¹. A maior parte dos doentes com HbH não irá depender de transfusões sanguíneas, mas o seu uso poderá ser necessário em situações que aumentem o stresse oxidativo³¹. Clinicamente, os afetados apresentam-se com

anemia variável (26-133 g/l) e quantidades variáveis de HbH (0.8-40%), esplenomegalia, icterícia, úlceras nos membros inferiores, cálculos biliares, sobrecarga de ferro, e episódios hemolíticos em resposta a infecções, e a determinados fármacos³².

A hemoglobina Constant Spring (HbCS) é a variante α^+ -talassêmica, não-delecional, mais prevalente no mundo, com frequências gênicas a atingir os 6% na Tailândia³³. Ocorre devido a uma mutação pontual no codão STOP do gene α_2 (aquele que tem maior expressão), levando à elongação da proteína³². Esta mutação resulta na formação de mRNA instável e apenas baixas quantidades de HbCS são produzidas³⁴. Portadores desta mutação tendem a ter manifestações ligeiramente mais graves da doença, uma vez que, para além da redução da produção de Hb, há a produção de uma Hb instável³⁴.

Os doentes com doença da HbH irão ter anemia de gravidade variável, com redução do VGM e da HGM, e níveis normais ou ligeiramente reduzidos da HbA₂ à análise da Hb. No período fetal, quando os níveis de cadeias α caem abaixo dos 70%, Hb Bart pode ser detetada. No adulto, no ESP, podem ser identificadas as moléculas de HbH (corpos de inclusão) através do uso do azul de cresil brilhante, e, se em quantidade suficiente, esta pode ser detetada através de técnicas eletroforéticas³².

O diagnóstico baseia-se no hemograma -que vai demonstrar uma anemia microcítica hipocrômica- e no ESP (células microcíticas, de morfologia bizarra, com presença de esquizócitos e, através de colorações supra-vitais corpos de inclusão -cadeias globínicas-)³¹. A concentração de Hb e o valor do VGM vão ser tão mais baixos, quanto o número de alelos α mutados²⁴.

A presença de uma anemia microcítica, com elevação dos parâmetros de hemólise e ausência de défice de ferro, e <3.4% de HbA₂ na eletroforese da hemoglobina é sugestivo de α -talassémia²². A HPLC pode demonstrar níveis elevados de Hb de Bart, ao nascimento, e de

HbH mais tarde na vida³¹. Estudos moleculares do DNA (sequenciação) são essenciais para confirmar o diagnóstico de α -talassémia^{22,31}.

5.3.2 β -talassémia

Existem mais de 300 alelos β -talassémicos, na sua maior parte, causados por mutações pontuais no gene ou nas regiões que o flanqueiam, contudo, deleções removendo o gene β também podem ocorrer^{22,23}. Quando a β -globina é abolida pela mutação, estamos perante uma talassémia β^0 ao passo que, uma mutação que apenas reduza a síntese da cadeia, produz uma talassémia β^+ (fenótipo, geralmente, mais ligeiro²⁶)^{22,23}. Outras variantes estruturais podem também ter um efeito β -talassémico (5.3.3 e 5.3.4)²³.

A severidade da doença é determinada pela extensão da redução da síntese de β -globina, e pelo grau de excesso de cadeias α ³¹, no entanto, doentes homozigotos para mutações β^+ idênticas podem ter uma extraordinária variação fenotípica: há doentes que são dependentes de transfusões sanguíneas (β -talassémia major) e outros, independentes destas (β -talassémia intermédia)^{23,31}. À semelhança do que ocorria na anemia falciforme, a co-herança de outra patologia que diminua o desequilíbrio entre as α e β -globinas (α -talassémia) ou que aumente a concentração de HbF está associada a manifestações clínicas mais leves²³.

Uma mutação que afete apenas um alelo, normalmente não terá importância clínica, porém, indivíduos com dois alelos mutados sofrerão de anemia severa (β -talassémia intermédia ou β -talassémia major). A fisiopatologia da β -talassémia prende-se com o desequilíbrio que ocorre entre as cadeias α e β : as cadeias α em excesso irão precipitar nos precursores eritróides (causando deseritropoiese) e nos GV (causando hemólise)^{23,31}.

Clinicamente, os doentes apresentam-se com anemia, esplenomegalia, deformações ósseas devido à expansão da MO, atraso estatoponderal, e sobrecarga de ferro, que eventualmente levará a lesão de órgão^{23,31}.

Numa β -talassémia major, o hemograma, evidencia uma diminuição da concentração de Hb (<80g/l), com hipocromia (HGM <20pg) e microcitose (VGM <70 fl); se se tratar de uma β -talassémia intermédia, a anemia é de menor severidade e a microcitose mais ligeira²³. Doentes com β -talassémia minor (β^0 ou β^+ em heterozigotia, geralmente) têm apenas uma ligeira anemia microcítica e elevação da HbA₂ ao estudo eletroforético²³; uma exceção a esta regra ocorre quando, para além da mutação que condiciona um alelo β^0 ou β^+ , o doente herda também um alelo α triplo ($\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$), ou quádruplo ($\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha\alpha$)²⁶.

O diagnóstico da β -talassémia major deve ser suspeitado se perante um doente (normalmente de 3 a 6 meses de vida), de origem étnica sugestiva, desenvolve anemia microcítica e hipocrómica, que não é devido a défice de ferro²⁶; se se tratar de uma β -talassémia intermédia, o doente é normalmente uma criança mais velha, que se apresenta com anemia microcítica e hipocrómica, com hepatoesplenomegália, icterícia, e, por vezes, expansão dos ossos da face²⁶.

O diagnóstico definitivo é conseguido pela avaliação dos índices eritrocitários, observação do ESP, e pela análise da hemoglobina: há um aumento das HbF e HbA₂ (>3.5%) com diminuição ou ausência de HbA; a HbE pode ser detetada em doentes com HbE/ β -talassémia^{23,26,31}. A identificação de mutações, por meio da análise do DNA é um método bem estabelecido e recomendado para a confirmação do diagnóstico^{23,31}.

5.3.3 $\delta\beta$ -talassémia

Ocorre devido a uma grande deleção no locus do gene da β -globina formando uma proteína de fusão entre o gene β e δ ³³. Ao hemograma, identifica-se hipocromia e microcitose na população de GV, cujo número absoluto pode estar aumentado. O estudo eletroforético revela níveis elevados de HbA₂ (na ordem dos 15%)³³.

5.3.4 Variantes talassémicas – HbE/ β -talassémia

A variante HbE é extremamente prevalente no sudeste asiático, atingindo até 60% em determinadas populações, tornando o genótipo HbE/ β -talassémia, de grande importância clínica, e com enorme variabilidade fenotípica³⁴. A HbE é uma variante estrutural β -globínica que resulta tanto em diminuição da síntese da β -globina, como na formação de cadeias com interação anormal com α -globina, e, se transmitido isoladamente (em hétero ou homozigotia), condiciona talassémia menor^{31,34}.

O alelo β^E leva a uma redução da produção da cadeia β , se conjugado com os alelos β^0 ou β^+ leva a uma forma clinicamente severa de β -talassémia²³. Estudos sugerem que, em determinadas populações, até 50% dos indivíduos com β -talassémia major têm o genótipo β^E/β^+ ou β^E/β^0 .^{23,31,34}

Ao hemograma, identifica-se hipocromia e microcitose na população de GV, cujo número absoluto pode estar aumentado. O estudo eletroforético revela níveis elevados de HbA₂ (na ordem dos 25-30%)³³ e de HbE ($58 \pm 1.5\%$)²⁷.

A transmissão da HbE, conjugado com outros genótipos que causam α -talassémia (incluindo a Constant Spring) é também possível, e resulta em complexas interações gênicas culminando num fenótipo de talassémia intermédia (HBAE de Bart)³⁴.

6. Enzimopatias

6.1 Metabolismo do glóbulo vermelho

Tendo em conta a ausência de organelos do eritrócito, as suas vias metabólicas são relativamente limitadas, ainda assim, são capazes de o manter viável durante cerca de 120 dias³. Elas englobam: a glicólise anaeróbia (Embden-Meyerhof), os desvios das pentoses-fosfato e de Luebering-Rapoport, o metabolismo da glutathiona, e o metabolismo dos nucleosídeos^{3,6,35}. Têm como objetivo a manutenção da função adequada das bombas Na^+/K^+ , manutenção da hemoglobina no seu estado reduzido e da sua afinidade pelo O_2 , manutenção do balanço redox no *pool* de glutathiona, e manutenção do *pool* de adenosina^{6,35}.

A via Embden-Meyerhof (EMP) converte glicose em piruvato ou lactato e é a única fonte de ATP do GV possibilitando o funcionamento das bombas Na^+/K^+ -ATPase (diretamente envolvidas na conservação da integridade da membrana)³⁵. Da via EMP advém também a produção de NADH, cofator ao citocromo b5 redutase, que, por sua vez, é responsável pela redução da hemoglobina oxidada³⁵. O *Shunt* Luebering-Rapoport é único ao eritrócito e permite a produção de 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) (cuja função é a regulação da afinidade da Hb ao oxigénio)³⁵. Em condições fisiológicas, 90% da glicose é metabolizada pela via EMP para produzir ATP, e a restante metabolizada através da via das pentoses-fosfato, cuja principal função é a síntese de NADPH³⁵. O NADPH atua como cofator da glutathiona redutase, permitindo a sua manutenção no estado reduzido, providenciando então, defesa contra o stresse oxidativo³⁵ (**figura 7**).

