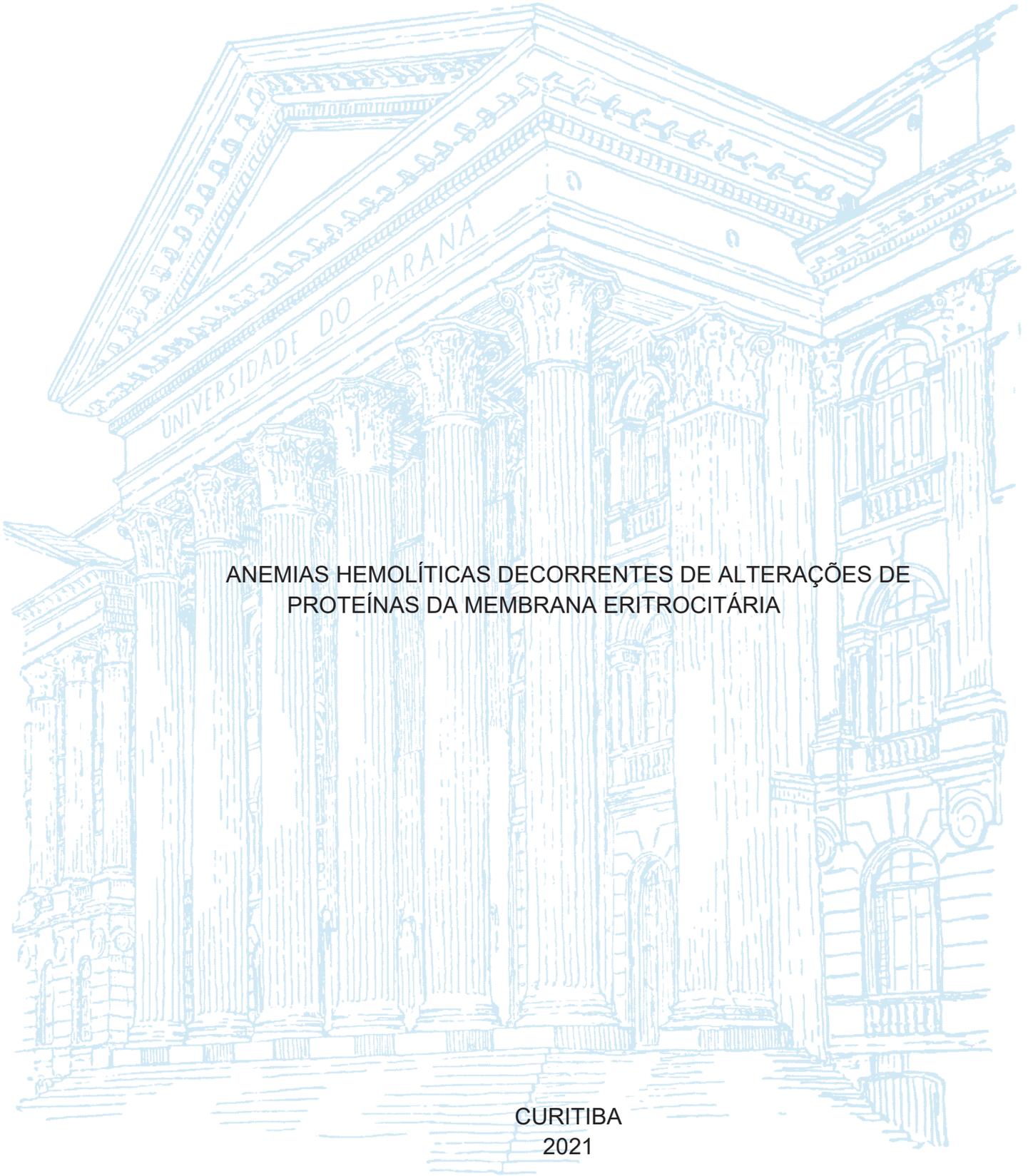


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATHERINE WERNECK
VIVIAN TIEMI OKADA

ANEMIAS HEMOLÍTICAS DECORRENTES DE ALTERAÇÕES DE
PROTEÍNAS DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

CURITIBA
2021



KATHERINE WERNECK
VIVIAN TIEMI OKADA

ANEMIAS HEMOLÍTIICAS DECORRENTES DE ALTERAÇÕES DE
PROTEÍNAS DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Federal do
Paraná como requisito à obtenção do título de
Farmacêutico.

Orientador(a): Prof.^a Dra.^a Amanda Rabello Crisma

CURITIBA
2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a mim pela força de vontade e determinação para a execução e conclusão deste trabalho. Agradeço ao meu noivo Diovani Matos por todo o auxílio e dedicação em me ajudar de todas as formas possíveis para que esse trabalho fosse realizado. Também aos meus pais Leomara Werneck, Paulo Werneck e irmão Paulo Werneck Junior por todo o estímulo, apoio e suporte para a conclusão do curso. Ao meu filho Benjamin Matos por ser a motivação para seguir em frente. Gostaria de agradecer aos meus colegas Carolina Perini, Caroline Testoni, Vivian Okada, Yahya Iskandar e Pamela Conde, por todo o auxílio acadêmico e psicológico durante toda a graduação. Aos meus cunhados Karina Mannes e Dionatan Matos e amigas Marcela Alves, Amanda Polichuk, Andreia Roxadelli por aguentar as minhas lamúrias durante todo o curso. Agradeço aos professores Railson Henneberg, por todo o conhecimento em hematologia e por despertar o meu interesse pela área, e Amanda Crisma por todo o conhecimento e por aceitar nos orientar neste trabalho. Também agradeço ao Curso de Farmácia e a Universidade Federal do Paraná por todo o subsídio e suporte para a realização do curso e deste trabalho.

Katherine Werneck

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais Nelson Okada e Eloisa Emi U. Okada, pelo apoio e paciência nos momentos mais difíceis da minha trajetória no curso. Ao meu irmão Thiago Yuji Okada por sempre estar ao meu lado me dando suporte e incentivo para continuar. Agradeço aos meus colegas e amigos Carolina Perini, Caroline Testoni, Katherine Werneck e Yahya Iskandar por todo apoio moral e incentivo acadêmico durante todo o curso de graduação. À minha amiga Cinthya Takesaki por todo auxílio e conselhos para prosseguir adiante. Agradeço imensamente à professora Amanda Crisma por ter aceitado ser nossa orientadora e pela oportunidade em despertar meu interesse em hematologia. Ao professor Railson Henneberg agradeço por todo conhecimento e interesse em hematologia. E finalmente, ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade e subsídios acadêmicos para realização deste trabalho.

Vivian Tiemi Okada

RESUMO

O trabalho possui como objetivo descrever a deficiência das principais proteínas de membrana dos eritrócitos nos dois dos principais tipos de anemias hemolíticas: eliptocitose hereditária e a esferocitose hereditária (do qual faz parte a piropoiquilocitose hereditária, que é um quadro mais grave da doença). Também objetivou-se relacionar os desafios do diagnóstico diferencial aplicado para essas doenças. As anemias podem ser classificadas de acordo com a morfologia dos eritrócitos ou seu mecanismo biológico, sendo que as doenças hemolíticas se caracterizam pela destruição precoce dos eritrócitos. Os principais métodos utilizados no diagnóstico das anemias hemolíticas incluem testes de triagem e testes confirmatórios. Como exemplos estes últimos, podem ser citados a eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida, a citometria de fluxo utilizando eosina 5-maleimida, o teste de fragilidade osmótica, o teste de criohemólise e o *pink* teste. De modo geral, observa-se que a deficiência de α -espectrina, β -espectrina ou proteína da banda 4.1 está intimamente ligada a eliptocitose hereditária; já a deficiência de produção de banda 3, anquirina, α e β espectrina e proteína 4.2 está interligada com a esferocitose hereditária. No entanto, limitações existentes nas principais metodologias dificultam o diagnóstico diferencial e apontam para a necessidade de se buscar métodos com maior especificidade e sensibilidade para identificar com precisão as alterações de membrana presentes nos diversos tipos de anemias hemolíticas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	-	Sequência maturativa dos eritrócitos.....	8
FIGURA 2	-	Estrutura da membrana do eritrócito.....	12
FIGURA 3	-	Perfil eletroforético das proteínas de membrana eritrocitária.....	20
FIGURA 4	-	Representação esquemática da citometria de fluxo.....	21
FIGURA 5	-	Resultados da citometria de fluxo.....	22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	Doenças ligadas às principais anormalidades proteicas
.....		9

