GIUSEPPINA MARIA PATAVINO SAAD

Avaliação da deformabilidade eritrocitária através da ectacitometria na deficiência de ferro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Medicina.

São Paulo
2002

GIUSEPPINA MARIA PATAVINO SAAD

Avaliação da deformabilidade eritrocitária através da ectacitometria na deficiência de ferro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Hematologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Augusto Achucarro Silveira

São Paulo
2002

“A vida da carne está no sangue” (Levítico 17,11).

À minha mãe Angela Maria
minhas irmãs Marsia e Maria Luisa e
meus filhos Flávia e Felipe,
por entenderem minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Augusto Achucarro Silveira, meu incansável orientador, pela dedicação e sabedoria com que me conduziu durante todo esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone pela oportunidade de desenvolver esse estudo na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Fundação Pró- Sangue / Hemocentro de São Paulo.

À Prof.ª Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro pela amizade e força em diversas fases da pesquisa.

À amiga Iara Keiko Yokomizo pela paciência e orientação na realização dos testes laboratoriais específicos.

À equipe técnica do Laboratório de Hematologia da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo, Deise Miyuki Tsuha Moromizato, Márcia Marangão Guimarães, Roxane Ribeiro e Marisa Yamasaki Simic pela inestimável colaboração.

Às secretárias da Pós Graduação Terezinha dos Anjos de Oliveira e Nilda Rodrigues da Silva pelo apoio entre o projeto e a conclusão desse estudo.

Aos médicos e funcionários do Hemonúcleo de Santos, pela amizade, compreensão, seleção dos pacientes e coleta das amostras de sangue.

Ao Centro Universitário Lusíada de Santos (UNILUS) na pessoa do seu reitor Sr. Nelson Teixeira, pelo apoio logístico.

Ao Dr. Alfredo Scaff pela amizade e análise estatística dos dados.

Ao Dr. Angelo Sementilli pela amizade e elaboração das fotos.

À bibliotecária Valéria de Vilhena Lombardi pela ajuda e orientação.

À Cristina Romboli pela dedicação e estruturação do volume.

Ao Prof. Dr. Flávio Saad pelas idéias e revisão do texto.

À Flávia Maria Saad pelo carinho e digitação dos dados.

Aos amigos Eloisa Tedeschi Dauar, Rogério Pastore Bassit e Sérgio Buzian Brasil por compartilharem comigo as angústias nesta empreitada.

À toda minha família pelo amor e carinho que sempre me dedicaram.

SUMÁRIO

1. Introdução 1
2. Objetivos 8
3. Revisão bibliográfica 10
3.1. Deformabilidade eritrocitária 10
3.2. Métodos de avaliação da deformabilidade eritrocitária 13
3.2.1. Aspiração por micropipeta 13
3.2.2. Filtração 14
3.2.3. Métodos viscosimétricos 15
3.3. Ectacitometria 16
3.4. Doenças com alteração da deformabilidade eritrocitária 20
3.5. Deformabilidade eritrocitária em anemia ferropriva 21
3.6. Anemia ferropriva e trombose 23
4. Casuística e métodos 26
4.1. Amostra 26
4.2. Análise estatística 26
4.3. Coleta de sangue 27
4.4. Hemograma pelo sistema hematológico H•3 RXT®. 27
4.5. Outros exames 29
4.6. Ectacitometria através do LORCA® 29
4.7. Técnica utilizada 32
5. Resultados 33
6. Discussão 70
7. Conclusões 79
8. Referências bibliográficas 80

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosina tri fosfato
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
cp	centipoise
dl	decilitro
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etileno diamino tretracético
fl	fentolitro
g	grama
GV	glóbulos vermelhos
Hb	hemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular média
HDW	hemoglobin distribution width
Ht	hematócrito
ID	índice de deformabilidade
IE	índice de elongação
LASER	light amplification stimulated emission radiation
LORCA®	Laser-Assisted-Optical-Rotational-Cell-Analyser
μ	micra
μg	micrograma
μm	micrômetro
ml	mililitro
ng	nanograma
Pa	Pascal
pg	picograma
RDW	red cell distribution width
VCM	volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES NORMAIS DE CONTEÚDO DE HEMOGLOBINA X VOLUME CELULAR PELO H•3 28

TABELA 2 - RESULTADOS DE ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DE 21 DOADORES DE SANGUE GRUPO CONTROLE 34

TABELA 3 - RESULTADOS DE ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DE 21 PACIENTES PORTADORES DE AMEMIA FERROPRIVA PRÉ TRATAMENTO.....35

TABELA 4 - RESULTADOS DE ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DE 21 PACIENTES PORTADORES DE AMEMIA FERROPRIVA PÓS TRATAMENTO.....36

TABELA 5 - PERFIL DE FERRO DE 21 PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FERROPRIVA PRÉ E PÓS TRATAMENTO.....42

TABELA 6 - MORFOLOGIA ERITROCITÁRIA DE SANGUE PERIFÉRICO DE 21 PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FERROPRIVA PRÉ E PÓS TRATAMENTO.....43

TABELA 7 - VALORES DE DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA EM 21 DOADORES DE SANGUE- GRUPO CONTROLE EM SOLUÇÃO DE 300mOsm, EM DIFERENTES VALORES DE “SHEAR STRESS’’. 45

TABELA 8 - VALORES DE DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA EM 21 PACIENTES PRÉ TRATAMENTO DE ANEMIA FERROPRIVA EM SOLUÇÃO DE 300mOsm, EM DIFERENTES VALORES DE “SHEAR STRESS” 46

TABELA 9 - VALORES DE DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA EM 21 PACIENTES PÓS TRATAMENTO DE ANEMIA FERROPRIVA EM SOLUÇÃO DE 300mOsm, EM DIFERENTES VALORES DE “SHEAR STRESS” 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Técnica de aspiração por micropipeta 13
Figura 2 – Técnica de filtração 14
Figura 3 – Técnica de reoscopia 15
Figura 4 – Diagrama do ectacitômetro 17
Figura 5 – Fotografia do ectacitômetro LORCA ® 30
Figura 6 – Esquema do ectacitômetro 31
Figura 7 – Esquema do índice de deformabilidade 31
Figura 8 – Esquema de difração do LORCA ® 32
Figura 9 – Gráfico: hematócrito normal x pré x pós tratamento 38
Figura 10 – Gráfico: hemoglobina normal x pré x pós tratamento 38
Figura 11 – Gráfico: VCM normal x pré x pós tratamento 39
Figura 12 – Gráfico: HCM normal x pré x pós tratamento 39
Figura 13 – Gráfico: CHCM normal x pré x pós tratamento 39
Figura 14 – Morfologia do sangue periférico à microscopia óptica 45
Figura 15 – Gráfico de DE – grupo controle 49
Figura 16 – Gráfico de DE – pacientes pré tratamento 50
Figura 17 – Gráfico de DE – pacientes pós tratamento 51
Figura 18 – Gráfico de DE – grupo controle e pacientes pré tratamento 52
Figura 19 – Gráfico de DE – grupo controle e pacientes pós tratamento 53
Figura 20 – Gráfico de DE – pacientes pré e pós tratamento 54
Figura 21 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pré tratamento (1,69 Pa) . 55
Figura 22 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pós tratamento (1,69 Pa) . 55
Figura 23 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pré tratamento (3,0 Pa) ... 56
Figura 24 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pós tratamento (3,0 Pa) ... 56
Figura 25 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pré tratamento (5,34 Pa) . 57
Figura 26 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pós tratamento (5,34 Pa) . 57
Figura 27 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pré tratamento (16,86 Pa) 58
Figura 28 – Correlação entre Hb x ID – pacientes pós tratamento (16,86 Pa) 58
Figura 29 – Correlação entre microcitose x ID – pacientes pré tratamento (1,69 Pa) 59

Figura 30 – Correlação entre microcitose > 20% x ID – pacientes pós tratamento (1,69 Pa) 59

Figura 31 – Correlação entre microcitose x ID – pacientes pré tratamento (3,0 Pa)..... 60

Figura 32 – Correlação entre microcitose > 20% x ID – pacientes pós tratamento (3,0 Pa) 60

Figura 33 – Correlação entre microcitose x ID – pacientes pré tratamento (5,34 Pa)..... 61

Figura 34 – Correlação entre microcitose > 20% x ID – pacientes pós tratamento (5,34 Pa) 61

Figura 35 – Correlação entre microcitose x ID – pacientes pré tratamento (16,86 Pa)..... 62

Figura 36 – Correlação entre microcitose > 20% x ID – pacientes pós tratamento (16,86 Pa) 62

Figura 37 – Correlação entre hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (1,69 Pa)..... 63

Figura 38 – Correlação entre hipocromia > 40% x ID – pacientes pós tratamento (1,69 Pa) 63

Figura 39 – Correlação entre hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (3,0 Pa)..... 64

Figura 40 – Correlação entre hipocromia > 40% x ID – pacientes pós tratamento (3,0 Pa) 64

Figura 41 – Correlação entre hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (5,34 Pa)..... 65

