

PRINCIPAIS METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO DE ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE¹

MAIN METHODOLOGIES FOR THE DIAGNOSIS OF HEMOLYTIC ANEMIA AUTOIMMUNE

Leticia Gabrielle Sete²
Marieli da Silva Carlotto³

RESUMO: O presente artigo demonstra uma revisão bibliográfica onde o objetivo foi identificar, em estudos publicados nos derradeiros anos quais as principais características devem ser observadas para a realização do diagnóstico da anemia hemolítica autoimune. Utilizou-se o método de pesquisa documental, dentre os resultados, os exames laboratoriais apresentam-se fundamentais para o procedimento do diagnóstico, no entanto, cabe ao clínico avaliar qual o tipo de exame a ser realizado pelo paciente, de acordo com a demanda e aspectos favoráveis. Dentre os métodos de tratamento, nos casos mais graves que não responderam satisfatoriamente a outros meios, recomenda-se a esplenectomia de parte ou por completo do baço. Concluiu-se que a Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) não é uma doença tão simples e que, sua ocorrência derivada de anticorpos quentes é maior que por anticorpos frios, observou ainda que a classe feminina pode ser mais afetada por este fenômeno. Ademais, os exames laboratoriais são procedimentos complexos e devem ser realizados minuciosamente dentre os critérios técnicos.

Palavras-chave: Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI). Anticorpos. Diagnóstico.

ABSTRACT: The present article demonstrates a bibliographical review where the objective was to identify, in studies published in the last years, the main characteristics should be observed for the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. The documentary research method was used, among the results, the laboratory tests are fundamental for the diagnostic procedure, however, it is up to the clinician to evaluate the type of examination to be performed by the patient, according to the demand and favorable aspects. Among the treatment methods, in the most severe cases that did not respond satisfactorily to other means, splenectomy of part or whole of the spleen is recommended. It was concluded that autoimmune hemolytic anemia (HAI) is not such a simple disease and that its occurrence derived from warm antibodies is higher than that of cold antibodies, it also observed that the female class may be more affected by this phenomenon. In addition, laboratory tests are complex procedures and must be performed in detail among the technical criteria.

Key words: Hemolytic Anemia Autoimmune (AHAI). Antibodies. Diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica autoimune (AHAI) é caracterizada pela lise precoce das hemácias devido à fixação de anticorpos e/ou complemento na superfície da membrana eritrocitária que

¹Trabalho apresentado à Faculdade São Paulo como pré-requisito para aprovação na pós-graduação em Análises Clínicas e toxicológicas.

²Farmacêutica, acadêmica de Pós-graduação. E-mail: leticia7sette@hotmail.com

³Professora orientadora Mestre em Farmácia. E-mail: marielisc@hotmail.com

são detectados e reconhecidos pelo sistema reticulo-endotelial e são destruídos. Essa produção de auto anticorpos é desencadeada quando o sistema imune adaptativo sofre uma falha no seu mecanismo supressor e começa a reconhecer antígenos dos eritrócitos como substâncias estranhas e iniciam uma resposta autoimune para destruir essas substâncias. Os anticorpos presentes na anemia hemolítica autoimune são anti-eritrocitários e a intensidade da hemólise depende da classe dos anticorpos envolvidos que podem ser IgG, IgM ou IgA. A etiologia da AHAI pode ser classificada como primária quando é idiopática, ou secundária quando é causada devido a uma doença associada ou subjacente. Os sintomas apresentados envolvem febre, icterícia, cansaço, falta de ar, esplenomegalia, cianose e dor nas extremidades e até hemoglobinúria (ALVES, SILVA & FERREIRA, 2015).

Vale destacar que a AHAI não é uma doença simples de ser diagnosticada. Para o diagnóstico da mesma, faz-se necessário uma investigação minuciosa da história clínica do paciente, bem como a realização e avaliação de exames laboratoriais considerados complexos.

A Anemia Hemolítica Autoimune classifica-se entre os grupos primários e secundários dependendo dos fatores que a desencadearam.