LISTA DE ABREVIATURAS

AGLT	-	Lise pelo glicerol acidificado
CDAII	-	Anemia diseritropoética congênita tipo II
CF	-	Citometria de fluxo
CFM	-	Citometria de fluxo multiparamétrica
EMA	-	Eosina 5-maleimida
FOE	-	Teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos
FSC	-	“ <i>Forward Scatter</i> ” - Espalhamento frontal
GPA	-	Glicoforina A
GPB	-	Glicoforina B
GPC	-	Glicoforina C
GPD	-	Glicoforina D
G6PD	-	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Hb	-	Hemoglobina
HS	-	Esferocitose hereditária
HE	-	Eliptocitose hereditária
HPP	-	Piropoiquilocitose hereditária
MCF	-	Fluorescência média do canal
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OHS	-	Estomatocitose hereditária sobre-hidratada
PBS	-	Tampão fosfato-salino
PMTs	-	<i>Photomultiplier tubes</i> - tubos fotomultiplicadores
pO ₂	-	Pressão parcial de O ₂
RNA	-	Ácido Ribonucleico
SAO	-	Ovalocitose do sudeste asiático hereditária
SCAF	-	Separador celular ativado por fluorescência
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	-	Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida
SSC	-	“ <i>Side Scatter</i> ” - Espalhamento lateral
VCM	-	Volume Corpuscular Médio

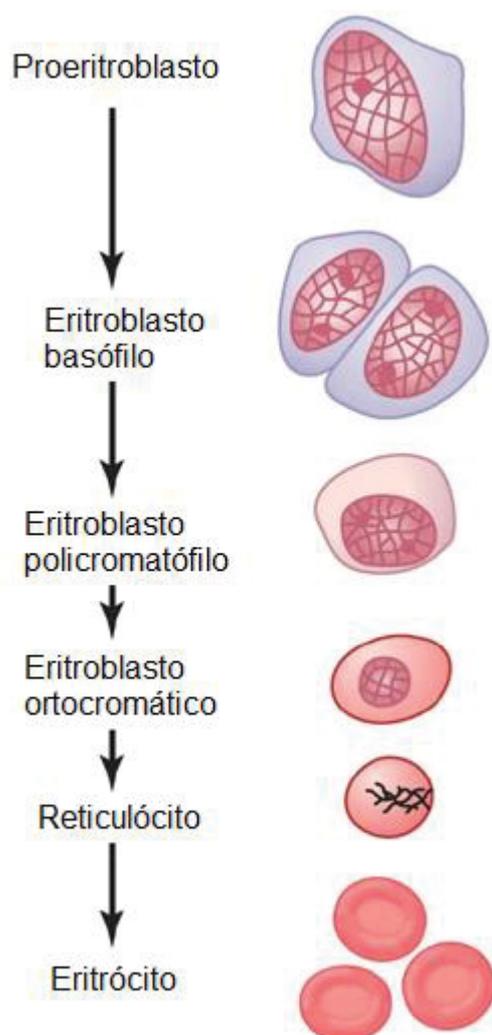
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Estrutura do eritrócito	11
2.2. Anemias hemolíticas	14
2.3. Patologias	15
2.3.1. Eriptocitose hereditária (HE)	15
2.3.2 Esferocitose hereditária (HS) e Piroptocitose hereditária (HPP)	16
2.4. Desafios do Diagnóstico Diferencial	18
2.4.1. Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)	18
2.4.2. Citometria de fluxo por ligação de eosina 5-maleimida (EMA)	20
2.4.3. Teste de fragilidade osmótica	23
2.4.4. Outros testes	24
3. CONCLUSÃO	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

As células sanguíneas denominadas eritrócitos são altamente especializadas e tem sua origem na medula óssea, onde passam por vários estágios de maturação, como mostrado na figura 1, até atingirem maturidade e serem enviadas ao sangue periférico, esse processo recebe o nome de eritropoese.

FIGURA 1- SEQUÊNCIA MATURATIVA DOS ERITRÓCITOS



Hall: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 12th Edition
Copyright © 2011 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved. -modificada

Os eritrócitos possuem como função principal dentro do sistema sanguíneo o transporte de O_2 dos pulmões aos tecidos e a retirada do CO_2 dos tecidos. Os eritrócitos são usualmente utilizados para estudos, principalmente quando se

pretende estudar membranas celulares, pois diferindo das outras células, eles não possuem núcleo e nem organelas. Segundo Murador e Deffune (2007), a membrana dos eritrócitos consiste em proteínas do citoesqueleto e uma bicamada fosfolipídica, que representa aproximadamente 50% de sua massa total e forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular. As trocas entre estes compartimentos são feitas através de bombas, canais de trocas de íons e transporte molecular como o da glicose. Aproximadamente 98% da proteína citoplasmática do eritrócito é composta por milhões de moléculas de hemoglobina (Hb), que transportam o oxigênio.

A produção inadequada de qualquer proteína presente na membrana pode levar a doenças denominadas anemias hemolíticas (Tabela 1). Geralmente, as anemias causadas por alterações estruturais da membrana eritrocitária podem ter origem genética ou adquiridas, como por exemplo, nas doenças autoimunes.

Tabela 1- DOENÇAS LIGADAS ÀS PRINCIPAIS ANORMALIDADES PROTEICAS

Desordem proteica	Herança genética	Doença hereditária
Espectrina e anquirina	Autossômica dominante	Esferocitose
Espectrina	Autossômica dominante	Eliptocitose
Espectrina	Recessiva	Piropoiquilocitose
Banda 3 e proteína 4.1	Recessiva	Esferocitose
Proteína 4.1	Recessiva	Eliptocitose
Defeito de permeabilidade de sódio	Autossômica dominante	Estomatocitose

Os eritrócitos são normalmente formados na medula óssea. Porém, em casos de situações patológicas (como por exemplo nas anemias hemolíticas crônicas), esse processo pode ocorrer no baço e em outros órgãos do sistema reticuloendotelial, como por exemplo o fígado. O principal mecanismo de regulação da eritropoese é a eritropoetina, que é uma alfa globulina produzida nos rins e cuja síntese está relacionada à hipóxia celular. A regulação da produção de eritrócitos pela eritropoetina depende do consumo de oxigênio tecidual e notadamente da queda da pO_2 renal. Algumas doenças específicas, por exemplo: anemias hemolíticas, anemias megaloblásticas e alguns tipos de leucemias, podem alterar o

tecido hematopoiético e o seu local de síntese por: substituir parcial ou total das células adiposas por células hematopoiéticas nas cavidades medulares de ossos que normalmente tem atividades hematopoiéticas; ampliar a medula vermelha a nos ossos longos que possuem medula amarela nas suas cavidades; levar ao aparecimento de tecido hematopoiético no fígado e no baço, promovendo, assim, a hematopoiese extramedular (SANTOS,2015).

O diagnóstico das doenças hematológicas está sempre relacionado à clínica do paciente e a exames laboratoriais (como eletroforese em gel, citometria de fluxo, fragilidade osmótica da membrana e *pink* teste. A metodologia mais utilizada para a eletroforese é em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE), que consiste na desnaturação e separação das proteínas encontradas na bicamada lipídica da membrana do eritrócito de acordo com o seu peso molecular, tamanho e a carga da proteína (SANTOS, 2015).

Outra metodologia empregada para detecção de alterações em células é a citometria de fluxo (CF), uma ferramenta que realiza a separação, a contagem individual de células e a detecção de biomarcadores proteicos. Um citômetro de fluxo possui cinco sistemas operacionais: fluido, óptico, eletrônico, de amplificação e computacional. Partindo de um feixe de laser incidente, são avaliadas a dispersão e a fluorescência do feixe refletido pelas células contidas numa amostra biológica, podendo ser sangue, soro, plasma ou processamento de tecidos sólidos. Por ser um método capaz de avaliar múltiplos parâmetros, a CF passou a ser chamada de citometria de fluxo multiparamétrica (CFM). A CFM é capaz de realizar com rápida velocidade a identificação de células no momento em que estas, que estão presentes em uma corrente líquida, passam através de um aparelho de detecção eletrônica. Após a separação individual celular é feita a análise, contagem, e qualificação das micropartículas suspensas em fluxo. Desse modo é possível realizar a identificação de inúmeras características biológicas contidas no interior das células como: ácidos nucleicos, receptores de superfície, epítomos de proteínas, a síntese de proteínas, de citocinas, e concentração de íons. (BRAGA, et al. 2016).

O teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) é um teste onde se avalia a variação da resistência dos eritrócitos à hemólise frente a ação de soluções salinas hipotônicas. O teste de criohemólise é um ensaio que apresenta uma alta especificidade para a detecção de esferocitose hereditária (HS), avaliando o grau de fragilidade que a célula apresenta devido a alteração estrutural da membrana. Essa

avaliação investiga a taxa de lise eritrocitária dentro de uma situação pré-determinada, no meio hipertônico a uma temperatura de 0°C. O meio empregado permite avaliar a fragilidade das hemácias pelo defeito e deficiência dos componentes da membrana, e não pela relação superfície e volume das mesmas (SANTOS, 2015).

O *pink* teste é uma técnica modificada do teste do tempo de lise pelo glicerol acidificado (AGLT), que tem como objetivo alcançar uma melhor reprodutibilidade na detecção de casos com HS (VETTORE et al., 1984). O AGLT é uma técnica com uma boa sensibilidade para detecção de HS, que se baseia no intervalo de tempo necessário para ocorrência de hemólise da amostra, monitorada por um equipamento de espectrofotometria (ZANELLA et al., 1980). Porém, esta técnica apresentou uma desvantagem em relação a solução tampão utilizada no tratamento da amostra. O tampão fosfato-salino (PBS) utilizado na técnica tem como função manter o pH da solução de glicerol em aproximadamente 6,85. Contudo, foi verificado que esta solução perde suas propriedades tamponantes facilmente devido às atividades dos microrganismos (VETTORE et al., 1984). Assim, a proposta apresentada por Vettore e colaboradores (1984) no *pink* teste foi a substituição do PBS por bis (2-hidroxietil) amino tris (hidroximetil) metano (bis-tris metano), que proporcionou uma boa estabilidade da solução, melhorou a reprodutibilidade dos ensaios e manteve a mesma sensibilidade observada em AGLT.

Como objetivo, o trabalho descreve as deficiências estruturais nos principais tipos de anemias hemolíticas causadas por defeitos de membrana eritrocitária também os desafios dos diagnósticos diferenciais aplicados para essas doenças.

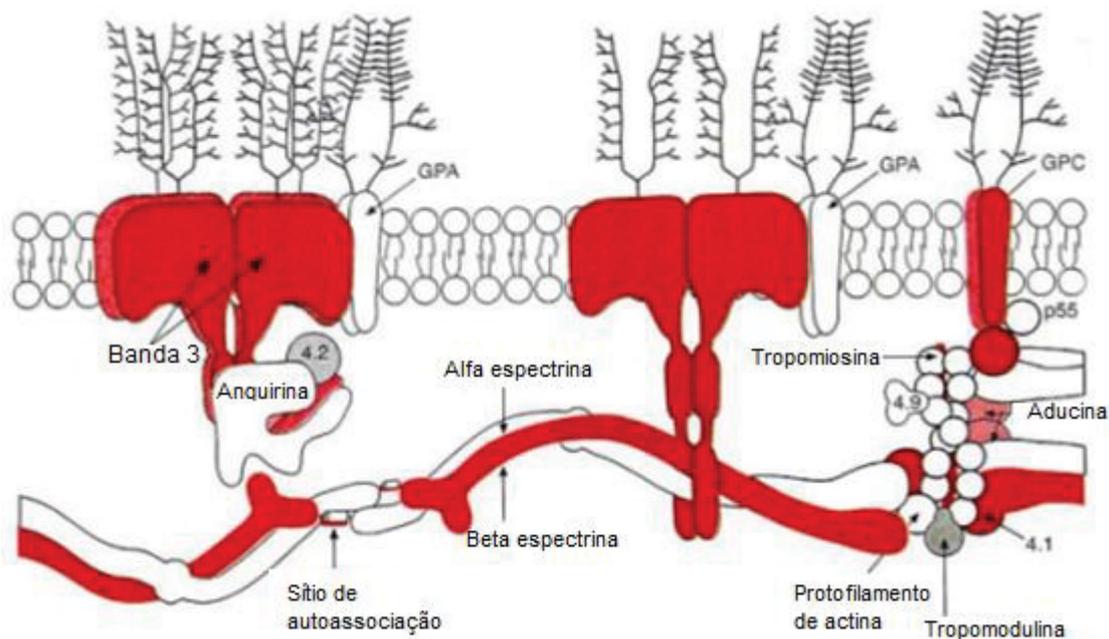
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura do eritrócito

Os eritrócitos são células sanguíneas que apresentam forma de disco bicôncavo e possuem um diâmetro médio de 8 μ m. Seu citoesqueleto e a estrutura da sua membrana são capazes de sofrer deformações e passar através de capilares com 2-3 μ m de diâmetro, sendo que isso só é possível pelas interações entre proteínas que estão inseridas na dupla membrana eritrocitária (banda 3 e glicoforina) e aquelas que estão na região interna da membrana e em contato com o citoplasma

(espectrina, anquirina e proteína 4.1), conforme mostra a Figura 2. Os eritrócitos são desprovidos de núcleo e organelas, sendo que sua membrana plasmática atua como uma barreira seletiva que controla a transferência ativa e passiva de moléculas.

FIGURA 2 - ESTRUTURA DA MEMBRANA DO ERITRÓCITO



Fonte: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/doenca_dos_eritrocitos/doenca_dos_eritrocitos_o_eritrocito.pdf- modificada

A proteína citoplasmática mais abundante nos eritrócitos é a hemoglobina, sendo molécula formada por duas globinas do tipo alfa – representadas por α_2 , e duas globinas do tipo beta representadas por β_2 , δ_2 , γ_2 . São as globinas do tipo beta que diferenciam os três tipos de hemoglobinas humanas: Hb A ($\alpha_2\beta_2$), Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$). Cada globina se liga a um grupo heme; portanto, cada molécula de hemoglobina transporta quatro moléculas de oxigênio que se ligam aos quatro átomos de ferro ($\text{Fe}^{2+}\text{O}_2^-$). Os eritrócitos possuem uma vida média de 120 dias, tempo relacionado ao seu estoque energético, após o qual são recolhidos pelo sistema endotelial para degradação (RODRIGUES, et al., 2019).

A membrana dos eritrócitos é formada por uma bicamada lipídica que contém proteínas inseridas integral ou parcialmente. A banda 3 é o principal exemplo de uma proteína integral, constituindo um canal iônico que tem como função o controle do transporte de íons, como exemplo, o íon cloreto (Cl^-). Possui um domínio com a carga negativa, o que auxilia nas interações internas e na fixação de outras

proteínas, principalmente proteínas integrais como 4.1, 4.2 e anquirina (MURADOR; DEFFUNE, 2007; GRANJO, 2003). Devido a isso, uma deficiência severa da banda 3 significa a perda de maior constituinte da membrana eritrocitária e também uma redução significativa da estabilidade da membrana. As glicoforinas possuem estruturas que conferem uma carga negativa à estrutura do eritrócito, como por exemplo o ácido siálico e grupamentos amino. Essa carga negativa causa a repulsão de outras células evitando assim a sua aglutinação. As glicoforinas A, B, C e E também são encontradas na membrana dos eritrócitos. A glicoforina A (GPA) representa o maior número entre o grupo, ocupando aproximadamente 2 a 4% das proteínas totais da membrana. Mesmo sendo um grupo importante de proteínas, a redução de GPA e glicoforina B (GPB) parece não causar uma disfunção significativa da membrana. (SANTOS, 2015).

As proteínas periféricas atuam interligando as proteínas da membrana com o citoesqueleto da célula, formando um complexo juncional associado a uma rede formada por conjunto de espectrinas. O complexo juncional tem um papel importante em manter a estabilidade da membrana. A sua estrutura é obtida a partir de inúmeras interações entre as próprias proteínas como actina, espectrina, anquirina e proteína 4.1 (SANTOS, 2015). Dentre estas proteínas, a espectrina e proteína 4.1 ganham destaque. A espectrina é o maior constituinte da membrana entre as proteínas periféricas (MURADOR; DEFFUNE, 2007). É uma proteína em forma de bastão, de comprimento longo (PINTO, 2010). Este pode ser encontrado na forma de tetrâmero formado por cadeias α e β , identificadas como bandas 1 e 2 no ensaio de eletroforese, que desempenha a função de sustentação, flexibilidade e elasticidade da membrana (MURADOR; DEFFUNE, 2007; PINTO, 2010).