Figura 42 – Correlação entre hipocromia > 40% x ID – pacientes pós tratamento (5,34 Pa) 65

Figura 43 – Correlação entre hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (16,86 Pa)..... 66

Figura 44 – Correlação entre hipocromia > 40% x ID – pacientes pós tratamento (16,86 Pa) 66

Figura 45 – Correlação entre microcitose + hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (1,69 Pa) 67

Figura 46 – Correlação entre microcitose + hipocromia > 3% x ID – pacientes pré tratamento (1,69 Pa) 67

Figura 47 – Correlação entre microcitose + hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (3,0 Pa) 68

Figura 48 – Correlação entre microcitose + hipocromia > 3% x ID – pacientes pré tratamento (3,0 Pa) 68

Figura 49 – Correlação entre microcitose + hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (5,34 Pa) 69

Figura 50 – Correlação entre microcitose + hipocromia > 3% x ID – pacientes pré tratamento (5,34 Pa) 69

Figura 51 – Correlação entre microcitose + hipocromia x ID – pacientes pré tratamento (16,86 Pa) 70

Figura 52 – Correlação entre microcitose + hipocromia > 3% x ID – pacientes pré tratamento (16,86 Pa) 70

RESUMO

SAAD, G. M. P. **Avaliação da deformabilidade eritrocitária através da ectacitometria na deficiência de ferro.** São Paulo, 2002, 90 p. Dissertação (mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A deformabilidade é a característica que permite ao eritrócito normal de 7 a 8 micrômetros (μm) circular por capilares de até 3μm de diâmetro. Esse fenômeno depende da geometria celular, da viscosidade interna e das propriedades visco-elásticas da membrana eritrocitária. Dentre as várias técnicas de estudo da deformabilidade eritrocitária (DE), como: a aspiração por micropipeta, a filtração e a reoscopia, destaca-se a ectacitometria. Essa técnica utiliza um viscosímetro de fluxo laminar onde as modificações de forma dos eritrócitos são monitoradas continuamente por um feixe de raio LASER, processadas por microcomputador e inseridas em gráfico para posterior análise. A ectacitometria fornece o "Índice de Deformabilidade" (ID), o qual proporciona a medida da eliptocitogênese dos eritrócitos quando submetidos a uma força denominada "shear stress". A anemia ferropriva é uma patologia muito freqüente na prática médica. Apresenta anormalidades morfológicas expressivas como: microcitose, hipocromia, ovalócitos, eliptócitos e hemácias em alvo. Alterações de deformabilidade eritrocitária foram descritas em diversas situações como na esferocitose hereditária, eliptocitose hereditária e anemias hemolíticas auto-imune. Na anemia ferropriva os trabalhos de deformabilidade eritrocitária são controversos. O presente estudo avalia a DE, utilizando a técnica da ectacitometria, em 21 pacientes portadores de anemia ferropriva documentada, antes e depois do tratamento com sais de ferro. Embora o tratamento da anemia tenha sido eficaz (Hb antes- 8,52 g/dl e Hb depois -12,74 g/dl), alguns pacientes persistiram com morfologia eritrocitária alterada. Os resultados demonstram DE diminuída em pacientes portadores de anemia ferropriva, quando

comparada ao grupo controle ($p < 0,0007$). A ausência de normalização e manutenção da diferença estatística após a terapêutica ($p < 0,03$), em baixos valores de “shear stress”, pode ser atribuida à manutenção das alterações morfológicas eritrocitárias. Não foi verificada correlação entre o grau da anemia e a redução da DE. A diminuição da DE apresenta maior correlação com a microcitose, sendo que a hipocromia parece não interferir de maneira importante. A concomitância dos dois fatores pode somar ou anular os seus efeitos sobre a DE. O presente estudo sugere que o fator responsável pela diminuição da DE na anemia ferropriva é a microcitose. Recentemente, relatos de anemia ferropriva associada a fenômenos trombóticos aumentaram o interesse no estudo da DE para melhor compreensão desses casos.

SUMMARY

SAAD, G. M. P. **Evaluation of the red cell deformability through ektacytometry in iron deficiency.** São Paulo, 2002, 90 p. Thesis (masters)- School of Medicine, University of São Paulo.

The deformability allows the 7 to 8 μm red cell to circulate through capillaries of 3 μm. This phenomenon depends on cellular geometry, internal viscosity and viscoelastic properties of the membrane. Among the various techniques of erytrocyte deformability (ED) analysis such as: micropipette aspiration, filtration and reoscopy, we chose ektacytometry. This technique uses a laminar flow viscometry, where red cell shape changes are continuously monitorated by LASER, processed by a computer and inserted in a graphic for further analysis. Ektacytometry measures the "Deformability Index" (DI), which shows the size of eliptocytogenesis of the eritrocyte under "shear stress" force. Iron deficiency anemia is a very frequent disease in medical practice. It presents expressive morphologic alterations such as microcytosis, hypocromy, ovalocytosis, eliptocytosis and target cells. Erytrocyte deformability has been described in a number of situations like hereditary spherocytosis, hereditary elitptocytosis and autoimmune hemolytic anemia. Concerning iron deficiency anemia, authors are controversial. The present study evaluates erytrocyte deformability, using ectacytometry in 21 patients carrying documented iron deficiency before and after therapeutics with iron components. Although the anemia treatment proved to be efficient (before Hb- 8,52 g/dl and after Hb- 12,74 g/dl), some patients persisted with erytrocyte alteration morfology. Results demonstrate diminished erytrocyte deformability in people with iron deficiency anemia, when compared with the control group ($p < 0,0007$). The absence of regularization and maintenance of statistical difference after treatment ($p < 0,03$) in low "shear stress" can be

attributed to the persistence of red cell anomalies. There is no relation between the level of anemia and reduced ED. The erytrocyte deformability diminished is greatly related to microcitosys, even if hipocromy seems to not interefere importantly. The two factors altogether can either sum or nulify the effects over erytrocyte deformability. The present study suggests that the responsible factor for diminished erytrocyte deformability is microcitosys. Recently, iron deficiency anemia has been associated to thrombotic phenomenon has raised interest in the studying of erytrocyte deformability, in order to understand such cases.

1. Introdução

O glóbulo vermelho normal caracteriza-se por apresentar a forma de um disco bicôncavo e por sua capacidade de deformação nas sucessivas passagens pela microcirculação. O termo deformabilidade celular é comumente utilizado para caracterizar a propriedade de adaptação do eritrócito ao fluxo, nos cento e vinte dias em média, em que permanece na circulação. A hemácia normal, cujo diâmetro é de 7 a 8 micrômetros, consegue atravessar capilares medindo aproximadamente 2 a 3 µm graças à essa capacidade. Esse complexo fenômeno depende de três fatores: geometria celular, viscosidade intracitoplasmática e propriedades mecânicas da membrana (WEED, 1970; MOHANDAS, 1979; SCHÖENBEIN, 1981; MEISELMAN, 1981; HEATH, 1982; FORTIER, 1988; REINHART, 1990; KUYPERS, 1990; HOFFMAN, 1991; MOHANDAS, 1993; BOSCH, 1994; JOHNSON, 1994; BEUTLER, 1995; LEE, 1999).

A "geometria celular" depende da forma, do volume e da relação superfície/volume do eritrócito. A conformação discóide proporciona ao glóbulo vermelho normal um vantajoso excesso de superfície em relação ao volume, o que facilita a sua adaptação quando necessário. De fato, a deformação eritrocitária no ser humano, em animais ou "*in vitro*", proporciona pouco ou nenhum aumento na área de superfície. Entretanto, hemácias com volume reduzido, isto é, microcíticas, apresentam uma menor deformabilidade quando comparadas às normocíticas ou macrocíticas. Se a célula perde parte da membrana, ou seja, diminui a superfície ou aumenta o volume pela entrada maior de solutos e água, ocorre alteração da biconcavidade, tornando-a esférica e limitando a sua capacidade de deformação (LEVANDER, 1978; TILLMANN, 1980; YIP, 1983; MOHANDAS, 1993; ANDERSON, 2000).

Um dos componentes reguladores da deformabilidade celular é a "viscosidade intracitoplasmática", a qual depende da concentração da hemoglobina e das suas propriedades físico-químicas. Assim, as células desidratadas, com maior densidade interna, deformam menos. Para uma concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) normal, variando de 27 a 37 g/dl, a viscosidade celular influencia pouco a deformabilidade. À medida que a CHCM aumenta acima de 37 g/dl, há uma redução exponencial da capacidade de deformação do eritrócito. A viscosidade de uma solução de hemoglobina que é mensurada em 5 a 15 centipoises (cp) na faixa de CHCM normal passa para 45 g/dl com CHCM de 40g/dl, 170cp com CHCM de 45g/dl e 650 cp com CHCM de 50g/dl. Isso demonstra a importância da viscosidade intra-eritrocitária na deformabilidade de hemácias desidratadas. Na presença de hemoglobinas anormais mais viscosas (como a hemoglobina S) ou com tendência à formação de cristais (como na hemoglobinopatia C), a deformabilidade também está prejudicada (MOHANDAS, 1979; CHIEN, 1981; MOHANDAS, 1983; BALLAS, 1985; REINHART, 1992; MOHANDAS, 1993; SILVEIRA, 1997; KACER, 2001).