O teste de Coombs direto (TCD) é o método habitualmente mais utilizado no diagnóstico da AHAI, porém apresenta sensibilidade limitada, desde que é positivo apenas quando o número de moléculas de IgG por glóbulo vermelho (IgG/GV) é superior a 200. A detecção de auto anticorpos eritrocitários pode ser determinada por técnicas mais sensíveis que o TCD. Pode-se utilizar testes relacionados ao consumo de anticorpo que fixa complemento, teste de formação de rosetas, teste por radioimunoensaio e teste imunoenzimático. A citometria de fluxo também tem sido empregada com essa finalidade (BRAGA, MOREIRA & KUROSU, 1988).

Alves *et al.*, (2015) aponta que dentre os principais sintomas, o paciente exibe icterícia, alteração da temperatura corporal, palidez, esgotamento físico com dificuldades na respiração, palpitações, esplenomegalia cianose e dor nas margens das mãos, pés, nariz e orelha.

O presente artigo demonstra um estudo bibliográfico onde o objetivo foi identificar, em pesquisas publicadas nos derradeiros anos, quais as principais características devem ser observadas para a realização do diagnóstico da anemia hemolítica autoimune. O método de pesquisa documental demonstrou que a Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) ainda apresenta fatores que precisam ser esclarecidos sobre os fatores que a desencadeia. Utilizou-se como método na prática deste estudo a análise documental, que é uma técnica importante na

pesquisa qualitativa, seja complementando informações obtidas por outras técnicas, seja mostrando aspectos novos de um tema ou problema (LUDKE; ANDRÉ, 1986).

Para a avaliação dos dados, empregou-se a análise de conteúdo, pois, segundo Gil (1999) é um utensílio metodológico fundamental, pois desvenda informações que estão escondidas e promove o estudo e a explicação destas informações.

2 ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE – (AHAI).

Classifica-se como Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) o conjunto de doenças que apresentam constitutivas de auto anticorpos que se juntam aos [...] “eritrócitos e diminuem o tempo de sobrevivência dessas células, por meio de sua remoção da circulação pelos macrófagos do sistema retículo-endotelial”[...].Este tipo de doença raramente é diagnosticado em crianças e adolescentes e apesar de ser mais comum em homens, seu nível é mais elevado na classe feminina (PINTO FILHO, 2010; ALVES *et al.*, 2015).

Pinto Filho (2010) assegura que os fatores que determinam o desencadeamento da AHAI ainda é motivo de controvérsia dentre os pesquisadores, entretanto, dentre as principais suspeitas, encontram-se a baixa imunidade do organismo derivada de ação viral, uma vez que, este fator pode modificar o equilíbrio entre as células T facilitadoras e supressoras, alterações dos antígenos de superfície dos eritrócitos devido à contaminação por vírus ou introdução de drogas e ainda, possível reação cruzada dos anticorpos induzidos por agentes infecciosos contra antígenos de superfície dos eritrócitos.

Oliveira *et al.*,(2006) identifica dois grupos de AHAI: a AHAI primária, onde a anemia hemolítica é o único achado clínico e não se identifica doença sistêmica para explicar a presença de auto anticorpos. E a AHAI secundária ocorre no contexto de uma doença sistêmica, sendo a anemia hemolítica somente uma manifestação dessa doença. Pode ocorrer em pacientes com doença de caráter autoimune, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e colite ulcerativa. Pode ser observada também em pacientes portadores de neoplasias, como o linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, imunodeficiência, síndromes mielodisplásicas, infecção por *Mycoplasma*, vírus Epstein-Barr, citomegalovírus ou uso de drogas.