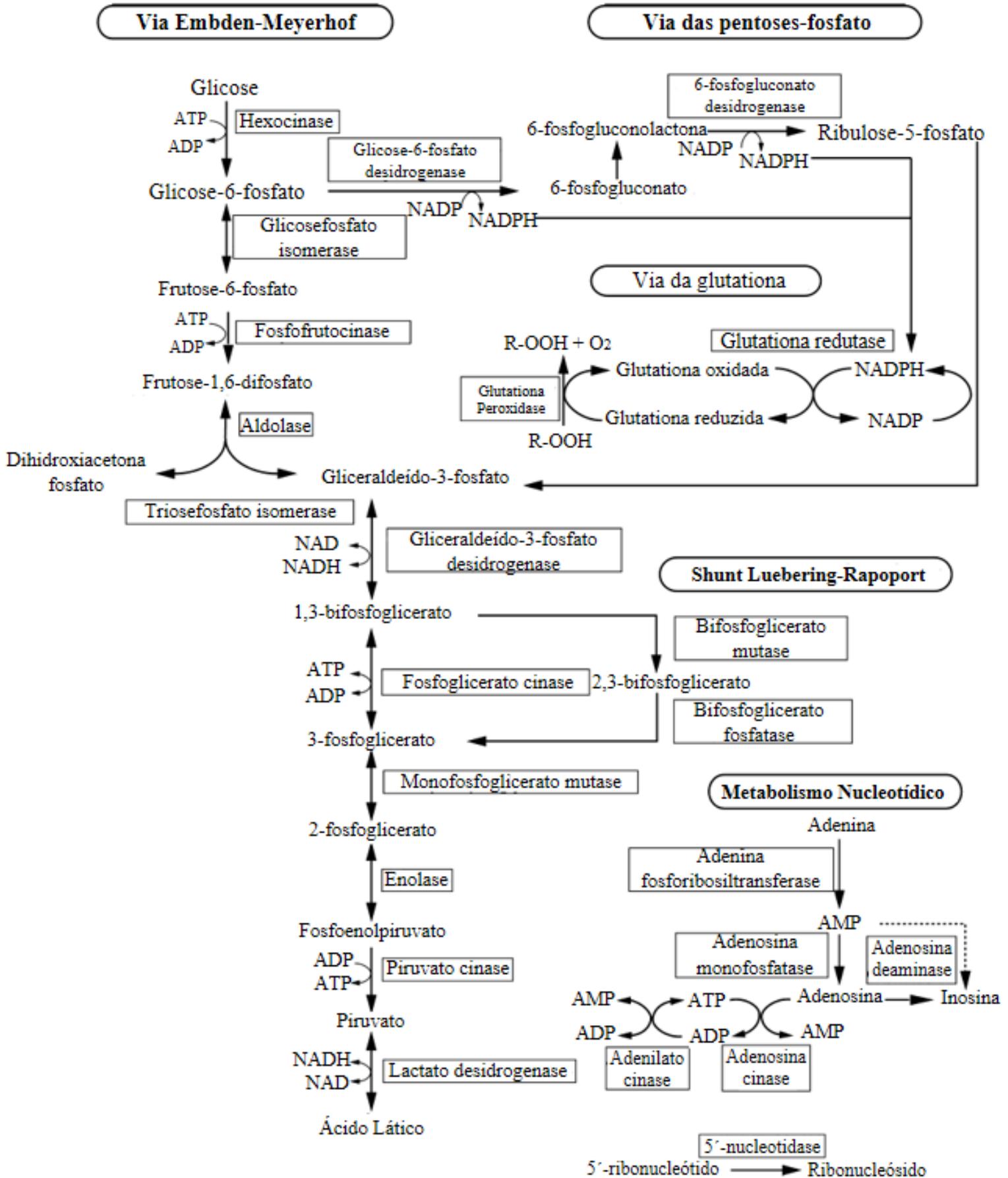


Figura 7: Vias metabólicas do eritrócito. Adaptado de [22]

No GV maduro, o conteúdo de nucleosídeos é regulado principalmente pelo metabolismo intracelular de purinas³⁵. Durante a fase de maturação reticulocitária, a maior parte dos derivados pirimidínicos é degradada e apresentam-se no GV maduro em quantidades residuais, pelo contrário, os derivados de adenina representam cerca de 97% do total da *pool* de nucleosídeos³⁵. Dada a incapacidade de produzir estes compostos *de novo* (necessários para a síntese de ATP), os derivados de purina são reconstituídos -através de compostos intermédios- pela via de reciclagem das purinas^{3,35}.

Múltiplas enzimas controlam todas estas vias metabólicas³. O fluxo glicolítico é controlado pela hexocinase, fosfofrutocinase, glucose-fosfato isomerase, e piruvato cinase³. A via das pentoses-fosfato é controlada pela glicose-6-fosfato desidrogenase³. A pirimidina-5-nucleotidase é a principal enzima envolvida na via de reciclagem de nucleosídeos³.

As mutações que afetam o metabolismo do eritrócito, e que condicionam anemia hemolítica, podem ser classificadas -arbitrariamente- segundo três tipos: (i) enzimopatias da via glicolítica (via Embden-Meyerhof e do *shunt* de Luebering-Rapoport), (ii) enzimopatias das vias de metabolismo dos nucleosídeos, e (iii) enzimopatias do metabolismo da glutatona e do *shunt* das pentoses-fosfato¹⁰. A maioria das enzimopatias são herdadas recessivamente, com sintomas apenas presentes em indivíduos homozigóticos, ou heterozigotos compostos³⁵ **(tabela 6)**.

Tabela 6: Distúrbios enzimáticos do eritócito. Adaptado de [22]

Enzima	Função no GV	Manifestações clínicas	Sintomas Neurológicos	Miopatia	Transmissão genética
Adenosina Deaminase	Metabolismo nucleótido	AHC	-	-	AD
Adenilato cinase	Metabolismo nucleótido	AHC	-	-	AR
Aldolase	Via Embden-Meyerhof	AHC	±	±	AR
Fosfofrutocinase	Via Embden-Meyerhof	AHC	-	+	AR
Fosfoglicerato cinase	Via Embden-Meyerhof	AHC	+	+	Ligado ao X
Glucose-6-fosfato desidrogenase	<i>Shunt</i> Hexose monofosfato	AHC; induzida por oxidantes	-	-	Ligado ao X
Glucose fosfato isomerase	Via Embden-Meyerhof	AHC	±	-	AR
Glutationa redutase	Metabolismo da glutatona	AHC; induzida por oxidantes	-	-	AR
Glutationa sintetase	Metabolismo da glutatona	AHC	+	-	AR
Hexocinase	Via Embden-Meyerhof	AHC	-	-	AR
Pirimidina-5'-nucleotidase	Metabolismo nucleótido	AHC	-	-	AR
Piruvato cinase	Via Embden-Meyerhof	AHC	-	-	AR
Triosefosfato isomerase	Via Embden-Meyerhof	AHC	+	-	AR

AHC: Anemia Hemolítica Crônica; AD: Autossômica dominante; AR: Autossômica recessiva

6.2 Enzimopatias da via glicolítica (Embden-meyerhof) e do *shunt* de Luebering-Rapoport

Alterações nestas enzimas estão frequentemente associadas a manifestações não-hematológicas como: disfunção neurológica, oligofrenia, miopatia e aumento da suscetibilidade a infecções⁶.

Defeitos no *shunt* de Luebering-Rapoport não levam a hemólise mas sim a policitemia, uma vez que é alterada a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio⁶, como tal, o estudo das suas alterações está para além dos objetivos deste projeto. Todas as enzimopatias que ocorrem distalmente ao *shunt* de Luebering-Rapoport têm um aumento de 2,3-DPG com consequente melhoria dos sintomas de anemia e maior tolerância aos esforços; este efeito benéfico está ausente nas enzimopatias que ocorrem proximalmente ao *shunt*³⁶.

6.2.1 Piruvato Cinase (PK)

O déficit de piruvato cinase (PK) é a segunda causa mais frequente de anemia hemolítica causada por défices enzimáticos e condiciona doença de severidade variável, que agrava durante episódios infecciosos à custa da diminuição de ATP^{3,6,35}.

A PK é uma enzima essencial na via EMP e está intimamente ligada à produção de ATP^{3,37}. É responsável pela transferência irreversível de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato ao ADP levando a formação de lactato^{35,37}. O funcionamento anormal da PK reduz a quantidade de energia da célula, que é requerida para o seu funcionamento e sobrevivência, levando a uma morte precoce (hemólise)³⁷.

O déficit de PK leva também ao aumento de 2,3-DPG -devido à acumulação de metabolitos a montante da deficiência³⁷- e, uma vez que ocorre um aumento na concentração desta, há uma diminuição da afinidade da hemoglobina ao oxigénio e, este fenómeno, explica a relativa boa tolerância à anemia (habitualmente severa), uma vez que compensa parcialmente a hipóxia tecidual^{6,35,37}. Para além de mascarar o fenótipo clínico, permitindo aos doentes tolerar valores de Hb mais baixos com menor sintomatologia, a acumulação de 2,3-DPG pode prejudicar ainda mais a glicólise devido à sua ação inibitória sobre a hexocinase³⁷.