Normalmente, a espectrina α está presente em maior proporção do que a espectrina β . Estruturalmente, a proteína 4.1 atua principalmente na conexão entre as proteínas da membrana. Isso envolve a interação da própria proteína 4.1 e o estímulo que este apresenta sobre as ligações entre as outras proteínas presentes na bicamada lipídica. A maior interação da proteína da banda 4.1 ocorre entre as glicoforinas C e D (GPC e GPD) e não há indícios de que ele se liga com as proteínas da banda 3 (MURADOR; DEFFUNE, 2007). Em um estudo eletroforético, é possível diferenciar as subunidades 4.1a e 4.1b (PINTO, 2010). Sabe-se que a subunidade 4.1a possui ligações principalmente com espectrina e actina, enquanto a subunidade 4.1b tem maior interação com glicoforina e actina (MURADOR;

DEFFUNE, 2007). Um outro constituinte do complexo juncional é a proteína da banda 4.2, que apesar de não ter seu papel completamente elucidada, apresenta uma ligação importante com a banda 3 e anquirina, relacionada com a conservação do formato discóide e dos atributos mecânicos, como flexibilidade da membrana. Esta interação é possível graças a presença de glicina com N-terminal na sua estrutura. Curiosamente, a presença ou a ausência da proteína 4.2 na membrana depende em grande parte da banda 3 e da anquirina, sabendo-se que a deficiência de uma ou de ambas leva a uma redução secundária da proteína 4.2 (SANTOS, 2015).

O envelhecimento dos eritrócitos é acompanhado pela perda de flexibilidade de sua membrana devido ao aumento do colesterol e da lipoperoxidação da dupla camada lipoprotéica. Essa desestruturação protéica da membrana, em especial pelas agregações da banda 3 e da proteína 4.1, sinaliza para os macrófagos que os eritrócitos estão envelhecidos e devem ser fagocitados. (SANTIS, 2019).

2.2 Anemias hemolíticas

Levando em consideração o mecanismo biológico, as doenças hemolíticas se caracterizam pela destruição precoce dos eritrócitos. A instalação da anemia irá depender da intensidade do processo hemolítico e do grau de resposta da medula óssea, que na tentativa de compensar a hemólise, aumenta a eritropoese. Porém, devido ao aumento de produção, nem todas as células liberadas para a corrente sanguínea passam pelo processo completo de maturação, o que faz com que seja possível detectar maior número de reticulócitos no sangue periférico. (SANTOS, 2015).

Uma das causas de anemias hemolíticas está relacionada às anormalidades das proteínas presentes na membrana eritrocitária. Estas anormalidades podem estar relacionadas a uma alteração na organização estrutural da membrana, como ocorre no caso de esferocitose e eliptocitose hereditária, ou pela alteração na função de transporte através da membrana, como ocorre na estomatocitose hereditária sobre-hidratada (OHSt) e xerocitose hereditária (NARLA; MOHANDAS, 2017).

De acordo com Gallagher (2013), deformações na membrana eritrocitária tendo como exemplo esferocitose hereditária (HS) e as síndromes de eliptocitose

hereditária (HE) são um grupo importante de anemias hemolíticas. A esferocitose hereditária se apresenta com achados de eritrócitos, em extensão de sangue periférico, sem biconcavidade característica, com perda da superfície da membrana. Essa perda faz com que os eritrócitos se tornem mais frágeis. Já a eliptocitose hereditária se caracteriza pela presença de eritrócitos de forma elíptica, na extensão de sangue periférico. A eliptocitose (HE) constitui um grupo variado de síndromes (GALLAGHER, 2013).

2.3. Patologias

2.3.1. Eliptocitose hereditária (HE)

Eliptocitose ou ovalocitose hereditária é conhecida por ser um conjunto de doenças hereditárias nos quais são identificados eritrócitos com sua morfologia alterada, sendo que algumas células passam a apresentar forma elíptica arredondada ou oval, em vez da forma de disco bicôncavo. A HE pode ser causada por mutações de diferentes genes que afetam a integridade do citoesqueleto e proteínas de membrana dos eritrócitos, sendo que as principais mutações ocorrem em genes da α -espectrina, β -espectrina ou proteína da banda 4.1 (SODERQUIST; BAGG, 2013). Já foram identificados como uma das causas substituições, inserções, deleções de nucleotídeos e processamento de RNA defeituoso (SODERQUIST; BAGG, 2013).

O formato elíptico é o resultado da diminuição na estabilidade mecânica da membrana, devido ao enfraquecimento de ligações laterais do citoesqueleto relacionadas com os problemas envolvidos com o complexo juncional ou nas interações dímero-dímero encontradas na membrana (NARLA J.; MOHANDAS N., 2017). Juntamente com este enfraquecimento das interações, o quadro vem acompanhado de redução de deformabilidade da membrana e redução de meia-vida (NISS et al., 2016). Em situações mais graves da patologia, é observada uma redução de superfície de área e da presença de fragmentos de hemácias (NARLA J.; MOHANDAS N., 2017). Além da anemia hemolítica, os pacientes com HE possuem tendência de apresentar esplenomegalia e icterícia, quando não são assintomáticos (MA et al., 2018). A eliptocitose confere grau de proteção a infecção de eritrócitos por *plasmodium vivax*, causador da malária, pois o número aumentado de dímeros de espectrina presente na membrana dos eritrócitos de pacientes com HE está

intimamente relacionado com o crescimento do parasita dentro da célula. (SCHULMAN et. al., 1990).

No estudo realizado por King e colaboradores (2000), não foi detectada uma diferença significativa na análise de MCF por citometria de fluxo, em relação ao grupo controle. Entre cinco amostras de HE pesquisados, que apresentaram intensidade de fluorescência determinada por CF no intervalo de 43,5 a 46,3 unidades de MCF, uma amostra com deficiência parcial para proteína 4.1 e quatro amostras que apresentaram variante de espectrina denominada Sp $\alpha^{1/65}$ foram detectadas, sendo três amostras heterozigotas e uma homozigota para esta última. No mesmo estudo, foi feita uma análise de duas crianças, sem relação familiar, com piropoiquilocitose hereditária. Durante o ensaio, foi observado a formação de um amplo sinal de pico duplo no lugar de um único sinal de fluorescência com deslocamento à esquerda, o que era o esperado. De acordo com o histograma de fluorescência obtido, as duas amostras pesquisadas possuíam uma população heterogênea de eritrócitos que carregam variantes de espectrina e microesferócitos.

2.3.2 Esferocitose hereditária (HS) e Piropoiquilocitose hereditária (HPP)

A esferocitose hereditária (HS) é o grupo mais comum das anemias hemolíticas por defeito de membrana, sendo causada por problemas na produção de banda 3, anquirina, α e β espectrina e proteína 4.2, que decorrem de desordens genéticas de herança dominante, recessiva ou por mutações. Essa deficiência de proteínas levam a instabilidade de membrana, pois as interações verticais (relacionadas com o complexo de anquirina) e horizontais (ligação espectrina-espectrina ou espectrina-proteína) são afetados (MOHANDAS, 2018). Devido a essa causa, também é observada uma fragilidade osmótica dos eritrócitos e a consequente redução da vida média dos mesmos (PINTO et al., 2010). A HS pode ser caracterizada quanto ao grau de severidade da anemia em leve, moderada, moderadamente severa e severa.

Em seu estudo Mariani (2008) avaliou uma população de 212 famílias de diferentes regiões da Itália (109 do Norte, 29 do centro, 62 do Sul) e 12 de países estrangeiros. Foram estudados um total de 300 participantes, sendo eles 141 do sexo masculino e 159 do sexo feminino com faixa etária entre 1 a 80 anos, 41 pacientes já esplectomizados, 259 pacientes não esplectomizadas (21 pacientes com esplectomia pós-estudo). O padrão de herança de HS foi dominante em

210/300 pacientes (70%) e 116/212 famílias (55%), verificando-se que a deficiência na proteína banda 3 em 60% dos casos diagnosticada na fase adulta e 40% na infância estavam associadas a esferocitose hereditária. Ainda, foi observado pelos pesquisadores a relação entre esplenomegalia e cálculos biliares em pacientes com deficiência de banda 3, enquanto a anemia, icterícia neonatal e necessidade de transfusão sanguínea foram mais comuns nos pacientes com deficiência de espectrina e/ ou anquirina.