A maioria dos casos de anemia hemolítica autoimune (AHAI) é mediada por auto anticorpos quentes, na qual a temperatura ótima de reatividade é 37°C e, usualmente, a classe da imunoglobulina é IgG; por outro lado, a síndrome da aglutinina fria é geralmente causada

por uma IgM cuja reatividade máxima ocorre a 4°C. A diferenciação entre a AHAI a quente e a frio é essencial, pois o prognóstico e as estratégias terapêuticas são distintos. A AHAI referida como idiopática não é associada a nenhuma doença de base; entretanto, a secundária é geralmente associada à infecção, que desaparece após a resolução do quadro infeccioso. Lima (2015) e Hoffbrand (2004) assegura que na AHAI por anticorpos quentes a hematologia é típica “de anemia por hemólise extra vascular, com esferocitose e policromatocitose proeminentes no sangue periférico”. E devido à elevação de macrócitos policromáticos uma vez que a atividade eritropoética estar acrescida, isto também aumenta o VCM (volume corpuscular médio), ademais, ainda é possível identificar o RDW (*Red Cell Distribution Width* - Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos) elevado.

No diagnóstico da AHAI por anticorpos frios as classificações laboratoriais são parecidas aos encontrados na AHAI por anticorpos quentes. No entanto, a incidência dessa é relativamente incomum; havendo um pico de incidência entre 50 a 60 anos em ambos os sexos. Dentre os sintomas encontrados estão fadiga, dispneia aos esforços e fraqueza, urina escura, acrocianose de orelhas, dedos das mãos e dos pés, icterícia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia. As manifestações clínicas variam entre os pacientes; provavelmente, são dependentes da amplitude térmica do anticorpo frio. (LIMA, 2015).

A hemoglobinúria paroxística ao frio (HPF), apesar de rara, é uma das causas mais comuns de anemia hemolítica autoimune, representando 30% dos episódios em idade pediátrica. Descrita pela primeira vez em 1872, em associação com a sífilis, é em 1902, com Donath e Landsteiner, que é compreendida a sua fisiopatologia com a descoberta da hemolisina de Donath-Landsteiner, um autoanticorpo IgG com especificidade anti-P. Atualmente, a associação com a sífilis congênita ou adquirida é rara, em grande parte devido à diminuição da incidência desta patologia. Em termos clínicos, caracteriza-se por hemólise intravascular de início súbito, com anemia e hemoglobinúria, minutos ou horas após exposição ao frio. A maioria dos episódios são autolimitados e precedidos de infecções virais inespecíficas (MATOS *et al.*, 2012).

No caso da anemia hemolítica por medicamentos o isotipo de anticorpo que predomina é IgG, sendo que a lise celular decorre principalmente da interação da imunoglobulina com receptores de macrófagos no meio extra vascular. O teste de antiglobulina direta (DAT) pode ser realizado para verificar a presença de hemácias sensibilizadas, ou seja, já recobertas com anticorpos. Como há um risco de perda dos anticorpos ligados durante o procedimento de

lavagem das células, o que poderia reduzir a positividade do teste, sugere-se a pesquisa de anticorpos no soro do paciente pelo teste de antiglobulina indireta (TAI) (SOLÉ *et al.*, 2004).

A associação da AHAI com o comprometimento hematológico no Lúpus Eritematoso sistêmico, pode estar relacionado à atividade da doença com produção de auto anticorpos (anticorpos anti-hemácias), ao uso de medicamentos utilizados para o controle desta, como pulsoterapia com ciclofosfamida endovenosa, e às infecções. A AHAI pode ser uma das primeiras manifestações da doença e anteceder o diagnóstico de LES. Adicionalmente, essa manifestação (isoladas ou associadas a outros envolvimento da doença) é considerada fator de gravidade e de pior prognóstico, sendo associada com aumento de mortalidade, particularmente por sangramento do sistema nervoso central (KIM *et al.*, 2007).

2.1 METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico da AHAI faz-se necessário uma investigação minuciosa da história clínica do paciente, bem como a realização e avaliação de exames laboratoriais. Ademais, neste procedimento, duas informações são vitais para o clínico elaborar o tratamento adequado: 1 – Que tipo de anticorpo está envolvido. 2 – Se a AHAI é primária ou secundária. Estas informações se obtêm por meio do diagnóstico laboratorial, onde o clínico examina a atual situação do sangue periférico, o estudo imuno-hematológico e o estudo bioquímico (LIMA, 2015).