A maior parte dos casos é causada pela herança de uma mutação *missense* (70%) na isoenzima da PK específica ao eritrócito, transmitida recessivamente^{3,35,37}. Estão identificadas 180 mutações distintas que levam a anemia hemolítica por alteração da PK³⁷.

As manifestações clínicas da deficiência em PK são semelhantes às restantes anemias hemolíticas crónicas, porém, a severidade desta é extremamente variável: desde formas assintomáticas com hemólise compensada, a formas neonatais severas com necessidade de transfusões regulares³⁷. Em doentes com fenótipo ligeiro a moderado, a anemia tende a

melhorar com o envelhecimento e é relativamente constante na idade adulta, havendo exacerbações ocasionais com infecções ou gravidez³⁷.

O mecanismo pelo qual o déficit de ATP causa hemólise ainda não está completamente esclarecido³ e não existe qualquer correlação entre grau de atividade da PK e gravidade da clínica³⁵.

O diagnóstico desta patologia começa com a confirmação de hemólise (aumento da bilirrubina, aumento LDH, e diminuição da haptoglobina)^{35,37} e com a presença de um ESP incharacterístico³⁷, sem alterações morfológicas evidentes (contudo, em alguns casos de deficiência de PK podem estar presentes equinócitos assim como anisopoiquilocitose)³⁵.

O diagnóstico diferencial requer a demonstração da diminuição da atividade enzimática, e confirmação através da análise de DNA³⁵. Os testes de demonstração da atividade enzimática são rápidos e pouco dispendiosos, e correlacionam a atividade da enzima em estudo através da alteração da absorvância -ao longo do tempo.- num determinado substrato, preparado especificamente³⁵. A atividade enzimática de indivíduos afetados é sempre abaixo de 25% do normal, podendo estar próxima de zero³⁵. Apesar deste ser um teste relativamente simples, existem múltiplas situações que podem levar a falsos negativos ou positivos: condições de armazenamento e envio; remoção apropriada de leucócitos e plaquetas (pela presença de isoenzimas funcionais); transfusões sanguíneas; e reticulócitos em sangue periférico dado que a Hexocinase, Piruvato Cinase, Glicose-6-fosfato Desidrogensase, e Pirimidina-5-nucleotidase são enzimas cuja atividade está aumentada em GV mais jovens. A avaliação de qualquer enzima cuja concertação varie com a idade da célula deve ser comparada outra deste género: se a atividade da PK é normal, e a da hexocinase estiver aumentada, podemos estar perante uma deficiência de PK^{6,35}.

Se perante suspeita de uma deficiência enzimática, a caracterização molecular do defeito ao nível do DNA é essencial para a confirmação do diagnóstico³⁵. Grandes deleções,

mutações em regiões regulatórias, e mutações que levem a *splicing* alternativo poderão não ser detetadas pelas técnicas convencionais de *Polymerase Chain Reaction*³⁷.

6.2.2 Hexocinase (HK)

Esta enzima catalisa a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato, usando o ATP como dador do grupo fosfato³⁶.

A deficiência nesta enzima é extremamente rara estando apenas descritos cerca de duas dezenas de casos³⁵. É causada por mutações transmitidas de modo recessivo, condicionando anemia hemolítica crónica não esferocítica de severidade variável^{35,36}. O diagnóstico é feito através da análise da sua atividade, tendo em conta que esta molécula está aumentada em GV mais jovens -reticulócitos-, e que é uma mas enzimas com menor atividade enzimática *in vitro*^{35,36}.

6.2.3 Glicose-6-fosfato Isomerase (GPI)

É responsável pela conversão reversível da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, o segundo passo da via glicolítica EMP^{36,38}.

O défice em GPI é a segunda causa de enzimopatia mais comum da via EMP³⁵; é uma doença transmitida de forma recessiva e as mutações que a causam são, na sua maioria, *missense*^{36,38}.

Doentes afetados têm anemia hemolítica crónica de severidade variável (à semelhança das restantes enzimopatias) com exacerbações agudas desencadeadas por infeções^{6,36}. A hidrópsia fetal parece ser a complicação mais comum do défice de G6PI, em comparação com as restantes enzimopatias; foram ainda descritas alterações em tecidos não eritróides levando a sintomas neurológicos (fraqueza muscular e oligofrenia)^{35,38} e disfunção granulocitária³⁶.

Analicamente, estes doentes apresentam os sinais típicos de anemia hemolítica com especial tendência ao desenvolvimento de sobrecarga de ferro³⁸.

O diagnóstico é conseguido pela análise da atividade enzimática, que estará reduzido para menos de 25% da atividade normal, e não é influenciada pela presença de reticulocitose em sangue periférico^{35,36}.

6.2.4 Fosfofruto Cinase (PFK)

A PFK medeia a reação de fosforilação, ATP-dependente, de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-fosfato³⁶. Esta enzima tem três diferentes subunidades presentes no organismo humano, e, no eritrócito, estão presentes cinco isoenzimas de composição variável, que contêm tanto a subunidade L (*liver*), como a subunidade M (*muscle*)^{35,36}, portanto, déficit numa destas leva a apenas uma deficiência parcial de PFK³⁵.

A deficiência de PFK é uma doença rara, autossômica recessiva³⁶. Mutações que envolvam a subunidade L vão levar apenas a anemia hemolítica crônica -normalmente ligeira- ou doença compensada, ao passo que, mutações na subunidade M resulta não só em ausência desta enzima no GV, como no tecido muscular, resultando em miopatia^{35,36}. Cerca de um terço dos doentes identificados, são de origem judaica³⁶.

6.2.5 Aldolase

A aldolase é uma enzima presente tanto no GV, como no tecido muscular, e permite a conversão de frutose-1,6-fosfato para ou gliceraldeído-3-fosfato, ou fosfato de di-hidroxiacetona³⁶.

O déficit nesta enzima é extremamente raro, estando descritos apenas 6 doentes. Anemia hemolítica crônica moderada a severa estava associada em todos³⁵. Para além da

anemia estão associados outros sintomas como: oligofrenia, miopatia, e alterações psicomotoras³⁶.

6.2.6 Triose-fosfato Isomerase (TPI)

Esta é a enzima com maior atividade in vitro e esta não está dependente do estado de maturação da célula. Catalisa a interconversão de gliceraldeído-3-fosfato e fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP)³⁶ e está presente em todos os tecidos³⁹.

A deficiência de TPI é uma doença autossômica recessiva rara, considerada a mais grave enzimopatia da via glicolítica^{35,39}. A mutação mais frequente (80%) -Glu104Asp- é também aquela que está associada a maior severidade de sintomas; esta não está relacionada com a diminuição da atividade enzimática, mas sim com a instabilidade da enzima em si³⁹. Dada a sua alta atividade enzimática, mesmo quando esta está severamente reduzida, é suficientemente alta para manter o fluxo glicolítico, não condicionando sintomatologia³⁹. Sugere-se que é a acumulação de proteínas *misfolded* que vai condicionar o metabolismo glicolítico, por mecanismos ainda não compreendidos³⁹.

Esta patologia é caracterizada por anemia hemolítica severa, disfunção neurológica, cardiomiopatia e aumento da suscetibilidade à infecção^{35,36,39}. O déficit de TPI leva à morte na infância precoce^{35,39}.

Indivíduos afetados apresentam ainda um aumento de 20-60 vezes da concentração eritrocitária de DHAP, consistente com o bloqueio metabólico ao nível da TPI³⁶ e pensa-se que este aumento possa contribuir para o desenvolvimento dos sintomas neurológicos³⁹.

6.2.7 Fosfoglicerato Cinase (PGK)

A PGK gera ATP através da conversão reversível de 1,3-bifosfoglicerato para 3-fosfoglicerato³⁶. Esta reação é completamente dispensável através do *bypass* de Luebering-Rapoport³⁶.

O gene responsável pela codificação desta enzima está presente no cromossoma X, deste modo, esta é das únicas enzimopatias associadas a uma mutação ligada ao X^{35,36}.

Clinicamente está associada a anemia hemolítica crónica (frequentemente totalmente compensada), miopatia, e disfunção neurológica, no entanto, o fenótipo é extremamente variável uma vez que é raro os doentes exibirem estas três alterações^{35,36}.

A atividade da enzima pode variar entre 0-20% do normal, porém, não existe correlação entre atividade desta, e o fenótipo clínico³⁶.

6.2.8 Outras enzimas

Mutações na enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, e fosfoglicerato mutase, ou não causam hemólise, ou ainda não foi estabelecida uma relação causal definitiva com esta^{6,35,36}, uma vez que não há casos identificados na literatura.

6.3 Enzimopatias das vias de metabolismo dos nucleosídeos

Há varias enzimas envolvidas no metabolismo das purinas e pirimidinas. As mais relevantes são a pirimidina-5'-nucleotidase (metabolismo das pirimidinas), e a adenilato cinase e a adenosina deaminase (metabolismo das purinas)³⁵. Defeitos nestas vão levar a anemia hemolítica não esferocítica³⁵.