A "membrana citoplasmática" desempenha um papel primordial na habilidade de deformação dos eritrócitos, além de manter sua integridade estrutural. Para que o eritrócito mantenha essa capacidade, é necessário que a membrana esteja com todos os seus constituintes quantitativa e qualitativamente normais. As anormalidades na fração lipídica, nas proteínas integrais (glicoforina, Banda 3) e, principalmente, nas proteínas do citoesqueleto (espectrinas, proteína 4.1, anquirina e outras) alteram a deformabilidade do eritrócito, podendo até ocasionar sua fragmentação (WEED, 1970; EVANS, 1981; HEATH, 1982; FORTIER, 1988; CHASIS, 1989; LIU, 1992; LUX, 1996).

As situações anormais presentes nas anemias hemolíticas congênitas e hereditárias, como deficiências protéicas na esferocitose e eliptocitose e

interações com a hemoglobina nas talassemias, comprometem a composição e a função das biomembranas. Os níveis de ATP intra-celular alterados, assim como o cálcio e magnésio, têm sido relatados como determinantes críticos da deformabilidade da membrana eritrocitária (WEED, 1970; EVANS, 1981; HEATH, 1982; FORTIER, 1988; CHASIS, 1989; LIU, 1992; LUX, 1996).

Atualmente existem inúmeras técnicas de laboratório que permitem avaliar a reologia e a deformabilidade eritrocitária, embora muitas delas permaneçam restritas aos laboratórios de pesquisa e investigação. Esses estudos podem fornecer dados importantes para a compreensão da fisiologia normal e da fisiopatologia de uma série de doenças congênitas ou adquiridas do glóbulo vermelho. Sabe-se que a deformabilidade está diminuída em eritrócitos senescentes e em anemias hemolíticas como: anemia falciforme, talassemias, microesferocitose hereditária, eliptocitose hereditária, deficiência de glicose-6-fosfato- desidrogenase e anemias hemolíticas auto-imunes (MOHANDAS, 1979; EVANS, 1981; BOSCH, 1994; SILVEIRA, 1997).

Os principais métodos de estudo da deformabilidade eritrocitária são a ***aspiração*** por micropipeta, a ***filtração*** e a ***viscometria*** (MOHANDAS, 1979; SMITH, 1979; BRANEMARK, 1981; HOCHMUTH, 1981; HEATH, 1982; CLARK, 1983; TRACEY, 1995; MAZERON, 1997).

A ***aspiração*** através de micropipeta é feita por aplicação de uma pressão negativa sobre a membrana eritrocitária, fazendo com que a célula penetre na luz da mesma. Dependendo do diâmetro da pipeta (1 a 3 μ), pode ser aspirada toda a célula ou parte dela. As modificações podem ser observadas à luz de microcinematografia, ou em fotografias seriadas dos eritrócitos, permitindo, assim, uma análise detalhada do fenômeno. É uma técnica trabalhosa e que permite apenas o estudo de células individualizadas (MOHANDAS, 1979).

Mais recentemente tem sido associada a anticorpos monoclonais específicos para componentes da membrana eritrocitária, servindo para

demonstrar deficiências de certas proteínas na gênese de distúrbios da biomembrana (CHASIS, 1989).

A ***filtração*** está fundamentada na passagem de uma amostra de sangue em filtros com poros de diversos tamanhos, aplicando-se uma pressão constante. Depende de muitos fatores, tais como o tamanho, número e uniformidade da distribuição dos poros. As propriedades eletrostáticas do material utilizado como filtro também podem interferir nos resultados. Quando se analisa o sangue total por este método, pode haver influência de outros elementos como: proteínas plasmáticas, leucócitos e plaquetas (LEBLOND, 1979 e 1981; CHIEN, 1981; BOISSEAU, 1981).

Em 1981, BRANEMARK observou que havia limitação no uso de filtros para o estudo da deformabilidade eritrocitária.

Apesar disso, vários outros autores descreveram alterações da filtração eritrocitária em seres humanos nas seguintes situações: anemias por deficiência de ferro, anemias hemolíticas, esplenectomizados, trombose cérebro-vascular, obesidade, hiperlipidemias, hiperuricemia, hipertensão arterial, uso de anticoncepcionais, fumo, síndrome de Raynaud, idade avançada e em crianças diabéticas (LEBLOND, 1979 e 1981; BOISSEAU, 1981; ROADANT, 1981; TRACEY, 1995).

Os ***métodos viscométricos*** utilizam uma suspensão de hemácias sob efeito de uma tensão, num aparelho denominado ***viscosímetro***. Nessas condições, os eritrócitos discóides tornam-se elípticos, com o seu maior eixo paralelo ao sentido do fluxo. Essa técnica permite a visualização direta das modificações da célula, a denominada ***reoscopia***. Além disso, pode-se medir o grau de deformabilidade em função da força aplicada através da técnica da ***ectacitometria*** (MOHANDAS, 1979; SCHÖNBEIN, 1981).

A ***reoscopia*** utiliza um viscosímetro associado a um microscópio de fase e permite a observação direta, a fotografia ou a cinematografia das

células em movimento, deformadas após a aplicação de uma força sobre elas (SCHÖNBEIN, 1981; MEISELMAN, 1981).

A técnica da ***ectacitometria*** foi inicialmente descrita por BESSIS e MOHANDAS em 1974, em um protótipo, e aperfeiçoada no ano seguinte. A partir desses estudos preliminares, diversos autores em todo o mundo passaram a testar essa técnica em animais, seres humanos normais e com diferentes patologias (BESSIS, 1975; JOHNSON, 1977; MOHANDAS, 1979; SMITH, 1979; CLARK, 1983; STUART, 1985; FISCHER, 1989; KUYPERS, 1990; SCHIER, 1992; STEEKSTRA, 1993; STEEKSTRA, 1994; LUX, 1996; SILVEIRA, 1997; MAZERON, 1997; BASKURT, 1997).

Cerca de duzentos trabalhos científicos foram publicados utilizando a técnica da ***ectacitometria***, o que a tornou um dos melhores parâmetros na avaliação da deformabilidade eritrocitária (JOHNSON, 1994).

O ***ectacitômetro*** é um instrumento versátil e sofisticado com a vantagem de usar uma pequena quantidade de sangue e pequeno coeficiente de variação (≅1%), o que aumenta a sua sensibilidade. No entanto, há necessidade de ser operado por pessoa capacitada e experiente. Até pouco tempo, existiam poucos aparelhos disponíveis, o que dificultava o acesso ao método, na rotina médica e hematológica (BESSIS, 1974; CLARK, 1983; STUART, 1985; KUYPERS, 1990).

Recentemente encontra-se disponível o ***ectacitômetro*** **LORCA®**, que pode facilitar o acesso aos estudos de deformabilidade *"in vitro"* em diferentes doenças, hematológicas ou não (Mechatronics®).

A expressão *"shear stress"* tem sido traduzida na literatura nacional como tensão ou força de ***"cisalhamento"*** ou ***"tosquiamento".*** Entretanto, essas denominações não expressam precisamente o que ocorre. Por essa razão, optou-se por utilizar, no presente texto, a expressão original para que se possa reportar a esse fenômeno.

O *"shear stress"*, na circulação normal, é definido como a força de resistência tangencial, produzida pelo movimento do sangue através da superfície endotelial do vaso sangüíneo. Sua magnitude é diretamente proporcional ao fluxo e à viscosidade do sangue e inversamente porporcional ao cubo do seu raio (RUTHERFORD, 1995).

No ***ectacitômetro***, o *"shear stress"* é fixo e não há variação do recipiente onde a amostra é analisada. Dessa maneira, as alterações observadas dependem das modificações dos eritrócitos.

O eritrócito em repouso gera um padrão de difração circular no ***ectacitômetro***, porém, sob o efeito do "*shear stress*", ocorre a transformação elíptica e orientação paralela ao fluxo (JOHNSON, 1977, 1994) .

Alguns autores descrevem um movimento de **"*tanque de guerra*"**, ocasionado pela rotação da membrana em volta do citoplasma quando a hemácia é submetida a um fluxo laminar, semelhante ao vórtice de um redemoinho (SHÖENBEIN, 1981; STUART, 1992).

A avaliação da densidade óptica, entre os pontos de maior e menor difração gerada pelo ***ectacitômetro*-LORCA®,** determina o **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE" (ID) ou "ÍNDICE DE ELONGAÇÃO" (IE),** o qual proporciona uma medida direta da eliptocitogênese. Um valor numérico de zero significa que não há deformação, enquanto que os índices positivos são progressivamente proporcionais à deformabilidade celular (SMITH, 1979; MOHANDAS, 1983; TAKAKUWA, 1990; MOHANDAS, 1993; JOHNSON, 1994; LUX, 1996).