Alves *et al.*, (2015) afirmam que o diagnóstico precoce da AHAI é fundamental para um tratamento mais eficaz do paciente. A observação clínica de sintomas acompanhada de exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos, exames imuno-hematológicos e testes de imunoenensaio estão agregados no contexto investigativo no decorrer do diagnóstico da AHAI. Os sintomas dessa doença são diversificados e quando não tratada devidamente, ocorre uma elevação dos sintomas, onde é sujeito o paciente ir a óbito. Deste modo, é fundamental o diagnóstico preciso e correto com a identificação dos auto anticorpos e detecção da classificação doença, fundamentando assim o início do tratamento de maneira eficaz.

Dentre os principais instrumentos para o diagnóstico corretos da AHAI, Alves *et al.*, (2015) destaca que:

“Os testes imunohematológicos comumente usados são os de Anti-globulina Humana Direto (TAD) e Teste de Anti-globulina Humana

Indireto (TAI). O TAD tem a função de averiguar a detecção de anticorpos ou componentes do complemento fixados aos eritrócitos “in vivo”. As anti-globulinas humanas presentes no soro de Coombs ligam-se nos anticorpos aderidos nos eritrócitos e formam uma ponte entre os eritrócitos provocando uma hemoaglutinação”.

Além disso, existem alguns casos de pacientes com AHAI crônica que a função esplênica desenvolve a concepção de dacriócitos, o que pode tornar a avaliação do hemograma complexa por ser semelhante à mioelofibrose ou anemia perniciosa quando a macrocitose é expressiva (LIMA, 2015).

Oliveira (2014) orienta que as crioaglutininas causam interferências no VCM, apresentando assim resultados contraditórios, com aumento impossível do CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média). Porém, quando o sangue é aquecido a 37°C com passagem imediata no contador, podem apresentar resultados verídicos. Portanto, em casos assim a amostra não deve ser levada à geladeira por que isto pode fortalecer o processo de crioaglutinação, o que atrapalha ou inibe a desaglutinação. Os casos graves exigem nova coleta e passagem imediata do sangue no equipamento, enquanto o mesmo ainda demonstre temperatura somática estática. Ainda que escasso, existem casos que solicitam sustentação da amostra em banho e contagem de eritrócitos em hemocítmetro.

Lima (2015) elucida a relevância de assinalar a presença de crioaglutininas no resultado do hemograma para melhor diagnóstico clínico, uma vez que, elas podem se desenvolver em pacientes com neoplasias, doença do colágeno, infecções crônicas, no decurso da pneumonia por *Mycoplasma*, entre outras doenças.

Em estudos bioquímicos de pacientes com AHAI podem-se encontrar demonstrações típicas de hemólise extra vascular e intravascular. Na AHAI por anticorpos quentes onde predomina a hemólise extra vascular, encontra-se a elevação da bilirrubina indireta, Desidrogenase Lática (LDH) aumento e diminuição dos níveis séricos de haptoglobina. Na AHAI por anticorpos frios, a hemólise intravascular é identificada as mesmas características bioquímicas, além de hemoglobinúria (BRASIL, 2013).

LDH e hemoglobina iniciam-se na circulação quando as hemácias são extintas. Essa hemoglobina é transformada em bilirrubina não conjugada no baço ou ainda, pode ser conectada no plasma por uma haptoglobina. O complexo haptoglobina-hemoglobina é extinto

ligeiramente pelo fígado, podendo obstruir a detecção ou ainda, baixos níveis de haptoglobina (LIMA, 2015).

O estudo imuno-hematológico com o teste direto da antiglobulina humana (TAD), comumente identificado no Brasil como teste de Coombs direto (TCD), fornece a detecção de anticorpos ou componentes do complemento fixados às hemácias “in vivo” ou “in vitro”. Este exame embasa-se no fator de que os anticorpos que cobrem as hemácias são reconhecidos pela adição de anticorpos antiglobulina humana. A presença de aglutinação revela que o teste é positivo, as hemácias podem estar movidas por anticorpos ou por componentes do complemento. Neste caso, o resultado positivo está associado à distância entre as moléculas do anticorpo a membrana, o que torna a análise complexa, uma vez que pode ser transitoriamente negativo e positivar em exames posteriores, ou vice-versa (LIMA, 2015).