6.3.1 Pirimidina-5'-nucleotidase (P5N)

Durante a maturação do eritrócito, a P5N degrada todos os nucleosídeos pirimidínicos dando origem a compostos solúveis e grupos fosfato³⁵. A atividade da P5N reduz rapidamente à medida que a célula envelhece, e, ao contrário das restantes enzimas dependentes da maturação eritrocitária, a muito rápida queda da atividade nos primeiros dias de maturação é seguida por adicional diminuição da atividade ao longo da semivida do GV⁴⁰.

A deficiência em P5N é uma entidade transmitida recessivamente, com anemia hemolítica de gravidade variável, e sinais típicos de hemólise³⁵. Cerca de duas dezenas de mutações causadoras de doença já foram identificadas; a grande maioria dos doentes apresenta-se como homozigótico para tais mutações⁴⁰.

Défice nesta enzima leva à acumulação de nucleosídeos pirimidínicos, que formam agregados insolúveis. Estes agregados apresentam-se no ESP como ponteados basófilos grosseiros, que, apesar de inespecífico, é muito sugestivo desta patologia³⁵. Contudo, os mecanismos precisos que levam à lise eritrocitária ainda não são totalmente conhecidos⁴⁰. Sugere-se que o efeito metabólico exercido por estes compostos possa levar à alteração na composição da bicamada lipídica⁴⁰. Outros efeitos que podem explicar a diminuição da sobrevivência eritrocitária são: a quelação de íons de magnésio, inibindo a atividade de enzimas que o usam como cofator; a interferência do fluxo glicolítico através da competição pelos locais de ligação do ATP das enzimas glicolíticas; o comprometimento do *shunt* das pentoses devido à diminuição do pH intracelular que inibe a ação da G6PD; aumento dos níveis de glutatona reduzida⁴⁰.

As manifestações clínicas desta patologia são as típicas observadas em doentes com hemólise crônica. A hemólise pode ser totalmente compensada em casos raros, mas é frequentemente ligeira a moderada⁴⁰.

Analiticamente, além da macrocitose, observam-se os achados típicos de hemólise com reticulocitose persistente e não relacionada com o grau da anemia⁴⁰. Ao ESP observam-se até 12% dos eritrócitos com ponteados basófilos grosseiros devido à precipitação intracelular de RNA não catabolizado⁴⁰.

O diagnóstico desta entidade inclui a medição espectrofotométrica de nucleosídeos (*scan* dos nucleótidos) de purinas e pirimidinas no hemolisado desproteínizado e cálculo do ratio purina:pirimidina - que se apresenta diminuído^{-35,40}; e demonstração de diminuição da

atividade enzimática desta⁴⁰. Existem múltiplos procedimentos que permitem quantificar a atividade enzimática desta, que se varia entre 1% e 64% da sua atividade normal. A atividade residual não se correlaciona nem com o fenótipo clínico, nem com o número de reticulócitos em sangue periférico⁴⁰.

6.3.2 Adenilato Cinase (AK)

É uma doença autossômica recessiva rara -com apenas 12 famílias identificadas- que condiciona anemia hemolítica moderada a grave e deterioração psicomotora^{35,41}.

A AK é responsável pela manutenção da homeostase energética da célula⁴¹.

Todos os mutantes estudadas demonstram uma diminuição, mais ou menos variável, das suas propriedades catabólicas, no entanto, o mecanismo fisiopatológico que leva a anemia ainda não foi esclarecido e o fenótipo clínico correlaciona-se mais fortemente com o tipo de mutação em causa, do que com a atividade enzimática residual⁴¹.

6.4 Enzimopatias do metabolismo da glutatona e do *shunt* das pentoses-fosfato

Estas vias metabólicas são o principal meio de proteção do GV contra o stresse oxidativo, e a glutatona reduzida é a principal fonte de poder redutivo da célula³⁵. Para alcançar o estado reduzido desta molécula, o eritrócito usa o desvio das pentoses-fosfato para produzir NADPH³⁵. Em condições normais, apenas uma minoria das moléculas de glicose é desviada para a vias das pentoses-fosfato, porém, em situações de stresse, o fluxo de glicose-6-fosfato por este *shunt* pode aumentar vinte vezes, por influência das enzimas TPI e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (sensíveis a estados oxidativos)⁴².

Distúrbios das enzimas associadas a estas vias normalmente causam hemólise apenas em condições de grande stresse oxidativo, levando ao desenvolvimento de anemia hemolítica aguda³⁵.

6.4.1 Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PD)

A G6PD catalisa o primeiro passo do *shunt* das pentoses-fosfato produzindo 6-fosfogluconolactona através da glicose-6-fosfato com concomitante redução do NADP a NADPH, essencial no processo de redução da glutatona^{35,43,44}.

Deficiência nesta enzima constitui a causa mais frequente de anemia hemolítica devido a uma enzimopatia^{6,43}. O déficit de G6PD é um distúrbio ligado ao cromossoma X e afeta mais de 400 milhões de pessoas a nível mundial^{35,43,44}. Apesar de ser uma patologia tipicamente associada ao sexo masculino, o desvio da lionização do cromossoma X pode ocorrer em mulheres a partir dos 40 anos e pode levar ao desenvolvimento do fenótipo típico da deficiência de G6PD; devido também à grande prevalência de variantes polimórficas, não é raro a ocorrência de doentes do sexo feminino com homozigotia para alelos mutados^{43,44}.

A razão pela qual esta patologia é tão prevalente é explicada pela vantagem seletiva dos afetados à infeção por *plasmodium*, no entanto, os mecanismos pela qual esta vantagem ocorre, ainda não estão perfeitamente esclarecidos⁴³.

Clinicamente, esta patologia pode ser dividida em 5 classes, sendo que a maior parte dos afetados pertence à classe II, III, e IV e estão associados apenas a episódios agudos de hemólise em consequência de situações que aumentam os níveis de stresse oxidativo. Em contraste, a classe I tem níveis de atividade enzimática inferior a 1%, e está associada a hemólise crónica não esferocítica, para além das crises hemolíticas supramencionadas³⁵. A classe V é composta por indivíduos que vêm a sua atividade enzimática de G6PD aumentada⁴⁴.

A icterícia neonatal é um achado relativamente frequente em doentes com deficiência de G6PD, afetando principalmente aqueles com as variantes mais severas da doença, como a variante mediterrânea, mas ocorre também em variantes associadas a doença ligeira⁴³.

As crises hemolíticas manifestam-se como episódios agudos de hemólise intravascular num indivíduo previamente assintomático após a exposição de determinados fármacos, infecções ou ingestão de feijões-fava⁴³. Mal-estar geral, dor abdominal, icterícia, e hemoglobinúria são sinais e sintomas característicos das crises hemolíticas; analiticamente, observam-se valores de hemoglobina muito baixos sintomáticos, reticulocitose importante e hiperbilirrubinemia e níveis muito elevados de LHD. Ao ESP com a coloração standard (May-Grünwald-Giemsa) podem ser observadas células de stress oxidativo (também chamadas de *bite cells*) que são GV com aspeto de mordedura, e com coloração supra-vital (azul de cresil ou violeta de metilo), corpos de Heinz (hemoglobina precipitada)^{35,44} assim como anisopoiquilocitose e policromasia^{43,44}. A severidade da anemia vai variar dependendo do estímulo oxidativo em causa, e da mutação presente; as crises hemolíticas podem estar presentes em ambos os géneros, porém, a sintomatologia é menos severa no sexo feminino⁴³. Apesar da sua potencial gravidade, a maior parte das crises hemolíticas são autolimitadas, uma vez que à medida que as células mais antigas lisam -devido ao stress oxidativo-, são substituídas por células mais jovens, com níveis maiores de atividade enzimática⁴³.

Como foi referido anteriormente, a anemia hemolítica crónica é também possível em doentes com atividade enzimática extremamente baixa; estes indivíduos apresentam-se com sintomas característicos (esplenomegalia, aumento da frequência de litíase biliar e hiperferritinemia). Para além da doença crónica, as crises agudas são também possíveis e com um maior número de fármacos (e com menores doses)⁴³.

Apenas raramente (G6PD Volendam e G6PD Amsterdam), déficit de G6PD leva a sinais e sintomas não hematológicos, como doença granulomatosa crónica, devido a disfunção neutrofilica. A relativa não afeção das células nucleadas é explicada pela sua constante produção enzimática⁴³.

Existe um elevado número de mutações associadas a esta patologia, algumas das quais, com frequência superior a 1%, passando então a chamar-se variantes polimórficas⁴³. Diferentes regiões vão ter diferentes prevalências de polimorfismos: a variante mediterrânea é prevalente nas áreas mediterrânicas, médio-oriente e Índia, ao passo que a variante A- é responsável pela vasta maioria de défice de G6PD em África⁴³. Estas variantes polimórficas vão ser incluídas na classe II (atividade enzimática entre 1-10%⁴⁴) e III (atividade enzimática entre 10-60%⁴⁴)⁴³.

As variantes esporádicas surgem com frequências muito mais reduzidas, sendo causadas maioritariamente por mutações *missense*; estão associadas a hemólise crónica, e são de classe I⁴³. Não existem mutações *nonsense* ou *frameshift* desta enzima especulando-se que a sua total ausência levaria a morte *in útero*⁴³.