A ***ectacitometria*** permite a análise das células em diferentes condições de tonicidade, quando associada a um gradiente de osmolalidade. É uma técnica que permite o estudo dos diversos determinantes da deformabilidade eritrocitária, sendo possível avaliar a relação área de superfície/volume, a geometria celular, a densidade celular e a membrana citoplasmática. (JOHNSON, 1996).

A análise da deformabilidade eritrocitária pela ***ectacitometria*** é considerada **"*gold standard*"** dentre as técnicas existentes, sendo a mais importante para o diagnóstico nas patologias por defeito de membrana (MOHANDAS, 1979; KUYPERS, 1990; STREEKSTRA, 1994; JOHNSON, 1994 e 1996; LUX, 1996).

Alguns estudos clínicos em seres humanos e experimentais demonstraram que, na anemia por deficiência de ferro, a deformabilidade eritrocitária está diminuída (LEVANDER, 1978; TILLMANN, 1980; YIP, 1983; ANDERSON, 2000).

A análise do esfregaço de sangue periférico na anemia ferropriva apresenta alterações expressivas da morfologia eritrocitária. A anisocitose é o sinal mais precoce seguido do aparecimento de hemácias microcíticas e hipocrômicas, conforme o agravamento do caso. Ocorre ainda a presença de ovalócitos, eliptócitos e, mais raramente, hemácias em alvo. Eventualmente surgem a macrocitose e a policromasia. Todas essas alterações dependem do grau da anemia e do tempo de evolução do quadro (BEUTLER, 1995).

As alterações descritas acima podem estar relacionadas com as observações clínicas e laboratoriais decorrentes da diminuição da deformabilidade eritrocitária na ferropenia.

A deficiência de ferro é o distúrbio nutricional mais encontrado em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que 4 a 5 bilhões de pessoas, isto é, 66 a 80% da população mundial, apresentem algum grau de deficiência de ferro. Existem no mundo cerca de 2 bilhões de pessoas (30%) portadoras de anemia, em geral ferropriva, principalmente nos países em desenvolvimento (BEUTLER, 1995).

Essa condição deve ser considerada um problema de saúde pública de proporções epidêmicas que afeta a produtividade e o desenvolvimento econômico desses países. É também a causa mais freqüente de anemia nas consultas de Clínica Médica Geral e na Hematologia. Apesar disso, poucos e

adequados estudos têm sido realizados para entender melhor essa que é uma das doenças mais comuns no mundo (BEUTLER, 1995; LEE, 1999).

Nos últimos anos foram descritos casos de tromboses cerebrais associados à anemia ferropriva, em especial nas crianças. Alguns trabalhos relatam como provável causa a diminuição da deformabilidade eritrocitária, com conseqüente alteração reológica do sangue na microcirculação (STEHLE, 1991; SUTOR, 1995; AKINS, 1996; HARTFIELD, 1997; MEENA, 2000; CHAN, 2000).

Alguns autores sugerem que, na anemia por deficiência de ferro, ocorra uma redução na sobrevida da hemácia microcítica e hipocrômica e que um dos principais fatores seria sua menor flexibilidade. Esta estaria relacionada com o menor conteúdo interno de hemoglobina e uma desfavorável relação superfície/volume da célula. Estes glóbulos seriam prematuramente seqüestrados durante a sua passagem pelo baço ou pelo sistema retículo-endotelial (TILLMANN, 1980; REINHART, 1992; ANDERSON, 2000).

Após revisão da literatura disponível, verificamos uma escassez de estudos de deformabilidade eritrocitária em anemia ferropriva. É importante destacar que não foram encontrados relatos utilizando os modernos métodos de contagem eletrônica e o estudo dinâmico da deformabilidade eritrocitária por ***ectacitometria***, nas anemias por deficiência de ferro em nosso meio. A combinação dos resultados desses modernos recursos deverá ser uma contribuição para o melhor entendimento dessa doença e suas complicações.

2. Objetivos

Os objetivos dessa pesquisa são:

2.1. Determinar a deformabilidade eritrocitária de pacientes com anemia por deficiência de ferro através da **técnica da ectacitometria**, antes do tratamento com sais de ferro.

2.2. Reavaliar os pacientes após a terapêutica.

2.3. Procurar relacionar os resultados encontrados no estudo com alguns determinantes da deformabilidade eritrocitária (geometria celular e viscosidade citoplasmática).

2.4. Procurar relacionar os resultados de deformabilidade eritrocitária com a gravidade da anemia.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Deformabilidade eritrocitária

Os glóbulos vermelhos são corpúsculos de pequeno tamanho, o que torna difícil a avaliação precisa dos fatores que agem na sua deformabilidade e o perfeito entendimento da sua geometria. Em conseqüência disso, os progressos na ***reologia eritrocitária***, ciência que estuda a deformação e o fluxo do sangue, não têm sido fáceis. Uma revisão histórica mostra que a determinação das propriedades da membrana celular e do conteúdo citoplasmático não pode ser analisada do ponto de vista estritamente matemático e teórico. Pelo contrário, alguns métodos físicos e biológicos são utilizados para entender as alterações sofridas pelo eritrócito no processo de deformação "*in vivo*" ou "*in vitro*".

Acredita-se que a propriedade de deformabilidade dos glóbulos vermelhos foi reconhecida pela primeira vez por PONDER, em 1930, que observou que a célula podia ser submetida à edema osmótico até certo volume, na dependência da área de superfície da membrana celular. No entanto, somente após a descrição da geometria celular como um disco bicôncavo, onde existe um excesso de superfície em relação ao seu volume, é que foi possível iniciar o entendimento do processo de deformação do eritrócito (EVANS, 1986).

Em 1970, WEED chamou atenção para o importante papel da deformabilidade na sobrevida das hemácias nos cento e vinte dias em que permaneciam na circulação. Relacionou a deformabilidade com a geometria celular, fluidos internos, em especial a hemoglobina, e propriedades intrínsecas da membrana eritrocitária.

Segundo WEED (1970), a sobrevida da hemácia estava diretamente relacionada com a perda da sua deformabilidade. Esses achados foram postulados também por LA CELLE & JACOB (apud MOHANDAS, 1979).

MOHANDAS et al (1979) apresentaram um estudo detalhado dos fatores que interferiam na deformabilidade eritrocitária em anemias hemolíticas. A inabilidade em deformar-se tornaria difícil, senão impossível, a função de fornecimento de oxigênio por parte dos eritrócitos nos capilares com diâmetro menor do que a hemácia.

Os fatores determinantes da deformabilidade eritrocitária foram estudados por diversos autores. A geometia celular, a viscosidade do fluido intracelular e as propriedades físicas intrínsecas da membrana eritrocitária foram apontados como responsáveis por esse complexo fenômeno (MOHANDAS, 1979; CHIEN, 1981; REINHART, 1990).

Alguns autores sugeriram que a flexibilidade, deformabilidade e durabilidade dos glóbulos vermelhos dependiam do citoesqueleto da membrana celular e que defeitos na sua estrutura eram responsáveis por anemias hemolíticas (EVANS, 1981).

Diversos estudos em sangue estocado mostraram decréscimo na deformabilidade eritrocitária. A perda de lípides da membrana causa a redução da relação superfície/volume dos glóbulos armazenados e conseqüente alteração da geometria celular. Tal fato tem muita importância, pois ocorre esferocitose acentuada e aumento da fragilidade osmótica (MOHANDAS, 1982).

FORTIER et al (1988) sugeriram que o dano oxidativo induzido em eritrócitos "*in vitro*" resultou no aumento da rigidez da membrana como conseqüência da geração de complexos protéicos entre a hemoglobina e a espectrina.

CHASIS e SCHRIER (1989) estudaram a interrelação entre deformabilidade e capacidade de alterar a forma dos eritrócitos com agentes

que tornavam a membrana mais rígida, como os anticorpos monoclonais anti-glicoforina A. Concluíram que o decréscimo da deformação da membrana não implica necessariamente incapacidade de alteração na geometria da célula.

O declínio na deformabilidade que ocorre durante o processo de envelhecimento dos glóbulos vermelhos parece ser maior do que se imaginava. Isto resulta no aumento da concentração de hemoglobina (CHCM) e no decréscimo da elasticidade da membrana (BOSCH, 1994).

SALBAS (1994) estudou voluntários sadios e idosos fumantes e encontrou a deformabilidade eritrocitária diminuída neste último grupo. Além do conhecido decréscimo da deformação dos glóbulos vermelhos do idoso, sugeriu que a depleção de ATP intra-eritrocitário poderia estar relacionada com esses achados.

KUMARAVEL e SINGH (1995), estudando pacientes portadores de hanseníase, observaram que a deformabilidade eritrocitária era aumentada. Porém, na presença de anemia, o decréscimo de hemoglobina e as alterações protéicas e lipídicas na membrana podiam diminuir a deformabilidade celular.