Para estabelecer relação entre as alterações proteicas com o fenótipo clínico Granjo e colaboradores (2003) avaliaram 25 famílias com HE na região Norte de Portugal. Dentre as famílias estudadas, 18 apresentavam redução primária de anquirina, sendo que 16 apresentavam um modo de transmissão dominante, um era de modo recessivo e em um não foi possível demonstrar o modo de transmissão. Uma redução na banda 3 com padrão dominante foi encontrada em cinco famílias do estudo. A deficiência de proteína 4.2, em uma família causou uma esferocitose leve com transmissão recessiva e em outra, que apresentou redução primária de espectrinas, causou esferocitose leve; porém, não foi possível demonstrar o modo transmissão. De 15 pacientes com déficit de anquirina estudados numa situação de pré-esplenectomia, dez tinham uma esferocitose leve (um dos quais com hemólise compensada) e cinco tinham um fenótipo de esferocitose moderada. Ainda foram avaliados 10 indivíduos numa situação pré-esplenectomia, sendo que sete apresentavam uma esferocitose leve e três uma esferocitose moderada nas famílias que apresentavam déficit de banda 3. Nas 25 famílias estudadas, verificou-se uma predominância do déficit de anquirina em 72%, seguido pelo déficit de banda 3, que correspondeu a 20%, e da proteína 4.2 e espectrinas, correspondendo a um total de 4%.

O estudo realizado pelo Kedar e colaboradores (2003) analisou dez casos de pacientes com HS, pertencentes a oito famílias diferentes. Os autores verificaram que o valor de MCF, obtido por citometria de fluxo, para o grupo hematologicamente normal e para amostras de sangue do cordão umbilical foram 288 ± 28 e 292 ± 25 , respectivamente. Por outro lado, pacientes do grupo HS apresentaram MCF de apenas 202 ± 27 . Os indivíduos que apresentaram HS associado com deficiência da proteína glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) demonstraram uma redução do valor de MCF bem próximo do valor apresentado anteriormente. Já nos quatro casos

de HS com deficiência de espectrina, a redução do MCF ocorreu de forma mais drástica. Os valores obtidos foram de 172, 192, 214 e 188.

A Piropoiquilocitose Hereditária (HPP) é uma forma grave de HS, geralmente diagnosticada logo após o nascimento e que requer transfusões de sangue nos primeiros meses de vida. Neste subgrupo, se detectam problemas em relação à produção de α -espectrina. Os níveis de Hb dos pacientes são baixos e os pacientes passam por transfusões constantes, além de serem submetidos à terapia de quelação de ferro. (SANTOS, 2015). O trabalho apresentado por King e colaboradores (2008), estudou a possibilidade de utilização da técnica de citometria de fluxo por fluorescência como um teste de triagem para casos de eliptocitose e piropoiquilocitose hereditária, uma vez que esta técnica já é utilizada para triagem em casos de pacientes com esferocitose hereditária. Verificou-se durante o estudo que a técnica não permite distinção entre pacientes com eliptocitose hereditária e pessoas saudáveis. Em contrapartida, os autores observaram perfis distintos para quadros de piropoiquilocitose e esferocitose hereditária, o que ajudaria na orientação para prosseguir com a investigação diagnóstica.

No entanto, observou-se a possibilidade de o mesmo paciente apresentar duas populações de eritrócitos distintos, detectados através da metodologia de citometria de fluxo, além de sobreposições de sinais característicos de esferocitoses e poiquilocitoses em casos pontuais. Esses achados indicam que somente essa metodologia não é suficiente para realizar o diagnóstico diferencial entre piropoiquilocitose hereditária e esferocitose hereditária. Em dois pacientes, foi verificada a presença de dois picos, um característico de células com poiquilocitose e o outro pico à direita representando eritrócitos normais. Já a presença de sobreposição de sinais ficou evidente no caso de uma criança que apresentou um resultado indicativo de poli-quilocitose na técnica de CF. Porém, posteriormente, por meio da técnica de eletroforese em gel, verificou-se que o paciente apresentava deficiência combinada de proteínas da banda 3 e 4.2, com apenas 68,9% e 74,9% dos valores normais, respectivamente, indicando se tratar, na verdade, de um caso de HS.

2.4. Desafios do Diagnóstico Diferencial

2.4.1. Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)

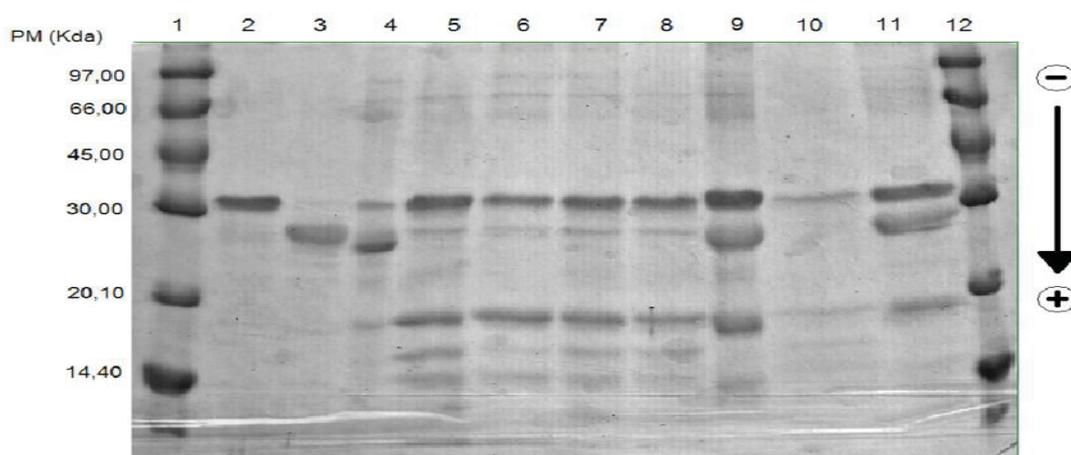
O método de eletroforese é amplamente utilizado para o estudo de proteínas nos fluidos biológicos e se baseia em fazer a separação eletroforética das cadeias polipeptídicas isoladas com base em seu peso molecular e/ou tamanho utilizando carga elétrica para fazer a sua corrida pela placa. A migração das proteínas é inversamente proporcional aos seus pesos moleculares, sendo o resultado apresentado na forma de bandas de proteínas, como mostrado na Figura 3. A SDS-PAGE é realizada em condições desnaturantes para a separação de proteínas, sendo que os agentes desnaturantes atuam quebrando as pontes dissulfeto. No caso da SDS-PAGE, o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) é o agente desnaturante utilizado também para normalizar sua proporção massa / carga. Por conferir cargas negativas às proteínas, sua utilização garante que apenas o peso molecular afeta a velocidade de migração, levando à separação das proteínas somente pelo seu tamanho. A SDS-PAGE é considerada um teste confirmatório e qualitativo, que permite a visualização em bandas de cada grupo de proteínas. (KING et al., 2000).

O diagnóstico de um paciente com alterações na membrana de eritrócitos baseia-se em uma análise do histórico familiar e nos resultados obtidos pelos exames laboratoriais relacionados à enfermidade investigada. Na bibliografia consultada, em sua maioria, a metodologia de SDS-PAGE também foi muito utilizada para detectar os principais distúrbios nas proteínas de membrana. A sensibilidade do método encontrado por Mariani e colaboradores (2008) e Trabelsi e colaboradores (2021) foi de 78% e 72,2%, respectivamente. Nos estudos, verificou-se que este método consegue detectar tanto as deficiências de proteínas isoladas quanto as associadas; porém esta metodologia pode não detectar uma deficiência leve de proteínas dentre amostras que contém uma mistura de proteínas normais e anormais. Por outro lado, SDS-PAGE foi capaz de distinguir eritrócitos com ovalocitose do sudeste asiático hereditária (SAO) e anemia diseritropoética congênita tipo II (CDAII) dos demais, a partir da diferença de mobilidade de suas bandas eletroforéticas, quando a técnica de CF por ligação de eosina 5-maleimida (EMA) apenas ofereceu sinal semelhante a HS (KING et al., 2000).

Um fato observado por Mariani e colaboradores (2008) em relação a esplenectomia, é que as alterações que uma vez não haviam sido identificadas pelo

método da eletroforese, foram elucidadas após o procedimento de remoção do baço, sendo que neste estudo, foram identificados quatro pacientes com deficiência de espectrina, três com deficiência de espectrina associado a anquirina e um com deficiência da proteína da banda 3, que não puderam ser diferencialmente diagnosticados antes da esplenectomia.