O diagnóstico desta patologia é conseguido através do teste de Beutler (teste de rastreio rápido não específico⁴⁴) ou pela medição espectrofotométrica da atividade da enzima, podendo ambos serem falsamente negativos, se o indivíduo em causa estiver na fase de estado da crise hemolítica, devido ao elevado número de reticulócitos em sangue periférico^{43,44}.

Perante um episódio de hemólise aguda, tanto os métodos de rastreio, como a medição da atividade enzimática são normais, neste caso o exame molecular é preferível⁴⁴.

6.4.2 Glutathione Redutase (GR)

Esta enzima é responsável pela conversão da glutathione oxidada em glutathione reduzida. O seu défice é extremamente raro, e é causada por mutações transmitidas recessivamente³⁵. O fenótipo clínico é semelhante ao da deficiência de G6PD, com indivíduos afetados geralmente assintomáticos, com suscetibilidade aumentada à ingestão de determinados fármacos ou feijões-fava predispondo a crises hemolíticas agudas³⁵.

6.4.3 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGD); γ -glutamyl-cisteína-sintetase / Glutamato cisteína ligase (GCL); Glutathione Sintetase (GS)

As deficiências nestas enzimas são raras e condicionam apenas hemólise ligeira, sendo que o seu fenótipo é principalmente marcado por manifestações extra-hematológicas, como alterações neurológicas e aumento da suscetibilidade à infeção^{42,45}.

O diagnóstico é conseguido pela análise molecular do gene que as codifica.^{42,45}

6.4.4 Outras enzimas

Defeitos na glutathione peroxidase e noutras enzimas envolvidas na defesa contra o stress oxidativo não foram associadas a fenómenos hemolíticos^{35,42}.

7. Microangiopatias Trombóticas Hereditárias (TMA) hereditárias / Anemia Hemolítica Microangiopática (MAHA) hereditária

Com a descoberta de deficiências hereditárias da proteína ADAMTS13 na púrpura trombocitopénica trombótica (TTP congénita) e, mais recentemente, de mutações em proteínas-controlo do complemento em até dois terços dos doentes com síndrome hemolítico urémico atípico, surge a necessidade de separar estas duas entidades, que têm fisiopatologia, clínica e tratamento muito distintos⁶.

A TMA é definida pela presença de trombos de fibrina ou plaquetas na microcirculação. É caracterizada pela presença de anemia hemolítica não imune, trombocitopenia, e lesão de órgão-alvo^{6,46}.

A distinção entre a TTP congénita e o síndrome hemolítico urémico atípico, é feita clínica e laboratorialmente e pode trazer consigo grandes desafios; geralmente, ambas as entidades se apresentam com trombocitopenia, anemia hemolítica, e esquizócitos no ESP, no entanto, os mecanismos que os produzem, são completamente distintos^{6,46,47}. Os esquizócitos (eritrócitos fragmentados) são indicadores de aumento forças de cisalhamento e, na ausência de dispositivos intravasculares (como válvulas cardíacas mecânicas), são a consequência da estenose a nível arteriolar e capilar⁴⁶.

O diagnóstico destas duas patologias passa pela exclusão de outras causas de hemólise microangiopática e trombocitopenia como: dispositivos intravasculares, doença neoplásica, doença autoimune, infeção (*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *S. pneumoniae*, HIV), pancreatite, hipertensão severa (não exclui formas frustes de aHUS), fármacos (ticlopidina, bevacizumab, mitomicina, gentamicina, e inibidores da calcineurina), coagulação intravascular disseminada, hemoglobinúria paroxística noturna, síndrome do anticorpo antifosfolipídico, trombocitopenia induzida pela heparina ou Síndrome HELLP⁴⁶.

7.1 Púrpura Trombocitopénica Trombótica Congénita

A TPP congénita (também conhecida por Síndrome de Upshaw–Schulman) é causada por mutações da ADAMTS13 (e ausência de autoanticorpos para esta⁴⁸) e é responsável por menos de 10% dos casos de TTP^{49,50}. As mutações (maior parte *missense*⁵⁰) são herdadas recessivamente⁵¹, podem ocorrer dispersadas por todo o gene (não sendo conhecidos *hotspots*), e resultam numa diminuição da secreção/síntese/atividade da protease, ou no aumento da sua degradação^{48,50}.

A ADAMTS13 é uma metaloprotease determinante na prevenção da agregação do fator Von Willebrand (VWF) às plaquetas em circulação⁴⁶, clivando os multímeros do VWF -secretados pelas células endoteliais- em formas mais pequenas, hemostaticamente ativas, mas não protrombóticas⁵¹.

Na deficiência da ADAMTS13, a propensão do VWF e da plaqueta para formar agregados depende de vários fatores, sendo que o mais importante é o perfil tensional de cisalhamento na microcirculação⁴⁶. Em alguns doentes, a tensão de cisalhamento poderá não ser suficiente para ativar o VWF e a sua interação com a plaqueta não irá ocorrer (mesmo perante deficiência severa da ADAMTS13): este fenómeno irá explicar a grande variabilidade clínica encontrada⁴⁶. Existem doentes que têm a sua primeira manifestação da doença na idade adulta, enquanto outros, manifestam doença de início precoce^{49,50}.

A TTP congénita está frequentemente associada a deficiência severa da ADAMTS13 (definida por uma atividade da protéase menor que 10%); estes doentes têm acumulação de multímeros VWF ultra-grandes, não clivados, e estes, podem fazer parte do principal mecanismo fisiopatológico neste grupo de doentes⁴⁹. Estes indivíduos têm um risco de 41% de recorrência de manifestações clínicas aos 7 anos e meio *versus* 4% em indivíduos com atividade superior a 10%⁴⁹. Doentes com alguma atividade residual da ADAMTS13 estão

relativamente protegidos até que algum evento desafie o seu precário equilíbrio (gravidez, processo infeccioso, ingestão alcoólica, cirurgia por exemplo)^{49,50}.

Estudos sugerem que doentes com baixos níveis de ADAMTS13 (<5%) têm tendência para ter níveis significativamente diminuídos de plaquetas ($\leq 30 \times 10^9/l$), diminuição da creatinina sérica (≤ 2.26 mg/dl), e anticorpos antinucleares positivos: a combinação destes três critérios obteve uma especificidade de 98.1% na identificação de doentes com baixos níveis da protease^{47,52}. O uso da contagem das plaquetas e da creatinina sérica poderá assim prever os valores da ADAMTS13 para assim chegar ao diagnóstico de forma mais célere^{49,52}.

O fenótipo desta patologia é explicado pela formação de agregados de VWF e plaquetas na microcirculação levando então à isquemia tecidual, e manifestando-se por alterações neurológicas (25-79% dos doentes⁵²), dor abdominal, pancreatite, enfarte agudo do miocárdio⁴⁶, febre⁵⁰ e lesão renal⁵².

O doente típico com TTP congénita será o recém-nascido que desenvolve trombocitopenia e icterícia horas após o nascimento, hemólise e esquizócitos no ESP, ocasionalmente, episódios convulsivos e obnubilação mental, e que responde favoravelmente a transfusão sanguínea ou exsanguineotransfusão. Laboratorialmente, apresenta atividade reduzida da ADAMTS13 (<10%) e não tem presentes anticorpos inibitórios para esta proteína⁵³.

De notar que os afetados podem apresentar lesão renal aguda e ser erroneamente diagnosticados com aHUS até que seja realizado o teste da atividade da ADAMTS13^{46,47}. Da mesma forma, a presença de deficiência severa de ADAMTS13 não deve imediatamente excluir a presença de uma possível aHUS⁴⁷.

O diagnóstico da TTP congénita é feito através da documentação da trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática com sinais de fragmentação dos GV (e exclusão de

causas alternativas que possam explicar estes achados), redução da atividade da ADAMTS13, e pela análise molecular do gene que a codifica^{49,50}.

7.2 Síndrome Hemolítico Urémico Atípico (aHUS)

O sistema complemento é parte integral do sistema imune e compreende as vias clássica, da lectina, e alternativa. As vias clássica e da lectina são ativadas por complexos imunes ou pela manose microbiana, e levam à formação do complexo de ataque à membrana (C5b-9) e de toxinas anafilactóides (C3a e C5a). A via alternativa, tem como função a amplificação das anteriores, e está regulada por múltiplas proteínas (fator I, fator H, CD46, e trombomodulina), permitindo a cessação da atividade do complemento, assim que a infecção seja resolvida⁵⁴ (**figura 8**).