Alguns estudos recentes avaliaram o efeito de agentes medicamentosos na deformabilidade eritrocitária. A pentoxifilina, por exemplo, não mostrou interferência no processo, quando estudada pela ectacitometria, ao contrário do que se havia verificado através da técnica de filtração (CUMMINGS, 1992).

O magnésio oral melhorou a deformabilidade de eritrócitos em pacientes portadores de Anemia Falciforme, provavelmente reduzindo a quantidade de células densas (FRANCESCHI, 1997).

Os agentes anestésicos halogenados mostraram prejudicar a deformabilidade eritrocitária em ratos, possivelmente por aumento do dano oxidativo e formação de radicais livres (YESILKAUA, 1998).

A hidroxiuréia induziu alterações na geometria eritrocitária, aumentando o volume e a superfície de membrana celular nos pacientes

portadores de síndromes mieloproliferativas (ENGSTRÖEM, 1998).

3.2. Métodos de avaliação da deformabilidade eritrocitária

A importância clínica da deformabilidade dos glóbulos vermelhos foi aumentando à medida que as técnicas de avaliação dessa propriedade foram surgindo. Cada metodologia parece ser influenciada por um ou mais dos diferentes fatores que interferem na deformabilidade eritrocitária. As principais técnicas conhecidas descritas são: a ***aspiração*** por micropipeta, a ***filtração*** e os ***métodos viscosimétricos***, como a ***reoscopia*** e a ***ectacitometria***.

3.2.1. Aspiração por micropipeta

Consiste na aplicação de uma pressão negativa de aspiração, a qual promove a entrada de parte da membrana ou de todo glóbulo vermelho na micropipeta (FIGURA 1). Quando se usa micropipeta de 3μ de diâmetro, o eritrócito é completamente aspirado dependendo da geometria celular e da relação superfície/volume. Entretanto, se o diâmetro é de 1μ, a avaliação depende somente das propriedades intrínsecas do material da membrana. A viscosidade interna tem pouco efeito nessa técnica e as células são avaliadas individualmente, dificultando sua aplicação na prática (MOHANDAS, 1979).

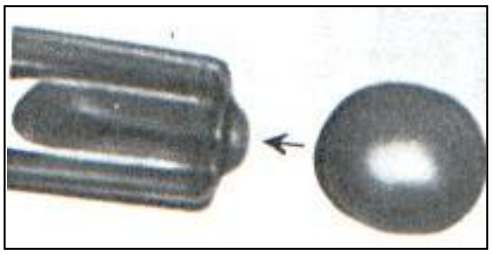


Figura 1 - Fotomicrografia de eritrócito humano aspirado por micropipeta (modificado de Evans et al - 1986).

STUART (1985), em artigo de revisão de ***reologia eritrocitária***, analisou as diversas técnicas de avaliação da deformabilidade. Em relação ao uso de micropipetas, observou que a limitação dessa técnica está na incapacidade de detectar sub-populações alteradas, uma vez que analisa a célula isoladamente.

3.2.2. Filtração

Nessa técnica, tanto o tempo necessário para a passagem de uma certa quantidade de glóbulos vermelhos através de filtros, como a pressão exercida no processo podem ser medidos (FIGURA 2). Com filtros de microporos de 3 a 5 μm, as medidas são adequadas para a avaliação da geometria celular e das propriedades da membrana, porém mostram-se pouco sensíveis às alterações da viscosidade intra-eritrocitária. A principal vantagem dessa técnica é a simplicidade. A desvantagem é a influência de vários fatores interferentes, como as propriedades dos filtros. A impossibilidade de avaliar se toda, ou apenas uma população de células encontra-se alterada, é um fator limitante no uso dos filtros (LEBLOND,1981; MOHANDAS, 1979).

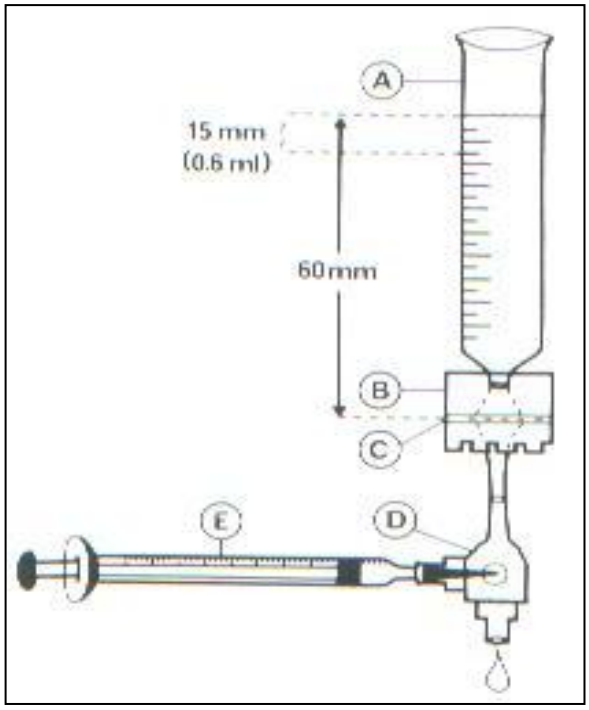


Figura 2 - Diagrama de filtração : A - tampão e amostra; B - filtro de microporos; C - membrana; D- válvula; E - seringa de aspiração de ar (modificado de Leblond et al - 1981).

LEBLOND e COULOMBE (1979) chamaram atenção para a interferência dos reticulócitos na técnica de filtração, em especial nas anemias hemolíticas. Relataram que os reticulócitos imaturos podiam ser dez vezes mais rígidos que os eritrócitos maduros circulantes, prejudicando os resultados das análises.

Em 1981, foi realizado o Simpósio Internacional na Faculdade de Medicina e Laboratório de Biologia Experimental da Universidade de Gothemburg (Suécia), com a finalidade de estudar a ***filtração*** e

deformabilidade dos glóbulos vermelhos. Ficou estabelecido que tanto os filtros como outras técnicas disponíveis na época explicavam parcialmente o que ocorria na microcirculação (BRANEMARK, 1981).

Em 1981, BOISSEAU descreveu diversos fatores, além dos anteriormente citados, que influenciavam na filtragem de eritrócitos. Entre eles destacou o tipo de filtro, a obstrução com leucócitos e plaquetas, a temperatura, a osmolaridade, o tipo de anticoagulante, fatores plasmáticos como fibrinogênio, fator VIII e globulinas anormais.

3.2.3. Métodos viscosimétricos

Consistem na utilização de um instrumento denominado ***viscosímetro***. Esse dispositivo utiliza uma suspensão de glóbulos vermelhos colocada em recipiente de vidro rotatório, e submetida a progressivas *" shear stresses "*. O fluxo gerado alinha as células paralelamente, no mesmo sentido, e altera sua forma de discóide para elipsóide.

HOCHMUTH et al, em 1972, avaliaram a deformabilidade de eritrócitos de adultos normais, através de um aparelho de fluxo definido, acoplado a um microscópio. Os resultados mostraram que ocorria deformação quando se aplicava baixa tensão de " *shear stress* " (menos de 10 dinas/cm^2) .

Em 1981, MEISELMAN relatou que eritrócitos podiam ser estudados pela técnica da ***reoscopia*** (FIGURA 3). Era possível visualizar diretamente, em microscópio invertido, as modificações das células quando submetidas a *"shear stress"*.

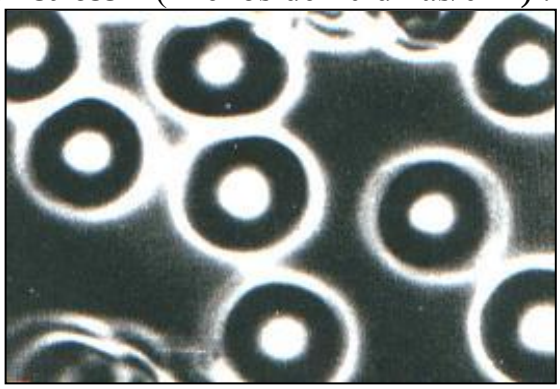


Figura 3 - Fotografia de contraste de fase de eritrócitos humanos 1250X (modificado de Evans et al - 1981).

SCHÖENBEIN e GAEHTGENS (1981) utilizaram um ***reoscópio*** e concluiram que a deformação dos

eritrócitos num fluxo dependia mais da viscosidade do que da sua elasticidade. A fluidez do citoplasma e uma favorável relação superfície/volume são importantes na sua deformação.

A medida indireta da deformação eritrocitária em função da força aplicada no campo de fluxo laminar pode ser mensurada pela técnica da ***ectacitometria*** (do grego ***ekta*** = alongamento). Devido à importância dessa técnica para o presente estudo, será abordada com maiores detalhes.

3.3. Ectacitometria

Em 1946, PIJPER observou acidentalmente o fenômeno físico da difração de um feixe de luz branca através de uma lâmina de esfregaço fino de sangue periférico. Verificou que eram emitidos círculos de espectros coloridos de vermelho, amarelo e violeta. A forma e a cor eram características para cada doença. Estudou principalmente a anemia megaloblástica e um quadro de icterícia associada a hemólise familiar, o qual provavelmente se tratava de esferocitose hereditária (PIJPER, 1947).