FIGURA 3 - PERFIL ELETROFORETICO DAS PROTEINAS DE MEMBRNAS ERITROCITÁRIAS



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-8-Eletroforese-em-gel-de-poliacrilamida-15-com-SDS-SDS-PAGE-em-amostras-de_fig3_51997847

2.4.2. Citometria de fluxo por ligação de eosina 5-maleimida (EMA)

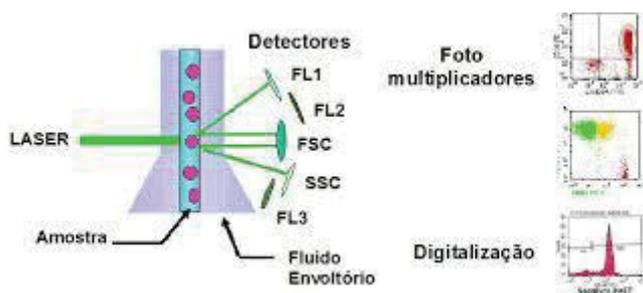
A citometria de fluxo (CF) é uma ferramenta que realiza a separação, a contagem individual de células e a detecção de biomarcadores proteicos. Após a obtenção da suspensão de células, sua análise é conduzida no citômetro de fluxo. No equipamento, a amostra percorre um tubo em direção ao laser que está posicionado no caminho das células. Por meio da focalização hidrodinâmica, as células passam em fila única pela luz que é emitida pelo laser, garantindo que a análise de cada uma seja individual. Um citômetro de fluxo possui cinco sistemas operacionais: fluido, óptico, eletrônico, de amplificação e computacional. Como demonstrado na FIGURA 4, o primeiro sistema, denominado de fluído, é por onde se inicia a análise, consistindo em uma câmara onde as células são introduzidas e

particularmente são organizadas por diferença de pressão, para posteriormente serem atingidas pela luz do laser que está localizado no segundo sistema: o óptico. (BRAGA, 2016)

O sistema óptico é onde está presente a fonte de luz do laser, sendo composto por dois feixes de luz: o feixe retilíneo e os feixes perpendiculares. A luz que é dispersa pelo feixe retilíneo, quando atinge uma única célula, é proporcional ao volume celular, sendo denominada espalhamento frontal (*Forward Scatter - FSC*). Os feixes perpendiculares recebem o nome de espalhamento lateral (*Side Scatter - SSC*), e estão relacionados à composição e complexidade interna da célula, podendo por essa técnica ser determinado o tipo celular por meio da verificação de componentes internos, como por exemplo o formato nuclear, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos, e a deformidade da membrana. Os detectores são ativados quando o feixe que atingiu a célula é dispersado, transformando esses feixes ópticos em sinais eletrônicos, pelo terceiro sistema: o eletrônico. Este sistema é o responsável por transformar os sinais analógicos para o sinal digital, com a reprodução do FSC, SSC e sinais fluorescentes. Os SSC e os sinais fluorescentes são direcionados aos tubos fotomultiplicadores (*photomultiplier tubes - PMTs*); já o FSC é recolhido por um fotodiodo de silicone, sendo estes feixes codificados e processados pelo sistema de amplificação. O sistema computacional utiliza um software que executa as análises, processa os sinais e emite os resultados (BRAGA,2016).

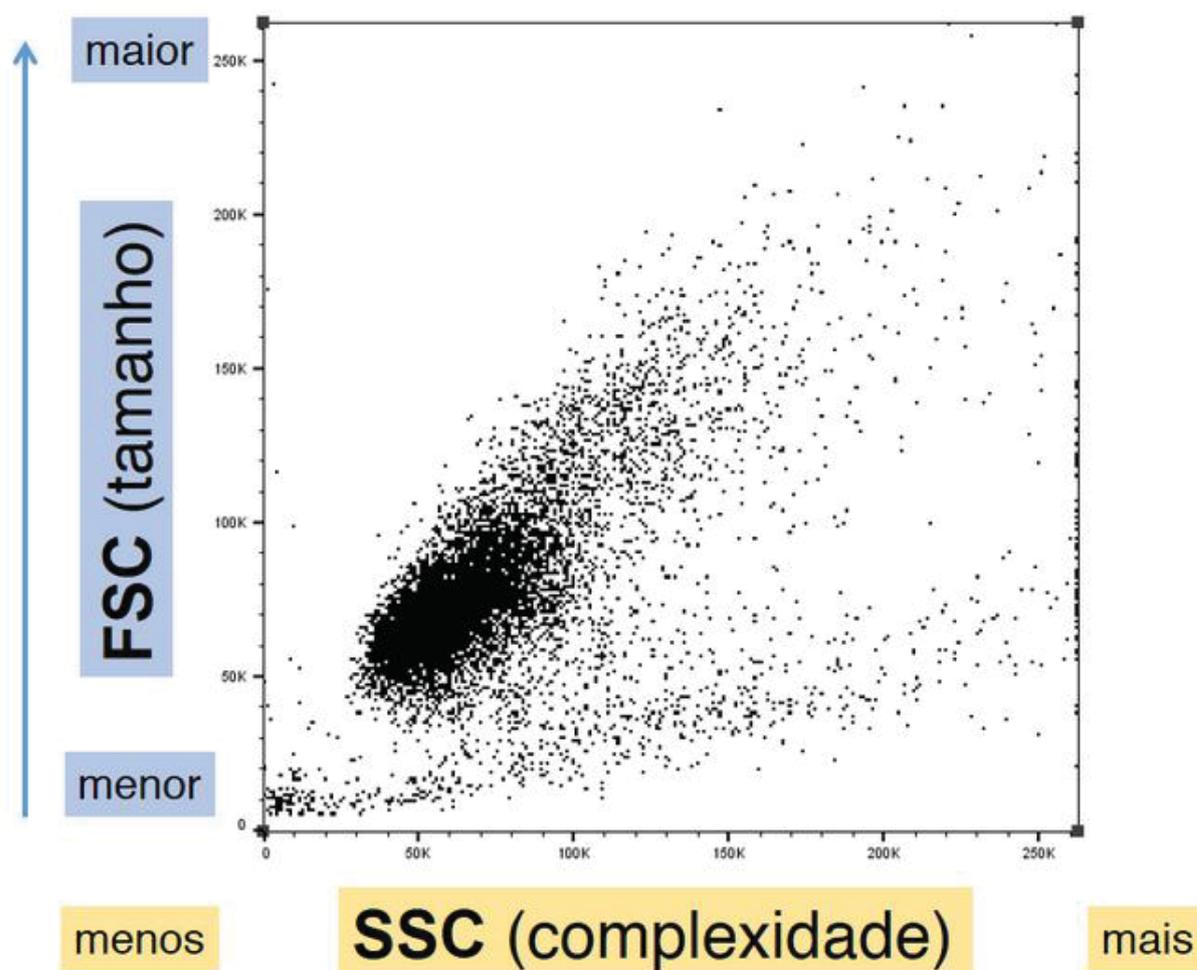
Os resultados da citometria de fluxo são representados em histogramas por *dot plots* conforme demonstrado na FIGURA 5. A representação por *dot plot* demonstra que onde há maior concentração de pontos maior é a intensidade do parâmetro que se quer avaliar.

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CITOMETRIA DE FLUXO



fonte: <https://ibapcursos.com.br/citometria-de-fluxo-aplicacoes-vantagens-e-desvantagens/>

FIGURA 5 – RESULTADOS DA CITOMETRIA DE FLUXO



Fonte: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2020/05/como-interpretar-um-resultado-de.html>

A versão mais moderna da CF é chamada de SCAF (separador celular ativado por fluorescência) que faz a diferenciação celular pelo emprego de

marcadores fluorescentes. Um marcador de interesse no diagnóstico de anemias hemolíticas é a eosina 5-maleimida (EMA), que é um corante fluorescente com afinidade para a proteína banda 3. Assim, essa marcação das membranas dos eritrócitos permite a detecção dos eritrócitos deficientes nesta proteína. Esta técnica é utilizada como teste de triagem no diagnóstico de alterações como HS (KING et al., 2008). O teste apresentou especificidade e sensibilidade de 97,5% e 94,7% respectivamente, quando se utiliza o valor de corte de -20% (TRABELSI et al., 2021). Neste mesmo estudo, em comparação com outras técnicas, a citometria de fluxo demonstrou o maior valor de acurácia com porcentagem de até 97% (TRABELSI et al., 2021). A sua capacidade de diferenciação no processamento de amostras contendo população mista de hemácias é excelente, uma vez que permite analisar a intensidade de fluorescência de cada célula individualmente (KING et al., 2000). Além disso, uma outra vantagem apresentada pela citometria de fluxo é a economia de tempo e de amostra, uma vez que esta técnica necessita somente 120 µL de amostra de sangue aproximadamente (TRABELSI et al., 2021). Por esse motivo, foi a técnica escolhida para realizar o acompanhamento de dois pacientes infantis com quadro de HS e HPP em estudo onde demonstrou diferentes proporções de populações de hemácias normais e alteradas (KING et al., 2008). Segundo Trabelsi e colaboradores (2021), uma desvantagem que essa técnica traz é a necessidade de se utilizar amostras de um grupo controle em cada ensaio.