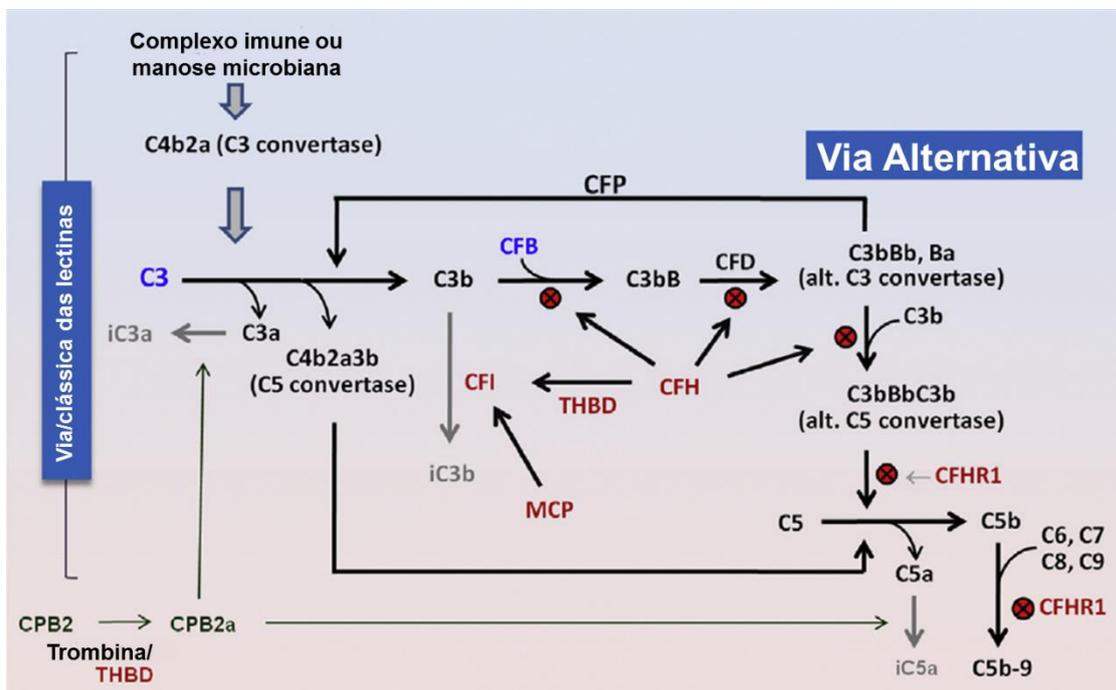


Figura 8. Ativação do sistema complemento e sua regulação. adaptado de [54].

Legenda: CFP – fator P do complemento; CFB – fator B do complemento; CFD – fator D do complemento; CFI – fator I do complemento; MCP – proteína cofatora de membrana; THBD – trombomodulina; CFH – fator H do complemento; CFHR1 – proteína 1 relacionada com fator H do complemento; CPB2 – carboxipeptidase B2; CPB2a – forma ativa da carboxipeptidase B2

A aHUS resulta da deficiente regulação do sistema complemento⁴⁶. Pode resultar de mutações de perda de função (do fator H, do CD46, do fator I, ou da trombomodulina), de ganho de função (do fator B, do C3), ou ainda da presença de autoanticorpos para o fator H (extremamente raros⁵⁵)⁴⁶, cujo estudo está para além do objetivo deste projeto. Porque a lista de moléculas afetada permanece incompleta, um teste genético não exclui o diagnóstico de aHUS^{46,47,54}.

O defeito no complemento leva à ativação descontrolada de C5b-9, provocando lesão endotelial, e expondo moléculas protrombóticas do subendotélio conduzindo a estenose vascular e ativação do sistema de coagulação^{46,54}.

A produção de C3a e C5a está associada a alterações da permeabilidade capilar com consequente edema de múltiplos órgãos; clinicamente, este edema reflete-se por: lesão renal, alterações neurológicas (10-30%⁵²), disfunção cardíaca, derrame pericárdico, infiltrados pulmonares, dor abdominal, náusea, vômitos, diarreia, pancreatite, ascite, e anasarca⁴⁶. Doentes que apresentem lesão renal irão ter um prognóstico menos favorável: cerca de metade chegarão a um estágio de doença renal terminal no primeiro episódio de aHUS e dois terços nos cinco anos subsequentes⁵⁶.

Tanto a TTP congénita como a aHUS se podem apresentar com sintomas neurológicos, pelo que a presença/ausência destes não podem ser usados na distinção entre estas duas entidades^{46,47}.

Estudos recentes têm tido resultados contraditórios quanto ao uso da atividade da ADAMTS13 no diagnóstico de aHUS, principalmente, pela ausência de critérios exatos e sensíveis no diagnóstico desta patologia, inobstante, o uso deste teste tem ainda utilidade na diferenciação entre estas duas entidades, e permite a realização do correto diagnóstico e da conduta apropriada na maior parte dos doentes⁴⁷.

Biomarcadores que traduzem a ativação desregulada do complemento, como o C3, fator H ou C4, são de utilidade limitada, uma vez que apenas um terço dos doentes (com aHUS confirmado por sequenciação de DNA) se apresentam com alteração nestes⁵⁵.

O diagnóstico de aHUS pode ser sugerido num doente com MAHA, atividade não deficitária de ADAMTS13, envolvimento renal mais severo, trombocitopenia (contagens de plaquetas mais altas que na entidade anterior, sendo que alguns doentes podem apresentar uma contagem normal⁵⁶), ausência de outra patologia que possa explicar o quadro clínico, e por uma resposta favorável ao tratamento empírico com eculizumab^{47,54}. O diagnóstico definitivo pode necessitar do sequenciamento de múltiplos genes (em até 50% doentes, o diagnóstico é apenas inferido com base na sua melhoria clínica após tratamento específico)^{46,47,55}. Para além do diagnóstico, a identificação do tipo de gene envolvido contribui para avaliar o prognóstico do doente⁵⁵.

Atualmente, a procura por novos MCD para a aHUS são uma área de intensa investigação.

8. Anemia Deseritropoiética Congénita (CDA)

As CDA são um grupo heterogéneo de doenças raras que afetam a eritropoiese. Caracterizam-se pela associação de eritropoiese ineficaz congénita, precursores eritróides morfológicamente anormais, resposta eritrocitária subótima, e ausência de alterações morfológicas nas restantes linhagens celulares. Historicamente eram divididas em 3 classes (tipo 1, tipo 2, e tipo 3) baseado na morfologia dos eritroblastos a nível medular⁵⁷. Em geral, o diagnóstico destas entidades faz-se pela presença de quatro critérios: presença de anemia congénita ou hereditária, evidência de eritropoiese ineficaz, alterações morfológicas típicas ao exame da MO, e exclusão de outras síndromes que preenchem os dois primeiros critérios (talassémias)⁵⁷.

8.1 Anemia Deseritropoiética tipo I (CDA-1)

A CDA-1 é uma patologia rara, transmitida recessivamente, não havendo quaisquer alterações clínicas ou hematológicas em heterozigotia⁵⁷. Foram identificados dois genes possivelmente implicados na fisiopatologia desta doença: o *CDANI* e *C15ORF41*. Com base nos genes envolvidos, sugere-se que a CDA-1 resulta de defeitos na replicação de DNA e da organização da cromatina⁵⁸.

No período fetal e neonatal, estes doentes apresentam restrição de crescimento, hepatoesplenomegália, icterícia, e hipertensão pulmonar. Os doentes podem ainda apresentar alterações esqueléticas (polidactilia ou sindactilia), e, nos casos mais severos, expansão dos ossos frontal e parietal. Praticamente todos os doentes irão desenvolver sobrecarga de ferro⁵⁷.

O valor da hemoglobina varia entre 70-111 g/l e a anemia é macrocítica (VGM 100-120 fl), o RDW encontra-se aumentado e o número de reticulócitos está abaixo daquele que se esperaria para o grau de anemia. Os níveis de LDH, ferritina e bilirrubina encontram-se

aumentados^{57,59}. Ao ESP observa-se anisopoiquilocitose, ponteados basófilos em alguns GV, e precursores eritróides^{57,60}.

A MO é hiperplasmática com presença de precursores eritroides anormais com um aspecto megaloblástico, com presença de células tri e tetranucleadas. A presença de pontes de cromatina internucleares afetando uma pequena percentagem de eritroblastos é quase patognomónica desta patologia e permite o seu diagnóstico⁵⁷⁻⁵⁹. À microscopia eletrónica, estes doentes apresentam eritroblastos com heterocromatina com aspeto de “queijo suíço”⁶¹.

O diagnóstico da CDA-1 pode ainda ser alcançado através da sequenciação dos genes afetados^{60,61}.

8.2 Anemia Deseritropoiética Congénita tipo II (CDA-2)

A CDA-2 é a CDA mais frequente^{58,60}, estando reportados mais de 450 casos no mundo⁵⁸. É transmitida recessivamente, sendo causada por mutações no cromossoma 20q11.2⁶⁰, mais especificamente no gene *SEC23B* (cuja proteína está envolvida nas vias secretoras das células eucariotas)⁵⁷⁻⁵⁹, essencial para a homeostasia da membrana, a localização das proteínas dentro da célula, e a secreção de fatores extracelulares⁶¹. Estudos indicam que a fisiopatologia desta doença está relacionada com defeitos na glicosilação das proteínas da membrana eritrocitária (proteína de banda 3, banda 4.5 e glicoforina A)⁶⁰, levando a uma agregação anormal das proteínas de banda 3 na membrana da célula e aumentando a sua destruição na circulação esplénica⁶¹.

O diagnóstico desta patologia costuma ser mais tardio, devido à menor severidade da anemia associada (Hb (g/l): 95 ± 7 ⁵⁹); para além desta, os doentes apresentam-se ictericos, com hepatoesplenomegália, e com sinais de sobrecarga de ferro^{57,59,60}. Esta patologia tem clínica semelhante à HS, pelo que uma correta avaliação do número de reticulócitos (normal

ou ligeiramente aumentado, e inapropriadamente baixo para o valor de Hb⁵⁹) e do valor da ferritina, são essenciais para o diagnóstico diferencial entre estas duas entidades⁶¹.