SCHÖENBEIN e WELLS (1969) verificaram que os eritrócitos dispersos em meio de alta viscosidade possuíam as propriedades semelhantes às de gotas fluidas. Submetidos a altos valores de "*shear stress*", adotavam a forma elíptica com o maior eixo paralelo ao fluxo. Os autores sugeriram que, nessas condições, a membrana se tornava liquefeita e gelatinosa e permitia a transmissão do "*shear stress*" para o interior da célula. Para explicar esse fenômeno, apresentaram a ***fórmula de Taylor***, descrita para deformação de fluidos comuns: D = L-B / L+B, onde D é a deformação, L e B são o comprimento e a largura do elipsóide, respectivamente. Essa propriedade foi posteriormente utilizada por BESSIS e MOHANDAS (1975) no desenvolvimento da ***ectacitometria*** (BESSIS,1975).

BESSIS e MOHANDAS (1974), trabalhando no Instituto de Patologia Celular de Paris, relataram os princípios do protótipo de um novo ***difratômetro***. O aparelho era composto de dois cilindros concêntricos de vidro, sendo o interno fixo. Um feixe de LASER passava perpendicularmente ao espaço entre os cilindros, preenchido por uma solução viscosa, contendo a amostra de sangue a ser analisada. As imagens de difração eram circulares e tornavam-se elípticas à medida que ocorria a sua deformação (FIGURA 4).

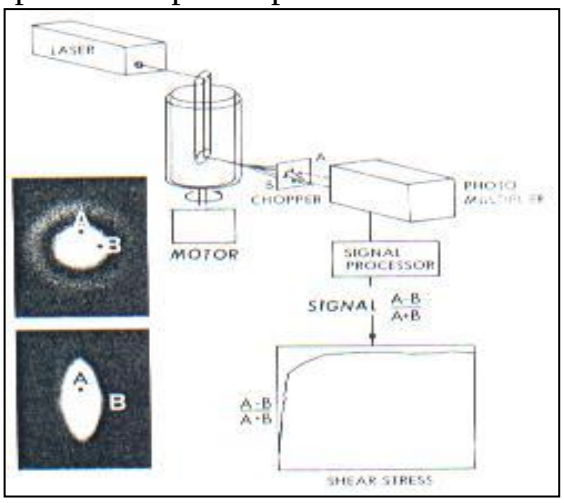


Figura 4 - Diagrama do ectacitômetro com sistema de análise de imagens automático. A e B são os pontos fotometricamente monitorados (modificado de Johnson - 1994).

Uma fórmula que utilizava o "*shear stress*", a viscosidade do meio e o diâmetro da difração, antes e após o teste, permitia o cálculo da deformabilidade eritrocitária (BESSIS e MOHANDAS, 1974).

Em 1975, BESSIS e MOHANDAS aperfeiçoaram o difratômetro e o empregaram pela primeira vez o nome de ***ectacitômetro***. Chamaram a atenção para a sensibilidade desse método em detectar e quantificar pequenas populações de células indeformáveis. Mostraram curvas de comprimento versus "*shear stress*" de hemácias normais, esferócitos, equinócitos e estomatócitos humanos, além de casos de anemia hemolítica induzida em ratos. Observaram que a deformabilidade era função do "*shear stress*" aplicado e da diferença entre a viscosidade interna e externa das células. Descreveram os três fatores envolvidos na deformabilidade eritrocitária: a forma, a viscosidade da hemoglobina e a rigidez da membrana. Afirmaram que a deformabilidade era um determinante maior na ***reologia eritrocitária***, a qual permitia a sobrevida normal dos eritrócitos na circulação.

SMITH et al (1979) estudaram a deformabilidade eritrocitária através da ***ectacitometria*** em vários mamíferos e mostraram que, em várias espécies,

as hemácias normais deformavam menos, enquanto que em outras (camelos e lhamas), a sua orientação era paralela ao fluxo laminar, apesar dos eritrócitos serem elípticos.

STOLTZ et al (1981) apresentaram um importante estudo teórico e experimental para testar e validar o ***viscosímetro*** descrito por BESSIS e MOHANDAS, em 1975. Com fórmulas matemáticas de óptica calcularam o espectro de luz em diferentes *"shear stresses"* e a orientação dos elipsóides.

KELLER e SKALAK (1982) estudaram, em teoria, a mobilidade do eritrócito em forma de "***passada de tanque de guerra***", quando submetido a algum *"shear stress"*. A hemácia assumiria forma e orientação estacionária enquanto a membrana e o conteúdo celular desenvolveriam um movimento em "passada de tanque de guerra". Assim, de acordo com esses autores, esse movimento poderia ser explicado por três fatores: 1) razão entre o maior e menor eixo do elipsóide; 2) índice de esferocidade; 3) razão entre a viscosidade do líquido interno e externo.

CLARK et al (1983) submeteram pela primeira vez amostras de sangue ao método da ***ectacitometria*** em meios de osmolalidades diferentes. Observaram que cada doença apresentava um perfil diferente quando se analisava a curva de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** versus osmolalidade. Sugeriram que esse recurso fornecia informações importantes sobre o conteúdo de água e área de superfície das células. Além disso, relataram que a viscosidade intracelular dependente do CHCM era um fator preponderante na avaliação da deformabilidade eritrocitária.

Em 1987, TAY et al apresentaram um algorítmo teórico para estimar as alterações nas membranas e na pressão interna dos glóbulos vermelhos quando submetidos a *"shear stress"*. Basearam seus estudos no modelo de "***tanque de guerra***", descrito por SCHÖNBEIN em 1969, e concluiram que a pressão interna se acumulava lentamente enquanto a célula aumentava a sua

elongação, sendo esse acréscimo mais evidente quando estava próxima de atingir o seu limite geométrico como elipsóide.

Nos últimos dez anos, alguns autores se preocuparam em validar o método da ***ectacitometria*** com bases teóricas de óptica e concluiram que ele é de extrema utilidade no estudo da deformabilidade e ***reologia*** dos glóbulos vermelhos do sangue (STEEKSTRA et al, 1993, 1994).

JOHNSON (1994) relatou o histórico do aparelho, seus princípios e análise dos resultados nas principais alterações dos glóbulos vermelhos. O autor comparou a ***ectacitometria*** com outras técnicas de estudo de deformabilidade eritrocitária e se tornou leitura obrigatória para estudiosos da ***hemorreologia*** .

Em 1996, JOHNSON fez uma revisão de pacientes submetidos à ***ectacitometria*** osmótica (**OSMOSCAN**) pelo aparelho da Technicon Instruments®. Os dados de dez anos de investigação de anemias hereditárias no Hospital Infantil de Michigan foram coletados. As curvas obtidas através do **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** versus osmolalidade foram diagnósticas na esferocitose, eliptocitose, piropoiquilocitose e deficiência enzimática da via glicolítica. Nas hemoglobinopatias e defeitos de permeabilidade da membrana, o **"OSMOSCAN"** é anormal, mas não é conclusivo. O autor chamou atenção para a pequena quantidade de sangue necessária para o teste. A rapidez com que é efetuado depende de um operador experiente e interessado, pois a manutenção do aparelho requer cuidados especiais. O autor recomendou o uso da ***ectacitometria*** para o diagnóstico clínico na rotina hematológica e não apenas para pesquisa.

BASKURT e MEISELMAN (1997) submeteram os glóbulos vermelhos ao calor, glutaraldeído e peróxido de hidrogênio, a fim de alterar a geometria. Confirmaram a diminuição da deformabilidade eritrocitária através do aparelho **LORCA®**,em comparação com o grupo controle.

3.4. Doenças com alteração da deformabilidade eritrocitária

MOHANDAS et al (1979) utilizaram a ***ectacitometria*** e analisaram com detalhes a deformabilidade eritrocitária nas anemias hemolíticas. Sugeriram que no desenvolvimento das anemias, a hemácia tornava-se progressivamente menos deformável, sendo gradualmente seqüestrada pelo sistema retículo-endotelial, em especial no baço. Relataram a redução da deformabilidade eritrocitária na esferocitose hereditária, já constatada por vários autores utilizando técnicas de ***filtração***, ***micropipeta***, ***viscometria*** e ***ectacitometria***.

Na anemia falciforme mostrou redução na aspiração e na filterabilidade das hemácias falcizadas oxigenadas. Os estudos com ***ectacitometria*** demonstraram a formação de um halo elipsoidal anormal, vertical ao fluxo, o qual correspondia às células irreversivelmente falcizadas. Na hemoglobinopatia C, observa-se redução da deformabilidade através da filtração e da ectacitometria. O elevado CHCM acarretava o aumento da viscosidade interna, que associado às alterações da membrana, era responsável pelos resultados (MOHANDAS, 1979).