No entanto, a técnica de EMA não possibilita o estabelecimento de correlação entre o tipo de defeito da proteína e a redução da intensidade de fluorescência (TRABELSI et al., 2021), não sendo suficiente para realizar o diagnóstico diferencial entre anemias hemolíticas com diferentes alterações em proteínas de membrana. No estudo realizado por King e colaboradores (2008), foi descrito o caso de uma criança que apresentou um pico de fluorescência característico de HPP no teste de EMA, acompanhado por valores baixos, tanto de fluorescência no canal médio, como de Volume Corpuscular Médio (VCM). A amostra foi submetida a uma investigação mais aprofundada, sendo que a partir da identificação de proteínas da membrana, verificou-se a existência de uma deficiência combinada de proteínas da banda 3 e 4.2 (KING et al., 2008). Sendo assim, o diagnóstico final do caso foi HS (KING et al., 2008). Ou seja, a técnica evidenciou um perfil característico de HPP em um paciente com HS, o que poderia ter levado a um diagnóstico equivocado (KING et al., 2008).

2.4.3. Teste de fragilidade osmótica

O teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) avalia a variação da resistência dos eritrócitos à hemólise frente a ação de soluções salinas hipotônicas. A utilização desse teste permite que sejam verificadas variações dos resultados em enfermidades como algumas anemias, alterações metabólicas e/ou carenciais. Para melhor avaliação da FOE, os resultados deveriam ser representados em gráficos, como por exemplo um gráfico de porcentagem de hemólise X concentração de solução salina, tendo como resultado uma curva sigmóide que representa a distribuição da frequência da fragilidade osmótica dos eritrócitos. Os resultados também podem ser apresentados informando as concentrações da solução salina em que houve a hemólise mínima (5%), hemólise máxima (95%) ou a fragilidade osmótica média, que mede a hemólise de 50% das hemácias (SUESS *et al.*, 1948). Um eritrócito normal pode apresentar uma capacidade de absorver água no seu interior de aproximadamente 70% do seu volume original, quando este é colocado no meio hipotônico. Quanto maior o aumento de volume, maior a probabilidade de as hemácias sofrerem lise celular, devido a redução da sua capacidade máxima de reter o líquido. Um diferencial encontrado entre anemias de origem por privação de ferro ou talassemias, e anemias por defeito de membrana, está no fato de que nesta última é observado um aumento de fragilidade osmótica (LEWIS; BAIN; BATES, 2006 apud SANTOS, 2015).

O teste de fragilidade osmótica é capaz de demonstrar resultados que independem de alterações qualitativas e quantitativas sofridas pela membrana. Este teste apresentou a mesma sensibilidade em pacientes com deficiência em proteínas da banda 3, em esferocitose e em pacientes com alterações não detectadas. Contudo, este é um teste interessante para a investigação de casos menos típicos. De acordo com MARIANI *et al.* (2008), o número de esferócitos encontrados nem sempre está relacionado diretamente ao tipo ou à gravidade da doença, uma vez que foi observado que cerca de 10% dos casos de esferocitose hereditária apresentam pouca ou nenhuma alteração de membrana.

A sensibilidade deste teste pode variar de acordo com o tratamento da amostra. O valor estimado para análise de sangue fresco foi de 45%, podendo aumentar este valor sobe para até 70% quando o sangue é levado para o processo de incubação. Isto ocorre porque o estresse gerado aumenta a lise osmótica dos esferócitos quando comparados aos eritrócitos normais (TRABELSI *et al.*, 2021). A

sensibilidade deste teste pode ser afetada pelo aumento de reticulócitos na circulação (KING et al., 2000). Como aconteceu com o método de SDS-PAGE, o procedimento de esplenectomia permitiu a detecção de maiores números de casos de alteração na membrana (MARIANI et al., 2008).

2.4.4. Outros testes

O *pink* teste e o teste de crio-hemólise também foram analisados por Trabelsi e colaboradores (2021) quanto a suas aplicações no diagnóstico de anemias hemolíticas. Verificou-se que o pink teste, uma variação do teste de lise de glicerol ácido, tem sensibilidade ligeiramente maior, com porcentagem de 72,2% em comparação com a lise de glicerol. Enquanto isso, o teste de crio-hemólise apresentou a mesma sensibilidade do teste de fragilidade osmótica (70%). (TRABELSI et al., 2021).

De modo geral, para a determinação do diagnóstico somente a análise do hemograma não é suficiente o conjunto de outros ensaios devem ser analisados. Como foi discutido no caso relatado por King e colaboradores (2008), quando a técnica de EMA não conseguiu distinguir HS do HPP, o valor do VCM foi fundamental para distinguir entre as duas condições.

Em relação à sintomatologia observada nos pacientes, como já foi comentado, percebeu-se que o desenvolvimento de esplenomegalias e cálculos biliares estão relacionados com a deficiência de banda 3 (MARIANI et al., 2008). Embora estas tendências não possam ser consideradas informações definitivas para um diagnóstico, podem direcionar a decisão clínica.

3. CONCLUSÃO

As alterações de membrana eritrocitária são patologias que atingem pessoas em ampla faixa etária. Cada caso apresenta suas particularidades, em que os pacientes podem ser classificados desde assintomáticos até a sintomáticos graves com necessidade de transfusão sanguínea. Pode-se verificar que a deficiência de determinadas proteínas pode causar quadros leves, moderados e graves dependendo do paciente, não apresentando um padrão específico para cada doença. Assim sendo, o diagnóstico possui uma grande importância para que o paciente seja encaminhado a um tratamento adequado o quanto antes.

A dificuldade de um diagnóstico sempre reside no fato de que nem todos os casos são detectados. Embora os motivos possam variar, destacam-se as limitações de cada metodologia: o teste de EMA, por exemplo, origina resultados semelhantes para patologias diferentes; já a presença de estruturas como reticulócitos interfere no resultado do teste de fragilidade osmótica e criohemólise; SDS-PAGE não apresenta sensibilidade suficiente para detectar deficiências leves. Dessa forma, dependendo da clínica do paciente, a associação entre dois ou mais métodos deve ser utilizada para a obtenção do diagnóstico, pois cada metodologia possui vantagens e desvantagens (o custo elevado da citometria de fluxo e a baixa especificidade da eletroforese são desvantagens que devem ser consideradas). Utilizando-se uma combinação de testes com especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade conhecida, sua complementaridade permite o aproveitamento dos pontos fortes de cada método. Nesse contexto, novas metodologias ou testes ainda devem ser estudados para que cada vez mais o diagnóstico se torne mais preciso e mais rápido.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto - SP. **Doença dos eritrócitos.** Disponível em: <https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/doenca_dos_eritrocitos/doenca_dos_eritrocitos_o_eritrocito.pdf> acesso em: 16/11/2021

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher.** Brasília, 2009. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnds_crianca_mulher.pdf> Acesso em: 28/11/2021

CHAPARRO, C.; M.; SUCHDEV, P. S. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, vol. 1, p. 15-31, ago. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6697587/>> Acesso em 28/11/2021

SANTIS, G. C. de. Anemia: definição, epidemiologia, fisiopatologia, classificação e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v 52, p 239-251, Jun. 2019. Revisão Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/156726/157320>>. Acesso em: 24 out. 2020.

GALLAGHER, P.G., Abnormalities of the Erythrocyte Membrane, **PEDIATR CLIN NORTH AM**, 2013 December ; 60(6): 1349–1362. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4155395/>> Acesso em: 28/11/2011

GRANJO E.; MANATA P.; TORRES N.; RODRIGUES L.; FERREIRA F.; BAUERLE R.; QUINTANILHA, A. Esferocitose hereditária - Prevalência dos déficits proteicos da membrana do eritrócito. **ACTA MÉDICA PORTUGUESA**, 2003; vol. 16: p. 65-69. Disponível em: <[JOHN S.; DAVIDE L.; WILLIAM D.; MIRIAM J. D.; A QUANTITATIVE METHOD FOR THE DETERMINATION AND CHARTING OF THE ERYTHROCYTE HYPOTONIC FRAGILITY. **Blood** 1948; vol. 3 \(11\): p. 1290–1303. Disponível em:](https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/download/1152/804#:~:text=Palavras%2Dchave%3A%20Esferocitose%20Heredit%C3%A1ria%20C,SDS%2DPAGE%2C%20d%C3%A9fice%20proteico.&text=A%20Esferocitose%20Heredit%C3%A1ria%20(EH)%20%C3%A9%20a%20anemia%20hemol%C3%ADtica%20cong%C3%A9nita%20mais,prote%C3%ADnas%20da%20membrana%20do%20eritr%C3%B3cito.> Acesso em: 28/11/2021</p>
</div>
<div data-bbox=)

<<https://ashpublications.org/blood/article/3/11/1290/6824/A-QUANTITATIVE-METHOD-FOR-THE-DETERMINATION-AND>>. Acesso em 21/11/2021

CITOMETRIA. In: BRAGA, K. M. S.; PIMENTA, V. S. C.; RODRIGUES, F. A.; SANTOS, T. P. dos; ARAÚJO, E. G. CITOMETRIA DE FLUXO: HISTÓRICO, PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES EM PESQUISA, **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13, nº 23, p. 304, 2016
Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2016a/agrarias/citometria.pdf>>
Acesso em: 21/11/2021

KASSEBAUM, N. J. et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 615-624, jan. 2014. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/123/5/615/32839/A-systematic-analysis-of-global-anemia-burden-from>>. Acesso em: 24 out. 2020.