A anemia é normocítica, o RDW encontra-se aumentado, assim como os valores de LDH, ferritina e bilirrubina indireta; ao ESP observa-se anisopoiquilocitose, anisocromasia, ponteados basófilos em alguns GV, e precursores eritróides^{57,60,61}. A MO apresenta-se hipercelular com hiperplasia eritróide, e com um grande número de eritroblastos binucleados (núcleos de tamanho e desenvolvimento semelhante)^{60,61}. À microscopia eletrônica detetam-se eritroblastos com porções da membrana duplicada (devido ao excesso de retículo endoplasmático)^{57,60}.

Os eritrócitos dos doentes com CDA-2 sofrem lise em soro acidificado (teste de Ham), devido à presença de um anticorpo da classe IgM que reconhece um antígeno específico destes⁶¹. O teste de Ham tem alta especificidade no diagnóstico da CDA-2, porém, devido à sua complexidade e difícil padronização, caiu em desuso⁵⁸; os eritrócitos destes doentes aglutinam em soro contendo anticorpos anti-antígeno i e, apesar desta resposta ser altamente sensível, não é específica⁶⁰. A análise da membrana eritrocitária através do SDS-PAGE provou-se extremamente importante uma vez que identifica um perfil típico da proteína de banda 3 (e da banda 4.5⁵⁸), devido ao defeito na sua glicosilação^{6,57,59,60}.

Num doente fenotipicamente típico, o diagnóstico definitivo é conseguido pela sequenciação do gene mutado, não sendo necessários outros testes como a microscopia eletrônica da MO ou o SDS-PAGE⁵⁸.

8.3 Anemia Deseritropoiética Congénita tipo III (CDA-3)

É um subtipo raro da doença, transmitida de modo autossómico dominante estando também descritos mutações *de novo*^{57,58,60}. É causada por uma mutação no gene *KIF23* resultando em alterações na citocinese e formação de células multinucleadas⁵⁸.

A clínica é menos severa que os restantes subtipos, e a anemia é ligeira. Os doentes apresentam-se com alterações oculares, não têm sobrecarga de ferro (porque têm anemia hemolítica intravascular) ou hepatoesplenomegália^{57,60}.

O valor da hemoglobina varia entre 80-140g/l, o VGM está aumentado e o RDW está aumentado. A LDH está aumentada, porém, os valores de ferritina e de bilirrubina estão normais⁵⁷. O ESP revela anisopoiquilocitose marcada e macrocitose⁶⁰.

À observação da MO, observam-se células precursoras gigantes frequentemente multinucleadas ou com poliploidia (conteúdo de DNA pode ser até 48 vezes mais que o normal)⁶⁰.

8.4 Variantes CDA

São outras formas de CDA que não se enquadram em nenhuma das patologias supracitadas, (refletindo a grande variabilidade que existe neste grupo de doenças) causadas por defeitos em múltiplos outros genes incluindo os fatores de transcrição específicos da linha eritrocitária (GATA-1 e KLF1) e noutros onde a CDA faz parte de uma síndrome clínica mais alargada⁵⁸.

9. Conclusão E Proposta De Um Algoritmo De Diagnóstico

Se é relativamente fácil chegarmos ao diagnóstico de uma anemia hemolítica hereditária, mais desafiante será a identificação da entidade nosológica exata. As anemias hemolíticas são um grupo heterogéneo de doenças, com enorme variabilidade fenotípica podendo mesmo, duas ou mais entidades, apresentarem-se de forma semelhante (clínica e hematologicamente). Torna-se fundamental, a realização de uma história pessoal e familiar exaustiva.

Estando perante o desenvolvimento de exames diagnósticos cada vez mais complexos e tecnicamente exigentes, não devemos descurar os meios mais básicos, por sua vez, mais informativos, tais como o esfregaço de sangue periférico e o hemograma completo. Face ao crescente número de MCD disponível para a identificação destas patologias, torna-se essencial o conhecimento fisiopatológico de cada uma delas, de modo a evitar o uso irrefletido destes, que tornam apenas mais moroso e dispendioso, o correto diagnóstico do doente.

Aliado ao conhecimento fisiopatológico, o clínico deve ainda saber identificar determinados fatores que podem conduzir a suspeição para determinadas doenças, e afastar outras, entre os quais: a origem étnica do doente e a prevalência mundial da doença.

Numa tentativa de padronizar este grupo complexo de patologias, propõe-se na **figura9**, um algoritmo diagnóstico que permita, de forma eficaz, chegar ao diagnóstico definitivo. O diagnóstico exato é crucial uma vez que não existem medidas terapêuticas que não estejam isentas de riscos de agravamento da saúde do doente. De notar, que não estão contempladas no algoritmo, situações onde mais de uma entidade nosológica está presente, assim como doentes com múltiplas comorbilidades com potencial de mascarar o diagnóstico.

Futuramente, pesquisas adicionais devem ser levadas a cargo de forma a testar e validar o algoritmo proposto, e permitir a sua integração na prática clínica.

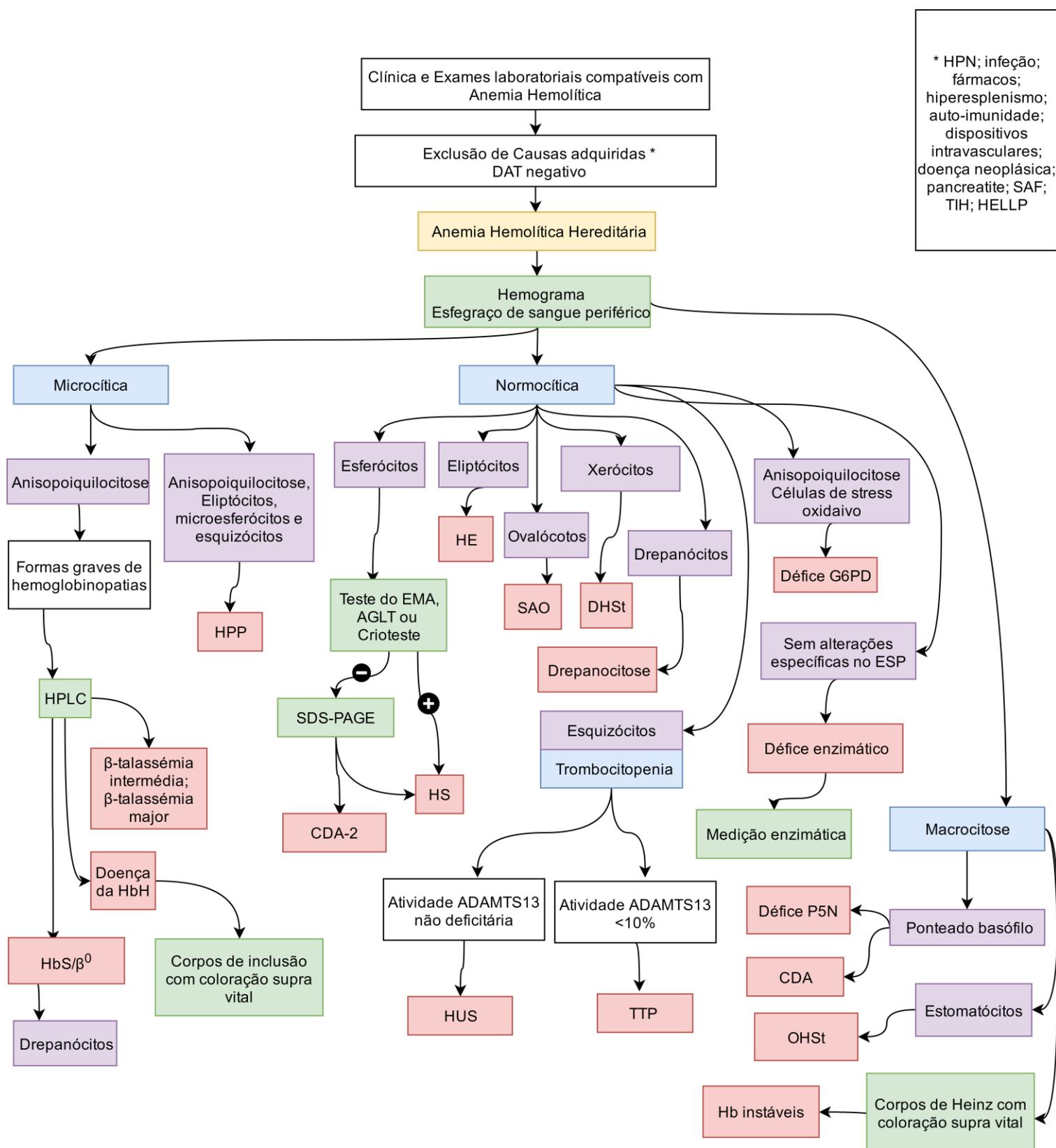


Figura 9: Proposta de algoritmo diagnóstico para as anemias hemolíticas hereditárias

10. Agradecimentos

À professora Doutora Ana Bela Sarmiento, minha orientadora, e à Dra. Tabita Magalhães Maia, minha coorientadora, pela disponibilidade, compreensão e amizade que demonstraram, e pelo seu imensurável contributo científico.