O soro de Coombs retém anticorpos contra IgG humana e contra frações do complemento C3, no entanto, demonstra baixa atividade contra IgM e IgA. Deste modo, realiza-se outro teste com um reagente monoespecífico para IgG, IgM e IgA, para identificar qual isótopo de imunoglobulina está revestindo as hemácias, complementando assim os testes poli específicos. Quando a intenção é classificar a particularidade do anticorpo precisam-se aplicar testes de eluição. Os auto anticorpos IgM são complexos de serem identificados por causa do seu tamanho e porque podem ser retirados no decorrer dos processos de lavagem. O procedimento de realização do teste de Coombs é complexo e deve ser feito minuciosamente, dentre os aspectos fundamentais, a temperatura ideal para a ligação de IgM. Em casos que ocorre a aglutinação espontânea após a incubação de soro de um paciente com as hemácias teste a 16°C, auto anticorpos IgM a frio o exame torna-se duvidoso, uma vez que, um anticorpo a frio clinicamente acentuado deve ser considerado se ocorrer aglutinação, a 30°C (LIMA, 2015).

Tecnicamente, em quase todas as síndromes de AHAI a frio o anticorpo é conduzido contra o antígeno “I” da superfície dos eritrócitos. O TAD quando positivo é patognomônico, o que acontece em média de 90% dos casos. O teste de Coombs indireto, que pesquisa anticorpos livres no plasma, não é recomendado porque se esgotam nos receptores de eritrócitos. Média de 5-10% dos pacientes com diagnóstico clínico de AHAI revelam TAD negativo, o que revela a sensibilidade restringida do teste. As técnicas criadas para investigar pacientes com AHAI com TAD negativo possuem resultados regulares. Portanto, o tipo de

teste a ser usado é indicado pelo clínico de acordo com a melhor representação dos resultados, bem como o melhor acesso à realização do mesmo e a menor toxicidade (LIMA, 2015).

Citometria de fluxo é um procedimento tecnológico que possibilita a análise das características físico-químicas em células ou partículas individualmente, podendo distinguir as variações das mesmas. Além disso, revela “eventos como identificação de antígenos fixados na superfície de células ou partículas, suspensas em meio líquido, quando tratadas com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo.” A citometria de fluxo fornece o benefício de avaliar as células individualmente, quando marcadas com fluorocromos, as quais são acompanhadas em tempo real. Na AHAI, este método pode ser usado para a quantificação de moléculas de imunoglobulinas expressas na superfície das células, o que causará elevação da sua importância no caso de Coombs negativo, este procedimento pode ser realizado por meio de medição e comparação da proporção de fluorescência de antígenos expressas no espaço superior celular usando um padrão externo, tal como são quantificadas células granulares (LIMA, 2015).

O *Polybrene* é um polication que promove agregação lábil de hemácias, é usado na técnica da detecção de aloanticorpos eritrocitários. O princípio do teste direto fundamenta-se na observação de que, quando existe sensibilização das hemácias por IgG, sua aproximação favorece a aglutinação, e o agregado não se desfaz após o tratamento com citrato de sódio. Este teste é realizado basicamente em cinco fases: primeiramente as hemácias do paciente são incubadas com soro autólogo em meio de baixa força iônica para facilitar a ligação do anticorpo à superfície celular. Posterior adiciona-se o polication. Em seguida, é adicionada solução de citrato de sódio, que dispersa a agregação inespecífica das hemácias não sensibilizadas, mas que não desfaz a aglutinação mediada por anticorpos que ocorreu durante a aproximação celular; Faz-se a leitura macroscópica e microscópica da reação pesquisando aglutinados específicos secundários à reação antígeno-anticorpo. Nos casos de TDP microscopicamente negativos, complementa-se o teste com soro de Coombs anti-IgG (KURODA *et al.*, 1998).