KEDAR, P. S.; COLAH, R. B.; KULKARNI, S.; GHOSH, K.; MOHANTY, D. Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. **Clinical & Laboratory Haematology**, v. 25, n. 6, p. 373-376, nov. 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.0141-9854.2003.00557.x?sid=nlm%3Apubmed>>. Acesso em: 24 de out. 2021.

KING, M-J.; BEHRENS, J.; ROGERS, C.; FLYNN, C.; GREENWOOD, D.; CHAMBERS, K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 111, p. 924-933, ago. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2000.02416.x>>. Acesso em: 26 de out. 2021.

KING M-J.; TELFER P.; MACKINNON H.; LANGABEER L.; MCMAHON C.; DARBYSHIRE P.; DHERMY D. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. **Cytometry B Clin Cytom**, vol. 74B. p. 244-250, jun. 2008.

MA, S.; QIN, J.; WEI, A.; LI, X.; QIN, Y.; LIAO, L. Novel compound heterozygous SPTA1 mutations in a patient with hereditary elliptocytosis. **Molecular Medicine Reports**, Nanning, v. 17, p. 5903 - 5911, fev. 2018. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/mmr/17/4/5903>>. Acesso em: 17 de nov. 2021.

QUEIRÓS, M.; et al. Teste da eosina-5-maleimida (EMA) para o diagnóstico de esferocitose hereditária: experiência do laboratório de Citometria de Fluxo do Centro Hospitalar do Porto. In: 4ª Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica. 2012. **Repositório Científico do Centro Hospitalar do Porto**, Porto, Portugal. Disponível

em:

<<https://repositorio.chporto.pt/bitstream/10400.16/1224/1/Poster%2023%20TESTE%20DA%20EOSINA-5-MALEIMIDA%20%28EMA%29%20PARA%20O%20DIAGN%c3%93STICO%20DE%20-%204as%20JIIC.pdf>>. Acesso em: 28/11/2021

MARIANI, M.; BARCELLINI, W.; VARCELLATI, C.; MARCELLO, A. P.; FERMO, E.; PEDDOTTI, P.; BOSSETTI, C.; ZANELLA, A. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. **Haematologica**, v. 93, n. 9, p. 1310-1317, set. 2008. Disponível em: <<https://haematologica.org/article/view/4989>>. Acesso em: 24 de out. 2021.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E.; Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia [online]**. 2007, v. 29, n. 2, pp. 168-178. Revisão Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000200016>>. Epub 22 Nov 2007. ISSN 1806-0870. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000200016>. Acesso em: 28/11/2021

MOHANDAS, N. Inherited hemolytic anemia: a possessive beginner's guide. **Hematology**. Am Soc Hematol. Educ Program, Nova Iorque, p. 377 - 381, nov. 2018. Revisão. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30504335/>> Acesso em: 17 de nov. de 2021.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Hematologia Laboratorial Eritrócitos**. 2. ed. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia, 2008.

NARLA, J.; MOHANDAS, N. Red cell membrane disorders. **International Journal of Laboratory Hematology**, New York, p. 47-52, fev. 2017. Revisão. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijlh.12657>> Acesso em: 28/11/2021

NISS, O.; CHONAT, S.; DAGAONKAR, N.; ALMANSOORI, M. O.; KERR, K.; ROGERS, Z. R.; MCGANN, P. T.; QUARMYNE, M. O.; RISINGER, M.; ZHANG, K.; KALFA, T. A. Genotype-phenotype correlations in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 61, p. 4 - 9, out. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1079979616300882?casa_to ken=LVdRgVj99OwAAAAA:AsKDOmKpJhoAloh3aVXxUoYLkKytEI9DbsTeKVIIBkoWBU-klcL-06HccGqhj10cviGYFXMnISTd>. Acesso em: 17 de nov. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Worldwide prevalence of anaemia 1993 - 2005**. Espanha. WHO Press, 2008. Relatório Oficial. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43894/9789241596657_eng.pdf;jses>

[sionid=D28AF355DDD8BD19AC530F064F546E36?sequence=1](https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/6422)> Acesso em: 28/11/2021

PINTO, W. J.; MARIALVA, J. E.; CARDOSO, S. M. G.; AREAS, M. A. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 12, n.1, p. 106 - 120, jan./abr. 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/6422>>. Acesso em: 17 de nov. de 2021.

RODRIGUES, A. D. et al. **Hematologia básica**. ed. 2. Porto Alegre: Grupo A, 2019.

SANTOS R. M. dos. **Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**. 2017. 21 Slides, color, UNESP. Disponível em: <<https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/sds-page-aula-imuno-vet.pdf>>. Acesso em 21/11/2021.

SANTOS, V. R. **Estudo de Exames Laboratoriais para o Diagnóstico e Acompanhamento de Esferocitose Hereditária**. 2015. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/41130/R%20-%20D%20-%20VANESSA%20RIBEIRO%20DOS%20SANTOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 28/11/2021

SODERQUIST, C.; BAGG, A. Hereditary elliptocytosis. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3066, abr. 2013. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/121/16/3066/31571/Hereditary-elliptocytosis>> Acesso em: 16 de jan. de 2021

SPEZIA, J.; CARVALHO, L. F. S.; CAMARGO-FILHO, M. F. A.; FURMAN, A. E.; UTIYAMA, S. R. R.; HENNEBERG, R. Prevalence of anemia in schools of the metropolitan region of Curitiba, Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, Curitiba, v. 40, n. 2, p. 151-155, abr/jun. 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/htct/a/pzRSNv5VbbGnWRY8pGqPcnk/?lang=en>>. Acesso em: 26 de nov. 2021.

SUESS, J.; LIMENTANI, D.; DAMESHEK, W.; DOLLOFF, M.J.; A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. **Blood**. vol. 3, n.º 11. p. 1290–1303, 1948. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/3/11/1290/6824/A-QUANTITATIVE-METHOD-FOR-THE-DETERMINATION-AND>> Acesso em: 27/11/2021.

TRABELSI, N.; BOUGUERRA, G.; HADDAD, F.; OUEDERNI, M.; DARRAGI, I.; BOUDRIGUA, I.; CHAOUACHI, D.; BARMAT, M.; FOUZAI, C.; BEJAOU, M.; MENIF, S.; KRAIEM, I.; ABBES, S. Biochemical, Cellular, and Proteomic Characterization of Hereditary Spherocytosis Among Tunisians. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, Tunisia, v. 55, nº 1, p. 117 - 129, fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33667330/>>. Acesso em: 24 de out. 2021.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H.; MOURÃO, G. B.; MIRANDOLA, M. S. Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.4, p.609-614, ago. 2001. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/Gf3Bcmf3pQkdbMkfBR7m57t/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em 28/11/2021.

VETTORE, L.; ZANELLA, A.; MOLARO, G. L.; MATTEIS, C. D.; PAVESI, M.; MARIANI, M. A New Test for the Laboratory Diagnosis of Spherocytosis. **Acta Haematologica**, Basel, v. 72, p. 258-263, fev. 1984. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/206398>>. Acesso em: 26 de nov. 2021.

Anemia. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/anaemia#tab=tab_1> Acesso em: 11 de jul. de 2020

ZANELLA, A.; IZZO, C.; REBULLA, P.; ZANUSO, F.; PERRONI, L.; SIRCHIA, G. Acidified Glycerol Lysis Test: a Screening Test for Spherocytosis. **British Journal of Haematology**, v. 45, p. 481-486, jul. 1980. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2141.1980.tb07167.x?sid=nlm%3Apubmed>>. Acesso em: 26 de nov. 2021.