A deformabilidade eritrocitária diminuida foi relatada ainda em talassemias e deficiência de glicose -6-fosfato desidrogenase, através dos métodos de micropipeta e ectacitometria. Nas alterações de volume da hemácia, ocorria diminuição da deformabilidade por filtração ou ectacitometria, tanto pela redução da relação superficie/volume na estomatocitose, como pelo aumento do CHCM e, portanto, da viscosidade interna na xerocitose (MOHANDAS, 1979).

A redução de deformabilidade por técnicas de ***filtração***, ***viscometria*** e ***ectacitometria*** foi também descrita nas anemias por cirrose alcoólica, abetalipoproteinemia, piropoiquilocitose, pós-diálise e deficiência de piruvato- quinase (MOHANDAS, 1979).

Um ano depois, o mesmo autor mostrou que a redução da relação superfície/volume e o aumento da viscosidade interna eram fatores responsáveis pelas alterações na deformabilidade de hemácias esferocíticas, quando estudadas pela ***ectacitometria***, em diferentes osmolalidades (MOHANDAS, 1980).

Em 1992, MOHANDAS observou que a combinação das propriedades da membrana permitia ao glóbulo vermelho vigorosa deformação sem fragmentação. O conteúdo de espectrina teria pouca influência na deformabilidade, que dependia também de alterações quantitativas da banda 3, anquirina e proteína 4.2 e qualitativas da banda 3 .

LANGENFELD et al (1994) mostraram diminuição da deformabilidade eritrocitária em ratos com septicemia (filtração). Esses autores sugeriram que isso se devia à presença de radicais livres e ao dano oxidativo das hemácias.

SILVEIRA et al (1997) estudaram amostras de sangue de dezoito pacientes portadores de eliptocitose hereditária. Encontraram em todos a deformabilidade eritrocitária diminuida. Apesar das alterações de forma, relação superfície/volume, microcitose e desidratação celular, a rigidez da membrana foi responsabilizada pelo decréscimo da deformação, pois podia ser constatada em todas as amostras .

3.5. Deformabilidade eritrocitária em anemia ferropriva

CARD e WEINTRAUB (1971) descreveram a ***filtração*** eritrocitária prejudicada em coelhos com deficiência de ferro e sugeriram a sua participação na patogênese da hemólise que ocorria nesses casos.

LEVANDER e MORRIS (1978) apresentaram importante relato experimental em ratos deficientes em ferro. O autor demonstrou que a filtração estava diminuída e sugeriu que isso poderia explicar, em parte, a

esplenomegalia congestiva e o componente hemolítico descritos na anemia ferropriva.

Em 1979, HUTTON afirmou que a diminuição da deformabilidade eritrocitária observada na deficiência de ferro, descrita anteriormente por CARD (1971) e LEVANDER (1978), poderia estar relacionada com uma síndrome de hiperviscosidade secundária.

As propriedades ***reológicas*** dos eritrócitos de quatorze pacientes com anemia ferropriva foram estudadas por TILLMANN et al, em 1980. Com o uso de filtros de policarbonato de 5μm de diâmetro, concluiram que a diminuição da deformabilidade eritrocitária dependia somente da desfavorável relação entre a área de superfície/volume do micrócito. A viscometria da suspensão de "*ghosts*" (membrana eritrocitária sem conteúdo citoplasmático) mostrou uma flexibilidade normal. Entretanto, como o conteúdo de hemoglobina estava diminuído, havia maior fluidez no interior das células, pois ela estaria ligada à membrana citoplasmática. Observaram que a viscosidade estava discretamente aumentada em baixo "*shear stress*" e normal nos valores intermediários e altos. Sugeriram que a menor deformabilidade dos micrócitos em baixo "*shear stress*" não estava presente nas taxas mais altas devido ao aumento de fluidez da hemoglobina intracelular nessas condições. A diminuição da deformabilidade eritrocitária observada *"in vitro"* explicava a menor sobrevida da hemácia *"in vivo"*.

YUP et al (1983) encontraram a deformabilidade eritrocitária diminuída em seres humanos e também em ratos deficientes em ferro. A principal causa apontada pelos pesquisadores foi a rigidez da membrana citoplasmática, mais do que a relação superfície/volume ou a viscosidade intracelular. Os estudos bioquímicos sugeriam que o dano oxidativo da membrana poderia, em parte, ser responsável pelo decréscimo da deformabilidade dos eritrócitos. Observaram ainda que, em baixo "*shear stress*", o **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** estava prejudicado, mas, à medida que ele aumentava, a

curva se aproximava da normalidade. Afirmou também que a redução da deformação era proporcional à severidade da ferropenia.

Em 1992, REINHART relatou que a influência da deficiência de ferro na deformabilidade dos eritrócitos era controversa. O autor estudou quatorze pacientes com anemia ferropriva documentada, por três métodos diferentes: ***filtração***, ***elongação*** e ***medida da elasticidade da membrana***. Concluiu que a deformabilidade não era afetada pela deficiência de ferro, e que a microcitose até facilitaria a passagem através dos filtros de finos poros. Evocou a participação de outros mecanismos na microcirculação para explicar a redução de sobrevida de eritrócitos na ferropenia.

ANDERSON et al (2000) estudaram pacientes com deficiência de ferro por ***ectacitometria***. Confirmaram os estudos dos autores que encontraram a deformabilidade diminuida em pacientes com estoque de ferro inadequado. O risco de hiperviscosidade paradoxal e a reversão do quadro com suplementação de ferro são enfatizados por esses autores.

3.6. Anemia ferropriva e trombose

ROUDAUT et al (1981) apresentaram estudo de cem pacientes portadores de trombose cérebro-vascular pela técnica de ***filtração***, e encontraram a deformabilidade eritrocitária alterada em todos. Apesar de sugerir a ligação de produtos da fibrina em eritrócitos na área trombótica, apontam para a necessidade de estudos com outros métodos.

STHELE et al (1991) descreveram um caso de trombose não infecciosa de seio sagital superior e mais quatro casos de trombose de veias cerebrais em pacientes portadores de anemia ferropriva. Na época, atribuiram esses achados apenas a uma coincidência.

AKINS et al (1996) relataram anemia por deficiência de ferro e trombose de artéria carótida em mulheres. Ressaltaram a associação entre

anemia ferropriva e papiledema, hipertensão intracraniana idiopática e isquemia cerebral.

Em 1997, HARTFIELD et al descreveram a associação de anemia ferropriva e quadros de acidente vascular isquêmico em seis crianças, de seis a dezoito meses. Afirmaram que não se tratava de uma coincidência, e que a deficiência de ferro poderia provocar a redução da deformabilidade das hemácias, aumentando a viscosidade sangüínea.

MEENA et al (2000) relataram um caso de anemia ferropriva associada à trombose de seio venoso cortical, a qual regrediu após a terapêutica de suplementação com ferro.

CHAN e VEBER (2000) estudaram os distúrbios pró-trombóticos em acidentes vasculares isquêmicos em crianças e citaram a anemia ferropriva como um dos fatores encontrados por diversos autores nesses casos. A deficiência de ferro e conseqüente redução da deformabilidade produzia um aumento na viscosidade sangüínea e provável estado de hipercoagulabilidade. Relataram que existem, descritos na literatura, cerca de vinte casos de acidente vascular isquêmico associado à deficiência de ferro. O tratamento precoce é fundamental nesses casos.

KACER et al (2001) relataram dois casos de oclusão da veia central da retina e neuropatia não arterítica isquêmica do nervo óptico, associado à anemia ferropriva leve. O decréscimo na deformabilidade e a hipóxia secundária são fatores importantes apontados pelos autores. Dessa forma, os autores alertam os clínicos de todas as especialidades, para o diagnóstico precoce das manifestações oftalmológicas que podem estar associadas à ferropenia.

Como a anemia por deficiência de ferro é comum e os distúrbios relatados acima extremamente graves e muitas vezes fatais, é necessária uma maior vigilância de sintomas neurológicos e oculares nesses doentes. O

tratamento precoce e eficaz reverte facilmente a anemia ferropriva, sendo fundamental na prevenção de complicações que podem ser evitadas.

A revisão da literatura inspirou e estimulou o estudo da deformabilidade eritrocitária em pacientes portadores de anemia ferropriva, com o uso da ***ectacitometria***. Observa-se que existem ainda várias controvérsias entre os autores que estudam o tema proposto. É importante ressaltar, ainda, que todos os trabalhos citados foram realizados no exterior e que não foram encontrados similares em nosso meio.

4. Casuística e métodos

4.1. Amostra

Foram avaliados 21 pacientes com anemia ferropriva acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hemonúcleo de Santos- SP, no período de 01 de outubro de 2000 a 20 de novembro de 2001.

Os critérios de inclusão foram: a presença de anemia (Hb < 12,0 g / dl) e ferropenia documentada através das dosagens de ferro sérico (< 75 µg / dl); capacidade total de ligação de ferro no plasma (> 250 µg / dl); saturação de ferro (< 20%) e ferritina (< 24 ng / dl para homens e < 11 ng / dl para mulheres). Os pacientes com hemoglobinopatia associada foram excluídos.