2.2 PRINCIPAIS FORMAS DE TRATAMENTO

O tratamento inicial da AHAI consiste em terapia com esteroides com esplenectomia reservada para não respondedores. Os agentes de segunda linha incluem imunoglobulina intravenosa, azatioprina, ciclofosfamida e ciclosporina A. O micofenolato mofetil (MMF) é um agente imunossupressor, é um pró-fármaco do ácido micofenólico: um produto de fermentação derivado de várias espécies de *Penicillium*. O ácido micofenólico é um potente inibidor da inosina 5-mono-fosfato desidrogenase, uma enzima crucial na síntese de purinas. Seu principal mecanismo de imunossupressão é a inibição da proliferação de linfócitos, mas, além disso, causando depleção de trifosfato de guanosina (GTP), resulta na redução da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos, diminuindo seu recrutamento para locais de inflamação ou rejeição de enxerto (HOWARD *et al.*, 2001).

A terapêutica para anemia hemolítica desencadeada por anticorpos quentes nos casos que não são severos incide em restituir vitaminas, dentre elas o folato é indicado para casos nos quais a hemólise é equilibrada. Os pacientes portadores de AHAI severa devem aderir o tratamento com corticoterapia que tem como objetivo suprimir a produção de auto anticorpos IgG, onde os corticoides geridos por via oral. O uso de corticoides administrados por meio endovenoso pode levar 20% dos pacientes a uma remissão completa. Quando o paciente apresenta um quadro de AHAI onde à adesão do tratamento com os corticoides não apresentam um resultado satisfatório ou não extingue a doença ao longo do tratamento, recomenda-se a esplenectomia, onde a retirada cirúrgica de parte do baço (ou completamente) pode levar a remissão de 60 % dos pacientes (GIGLIO e KALIKS, 2007; ALVES, 2015).

O tratamento para a anemia hemolítica por anticorpos frios consiste na manutenção do paciente em ambiente aquecido, Agentes alquilantes como Clorambucile ciclofosfamida apresentam eficácia em alguns casos, bem como a técnica de transfusão que permite retirar plasma sanguíneo de um doador ou de um doente, denominada deplasmáfêrese (GIGLIO e KALIKS, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A escolha do tema surgiu após o pesquisador fazer minuciosas leituras e pesquisa de materiais teórico-científicos, observados em artigos, livros, revistas e monografias estudados durante o decorrer da pós graduação em Análises clínicas e toxicológicas.

O método de escolha dos documentos foi concretizado em três períodos, o primeiro momento, conforme acima descrito, subsequente, no segundo período, selecionando para análise propriamente dita, apenas os documentos que eram coniventes com os objetivos deste estudo, durante o segundo semestre do ano de 2018 selecionando para a pesquisa os documentos publicados nos últimos anos, entre o ano de 2010 e 2016.

No terceiro momento, efetuou-se a transcrição e tratamento dos dados usando a técnica de análise de conteúdo, de classe não-apriorísticas, por ser propícia a esta pesquisa.

Os resultados bibliográficos foram estudados minuciosamente, o que promoveu as discussões e a elaboração do presente artigo.

Relevando a finalidade de atender os objetivos propostos na delimitação deste projeto de pesquisa, estabeleceu-se o uso da metodologia descritiva com abordagem qualitativa. Deste modo, a escolha desta abordagem permitiu que o pesquisador pesquisasse e analisasse de modo amplos resultados que as derradeiras pesquisas demonstraram sobre o assunto, preservando a origem dos dados (MARCONI; LAKATOS, 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A realização deste estudo revelou que a Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) é uma doença complexa, que se não for diagnosticada precocemente e tratada devidamente, pode levar o paciente a óbito.

Conclui-se que os exames laboratoriais são criteriosos em seus procedimentos, pois um único fator pode dificultar as identificações e classificações e ainda pode alterar as amostras. O teste de Coombs direto (TCD), não é o mais indicado para o diagnóstico da AHAI pois apresenta sensibilidade limitada o que pode levar a um possível falso negativo. Existem hoje técnicas mais sensíveis que o TCD como, por exemplo, os testes relacionados ao consumo de anticorpo que fixa complemento, teste de formação de rosetas, teste por radioimunoensaio, imunoenzimático, e até a citometria de fluxo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.C.L.; SILVA, A. N.; FERREIRA, E. C. P. M. Anemia hemolítica auto-imune. **Revista Unilus**, [online], v. 13, n. 30, p. 443, 2015. Disponível em: <<http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/viewFile/443/u2016v13n30e443>>. Acesso em: 08 out. 2016.