Aos meus pais, Renato e Rosalina, e à minha irmã Ana, pelo incansável apoio.

Aos meus amigos e colegas, Filipe, André, e Patrícia por me terem acompanhado nesta viagem, e pelo seu precioso contributo neste projeto.

11. Referências bibliográficas

1. Kujovich, J. L. Evaluation of Anemia. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **43**, 247–264 (2016).
2. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. 2015. Harrison's Principles of Internal Medicine, 19e. New York, NY: McGraw-Hill; 2015.
3. Alaarg, A., Schiffelers, R. M., Van Solinge, W. W. & Van Wijk, R. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Front. Physiol.* **4 DEC**, 1–15 (2013).
4. Hoffbrand, A. Victor; Higgs, Douglas R.; Keeling, David M.; Mehta, Atul B. 2016 Postgraduate Haematology, 7e, West Sussex: Wiley Blackwel; 2016
5. Barcellini, W. & Fattizzo, B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis. Markers* **2015**, 1–7 (2015).
6. Beris, P. & Picard, V. Non-immune Hemolysis: Diagnostic Considerations. *Semin. Hematol.* **52**, 287–303 (2015).
7. Noronha, S. A. Acquired and Congenital Hemolytic Anemia. *Pediatr. Rev.* **37**, 235–246 (2016).
8. Green, R. & Dwyre, D. M. Evaluation of Macrocytic Anemias. *Semin. Hematol.* **52**, 279–286 (2015).
9. Da Costa, L., Galimand, J., Fenneteau, O. & Mohandas, N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* **27**, 16–178 (2013).
10. Hoffman, R., Edward J. Benz, J., Silberstein, L. E., Heslop, H. E., Weitz, J. I., &

- Anastasi, J. (2013). Hematology: basic principles and practice. Philadelphia: Elsevier; 2013.
11. Gallagher, P. G. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 1349–1362 (2013).
 12. Delaunay, J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev.* **21**, 1–20 (2007).
 13. Da Costa, L. *et al.* Blood Cells , Molecules and Diseases Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders : Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells, Mol. Dis.* **56**, 9–22 (2016).
 14. Perrotta, S., Gallagher, P. G. & Mohandas, N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* **372**, 1411–1426 (2008).
 15. King, M. J. *et al.* ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, 304–325 (2015).
 16. King, M. J. & Zanella, A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int. J. Lab. Hematol.* **35**, 237–243 (2013).
 17. Iolascon, A., Avvisati, R. A. & Piscopo, C. La sphérocytose héréditaire. *Transfus. Clin. Biol.* **17**, 138–142 (2010).
 18. Bolton-Maggs, P. H. B., Langer, J. C., Iolascon, A., Tittensor, P. & King, M. J. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis - 2011 update. *Br. J. Haematol.* **156**, 37–49 (2012).
 19. Lazarova, E., Gulbis, B., Oirschot, B. van & van Wijk, R. Next-generation osmotic

- gradient ektacytometry for the diagnosis of hereditary spherocytosis: interlaboratory method validation and experience. *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**, 394–402 (2017).
20. Golafshan, H. A. *et al.* Evaluation of Red Cell Membrane Cytoskeletal Disorders Using a Flow Cytometric Method in South Iran. *Turkish J. Hematol.* **31**, 25–31 (2014).
 21. Mirchev, R., Lam, A. & Golan, D. E. Membrane compartmentalization in Southeast Asian ovalocytosis red blood cells. *Br. J. Haematol.* **155**, 111–121 (2011).
 22. Traeger-Synodinos, J. & Harteveld, C. L. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Biomark. Med.* **8**, 119–31 (2014).
 23. Higgs, D. R., Engel, J. D. & Stamatoyannopoulos, G. Thalassemia. *Lancet* **379**, 373–383 (2012).
 24. Kohne, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch. Ärzteblatt Int.* **108**, 532–40 (2011).
 25. Kutlar, F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin* **31**, 243–250 (2007).
 26. Bain, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev.* **25**, 205–213 (2011).
 27. Vichinsky, E. Hemoglobin E Syndromes. *Hematology* **2007**, 79–83 (2007).
 28. Rees, D. C., Williams, T. N. & Gladwin, M. T. Sickle-cell disease. *Lancet* **376**, 2018–2031 (2010).
 29. Odièvre, M. H., Verger, E., Silva-Pinto, A. C. & Elion, J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J. Med. Res.* **134**, 532–537 (2011).

30. Morris, C. R. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. *Haematologica* **96**, 1–5 (2011).
31. Martin, A. & Thompson, A. A. Thalassemias. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 1383–1391 (2013).
32. Hartevelde, C. L. & Higgs, D. R. α -thalassaemia. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 13 (2010).
33. Hoppe, C. C. Prenatal and newborn screening for hemoglobinopathies. *Int. J. Lab. Hematol.* **35**, 297–305 (2013).
34. Fucharoen, S. & Winichagoon, P. Haemoglobinopathies in Southeast Asia. *Indian J. Med. Res.* **134**, 498–506 (2011).
35. Koralkova, P., van Solinge, W. W. & van Wijk, R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 388–397 (2014).
36. van Wijk, R. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* **106**, 4034–4042 (2005).
37. Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., Chiarelli, L. R. & Valentini, G. Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Rev.* **21**, 217–231 (2007).
38. Manco, L. *et al.* Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia caused by red cell glucose-6-phosphate isomerase (GPI) deficiency in two Portuguese patients: Clinical features and molecular study. *Blood Cells, Mol. Dis.* **60**, 18–23 (2016).
39. Orosz, F., Oláh, J. & Ovádi, J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1168–74 (2009).

40. Zanella, A., Bianchi, P., Fermo, E. & Valentini, G. Hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Br. J. Haematol.* **133**, 113–123 (2006).
41. Abrusci, P. *et al.* Erythrocyte adenylate kinase deficiency: characterization of recombinant mutant forms and relationship with nonspherocytic hemolytic anemia. *Exp. Hematol.* **35**, 1182–1189 (2007).
42. Van Zwieten, R., Verhoeven, A. J. & Roos, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **67**, 377–386 (2014).
43. Mason, P. J., Bautista, J. M. & Gilsanz, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev.* **21**, 267–283 (2007).
44. Cappellini, M. & Fiorelli, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* **371**, 64–74 (2008).
45. Ristoff, E. & Larsson, A. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J. Rare Dis.* **2**, 16 (2007).
46. Tsai, H.-M. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and the Atypical Hemolytic Uremic Syndrome An Update. *Hematol Oncol Clin N Am* **27**, 565–584 (2013).
47. Cataland, S. R. & Wu, H. M. Diagnosis and management of complement mediated thrombotic microangiopathies. *Blood Rev.* **28**, 67–74 (2014).
48. Ishizashi, H. *et al.* Quantitative Western blot analysis of plasma ADAMTS13 antigen in patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb. Res.* **120**, 381–386 (2007).
49. Lotta, L. A., Wu, H. M., Musallam, K. M. & Peyvandi, F. The emerging concept of

- residual ADAMTS13 activity in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Rev.* **27**, 71–76 (2013).
50. Pérez-Rodríguez, A. *et al.* Inherited ADAMTS13 deficiency (Upshaw-Schulman syndrome): A short review. *Thromb. Res.* **134**, 1171–1175 (2014).
 51. Zhou, Z. *et al.* Effects of naturally occurring mutations in CUB-1 domain on synthesis, stability, and activity of ADAMTS-13. *Thromb. Res.* **124**, 323–327 (2009).
 52. Cataland, S. R. & Wu, H. M. Atypical hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: Clinically differentiating the thrombotic microangiopathies. *Eur. J. Intern. Med.* **24**, 486–491 (2013).
 53. Tsai, H. M. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Thrombotic Disorder Caused by ADAMTS13 Deficiency. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **21**, 609–632 (2007).
 54. Tsai, H.-M. A Mechanistic Approach to the Diagnosis and Management of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Transfus. Med. Rev.* **28**, 187–197 (2014).
 55. Mannucci, P. M. & Cugno, M. The complex differential diagnosis between thrombotic thrombocytopenic purpura and the atypical hemolytic uremic syndrome: Laboratory weapons and their impact on treatment choice and monitoring. *Thromb. Res.* **136**, 851–854 (2015).
 56. Fakhouri, F., Frémeaux-Bacchi, V. & Loirat, C. Atypical hemolytic uremic syndrome: From the rediscovery of complement to targeted therapy. *Eur. J. Intern. Med.* **24**, 492–495 (2013).
 57. Kamiya, T. & Manabe, A. Congenital dyserythropoietic anemia. *Int. J. Hematol.* **92**, 432–438 (2010).

58. Iolascon, A., Heimpel, H., Wahlin, A. & Tamary, H. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. *Blood* **122**, 2162–2166 (2013).
59. Russo, R. *et al.* Retrospective cohort study of 205 cases with congenital dyserythropoietic anemia type II: Definition of clinical and molecular spectrum and identification of new diagnostic scores. *Am. J. Hematol.* **89**, 169–175 (2014).
60. Renella, R. & Wood, W. G. The Congenital Dyserythropoietic Anemias. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **23**, 283–306 (2009).
61. Iolascon, A., Esposito, M. R. & Russo, R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: From morphology to molecular approach. *Haematologica* **97**, 1786–1794 (2012).