BATISTA FILHO, MALAQUIAS; SOUZA, ARIANI IMPIERI DE; BRESANI, CRISTIANE CAMPELLO. **Anemia como problema de saúde pública: uma realidade atual**. Ciênc. Saúde coletiva, Rio de Janeiro, v. 13, n. 6, dez. 2008.

G.W. BRAGA, J.O. BORDIN, G. MOREIRA JR., A. KURODA. **Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: características do teste manual direto do Polybrene**. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.44 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42301998000100004&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 08 de outubro, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde; Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. **Anemia hemolítica autoimune**. Portaria SAS/MS nº 1.308, de 22 de novembro de 2013.

BORGES, ROSANEA BEATRIZ; WEFFORT, VIRGÍNIA RESENDE SILVA. Anemia no Brasil – revisão. **Revista Médica de Minas Gerais** 2011; 21(3 Supl1): S1-S144.

COSTA, JULIANA T. ET AL. **Prevalência de anemia em pré-escolares e resposta ao tratamento com suplementação de ferro**. J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre, v. 87, n. 1, Feb. 2011.

GIGLIO, A. D.; KALIKS, R. **Princípios de hematologia clínica**. Barueri, SP: Manole, 2007. p. 90-93.

GIL, A. C. Utilização de documentos. In: **Métodos e técnicas de pesquisa social**. 5. ed. São Paulo: Atlas, 1999. p. 160-167.

HOFFBRAND, A.V. **Fundamentos em Hematologia**/A.V. Hoffbrand; J.E. Pettit e P.A.H. Moss; trad. Ivan Carlquist – 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2004.

HOWARD *et al.*, Mycophenolate mofetil for the treatment of refractory auto-immune haemolytic anaemia and auto-immune thrombocytopenia purpura. **Rev. British Journal of Hematology**, v.117. s/nº. p.712-715. 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2141.2002.03430.x>>. Acesso em: 12 out. 2018.

KIM, *et al.*, Púrpura Trombocitopênica e Anemia Hemolítica Auto-Imune em Pacientes Internados com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n.1, p. 10-15, jan/fev, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042007000100004>. Acesso em: 12 out. 2018.

KURODA *et al.*, Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: características do teste manual direto do Polybrene. **Rev. Assoc. Med. Bras.** vol.44 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42301998000100004&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 14 nov. 2018.

LIMA, A., F. **Anemia hemolítica autoimune e o diagnóstico laboratorial: uma revisão da literatura.** 2015. 32f. Monografia (Especialização). Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa e Centro de Capacitação Educacional. Recife, 2015.

LÜDKE, M.; ANDRÉ, M. E. D. A. Pesquisa em educação: **abordagens qualitativas.** São Paulo: EPU, 1986.

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. V. Metodologia qualitativa. **Metodologia científica.** 4 ed. São Paulo: Atlas, 2004. p. 269-284.

MATOS *et al.*, Hemoglobinúria paroxística ao frio: quando suspeitar? **Rev. Nascere e Crescer.** vol.21 no.3 Porto set. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-07542012000300004>. Acesso em: 03 de dez. 2018.

OLIVEIRA, R.A.G – **Atlas de Hematologia** – 1ed. – São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2014.

OLIVEIRA, et al., **Curso clínico da anemia hemolítica auto-imune: um estudo descritivo.** J. Pediatr. (Rio J.) vol.82 no.1 Porto Alegre Jan./Feb. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572006000100012&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 8 de out. 2018.

PINTO FILHO, R. de B. **Anemia hemolítica auto-imune:** um estudo descritivo e revisado de sua origem ao seu tratamento. 2010. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2010.

SOLÉ *et al.*, Reações alérgicas a medicamentos. **Rev. Jornal de Pediatria.** Vol. 80, Nº4, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/jped/v80n4/v80n4a04.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2018.