Após a obtenção do consentimento informado, os doentes foram submetidos a anamnese e exame físico completo. Todos foram submetidos a coleta de exames antes e depois do tratamento, os quais foram realizados no Laboratório de Hematologia da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- USP/ Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo.

Uma população normal de 21 doadores de sangue, por aférese, foi escolhida para ser o grupo controle.

4.2. Análise estatística

Utilizou-se neste estudo um nível de significância de 5% (cinco por cento). Para a rejeição da hipótese de nulidade aceitou-se, portanto, um valor para “alfa” de 0,05 ou 5%.

Os testes utilizados para a comparação das médias entre as variáveis contínuas estudadas (TABELAS 2, 3 e 4) foram baseados nos estudos de

Gosset, que desenvolveu a distribuição teórica de probabilidades denominada **“ *t de Student* ”**. Todas as médias foram comparadas utilizando-se este teste estatístico paramétrico (BAILAR, 1992; BUSSAB,1987).

Para a correlação entre as variáveis estudadas, utilizou-se o método gráfico de elaboração de diagramas de dispersão com a construção das retas de correlação linear .

Para todos os testes de hipóteses utilizou-se, o programa ***Excel*** (software de planilha eletrônica da Microsoft®).

4.3. Coleta de sangue

Os exames foram realizados antes e após o tratamento convencional para Anemia Ferropriva.

As amostras de sangue foram colhidas em jejum de 8 horas, da seguinte maneira: após antissepsia do antebraço, foram retirados cerca de 13 ml de sangue, sendo 3 ml colocados em EDTA e 10 ml em tubo seco estéril.

Os testes foram realizados cerca de 4 horas após a coleta do material. O tubo com sangue anti-coagulado foi utilizado para realização de hemograma completo e contagem de reticulócitos no aparelho H•3® (Bayer), eletroforese de hemoglobina e ***ectacitometria*** no Aparelho LORCA®.

O tubo seco foi centrifugado e o soro separado para estudo do perfil de ferro, que compreendeu a dosagem do ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro, saturação de ferro e dosagem de ferritina.

4.4. Hemograma pelo sistema hematológico H•3 RXT®.

O processo de análise do aparelho H•3 RXT® Technicom da BAYER® baseia-se na dispersão de luz. Fornece parâmetros de glóbulos vermelhos e índices de alta confiabilidade em todo o intervalo da normalidade e

anormalidade. A avaliação dos reticulócitos, célula por célula, fornece resultados em valor absoluto, porcentagem e índices.

Em relação à série eritrocítica, avalia-se a contagem de glóbulos vermelhos, nível de hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), RDW, HDW, porcentagem de hemácias macrocíticas, microcíticas, hipercrômicas e hipocrômicas, "*flags*"(alertas) morfológicos de anisocitose, microcitose, macrocitose, hipocromia e hipercromia e histogramas de distribuição de hemácias e hemoglobina.

Dois novos parâmetros disponíveis no H•3, apenas para pesquisa, são o CH e o VC. O CH ou "conteúdo de hemoglobina", que representa o peso atual ou massa de hemoglobina presente em cada hemácia. O benefício do CH é que não é afetado pelo envelhecimento da amostra, isto é, se houver um edema celular alterando o CHCM, a massa de hemoglobina permanece a mesma. As células abaixo de 28 g / dl são hipocrômicas (hipodensas), enquanto que as acima de 41 g / dl são hipercrômicas (hiperdensas). O VC ou "volume celular" medido pelo H•3 é feito individualmente. As células abaixo de 60 fentolitros são consideradas microcíticas e aquelas acima de 120 fentolitros são macrocíticas (TABELA 1).

TABELA 1 – VALORES NORMAIS DE CONTEÚDO DE HEMOGLOBINA X VOLUME CELULAR PELO H•3

HC / VC	HC < 28 fl	28 fl ≤ HC ≤ 41 fl	HC ≥ 41 fl
VC > 120 fl	0,1%	0,4%	0%
60 fl ≤ VC ≤ 120 fl	0,6%	98,1%	0,7%
VC < 60 fl	0%	0,1%	0%

HC – Conteúdo de hemoglobina; VC – Volume celular

A contagem de reticulócitos é fornecida em porcentagem e valor absoluto, além da diferenciação de acordo com o grau de maturação da célula.

Todas as amostras foram analisadas pelo autor por microscopia óptica comum, utilizando o sistema de gradação de 1+ a 4+ para avaliar os parâmetros: anisocitose, poiquilocitose, microcitose, hipocromia, macrocitose, eliptocitose, hemácias em alvo e policromasia.

4.5. Outros exames

A eletroforese de hemoglobina foi realizada pelo método de acetato de celulose em pH 9,1 para excluir a presença de hemoglobinopatia associada.

O estudo do perfil de ferro foi feito pelos seguintes métodos:

dosagem de ferro sérico - colorimétrico

capacidade total de ligação de ferro- colorimétrico (batofenantrolina)

saturação de ferro – cálculo(ferro/siderofilina)

ferritina- quimioluminescência

4.6. Ectacitometria através do LORCA®

A deformabilidade dos glóbulos vermelhos foi determinada em vários "*shear stress*" por um Ectacitômetro LORCA® (Laser-Assisted Optical Rotational Cell Analyser) versão 1.0, da RR Mechatronics, Amsterdan (FIGURA 5). Os princípios gerais e os detalhes específicos da ***ectacitometria*** foram descritos anteriormente por diversos autores (BESSIS, 1974; STOLTZ, 1981; CLARK. 1983; STEEKSTRA, 1993,1994; JOHNSON, 1996).

O instrumento consiste de um diodo a LASER, um sistema de recipientes de vidro com termostato, um motor e uma câmara de vídeo acoplada a um microcomputador. A amostra é depositada no espaço de 3mm compreendido entre os dois cilindros de vidro. O microcomputador possui um

programa especial que controla a velocidade do cilindro interno, assim como a temperatura ideal. O raio LASER é projetado perpendicularmente à amostra, e o padrão de difração, produzido pelos glóbulos vermelhos, analisados pelo computador. Os resultados são impressos para análise (FIGURA 6).

Figura 5 - Ectacitômetro LORCA® - Laboratório de Hematologia da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/ Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo.

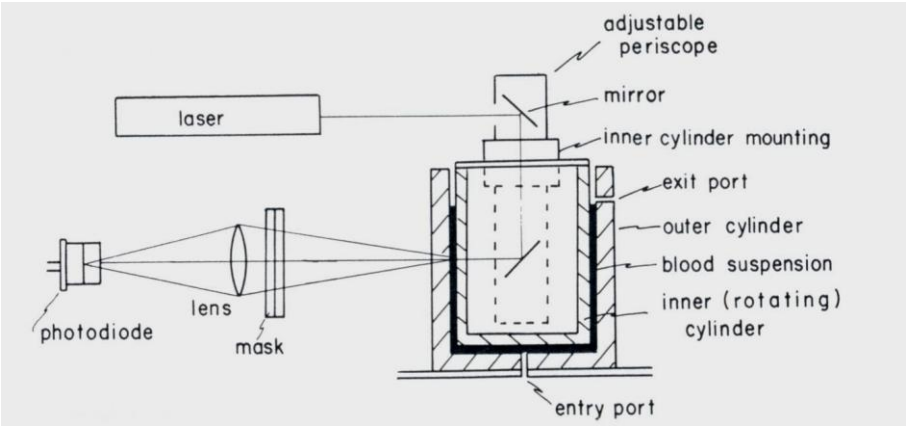


Figura 6 - Esquema do ectacitômetro (modificado de Johnson - 1989).

O **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE" (ID) ou "ÍNDICE DE ELONGAÇÃO" (IE)** é obtido conforme o diagrama abaixo. À medida que ocorre a deformação celular, o ponto A aumenta de intensidade e o ponto B diminui, correspondendo ao maior e menor eixo, respectivamente. Alterações de **ID** ou **IE** refletem mudanças da deformabilidade de células individuais.

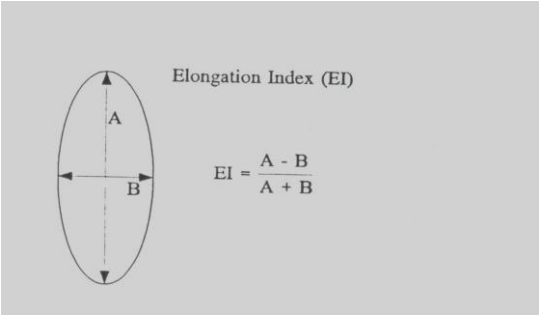


Figura 7 - Esquema do índice de deformabilidade ou elongação (modificado do manual do aparelho LORCA®).

O **ID** ou **IE** é calculado para cada diferente *"shear stress"*, em Pascais: 0,3- 0,53- 0,95- 1,69- 3,0- 5,34- 9,48- 16,86 e 30,05. Quanto maior o **ID** ou **IE,** mais deformável é o eritrócito.

As alterações da deformabilidade eritrocitária podem ser visualizadas no monitor do computador, conforme esquema abaixo.

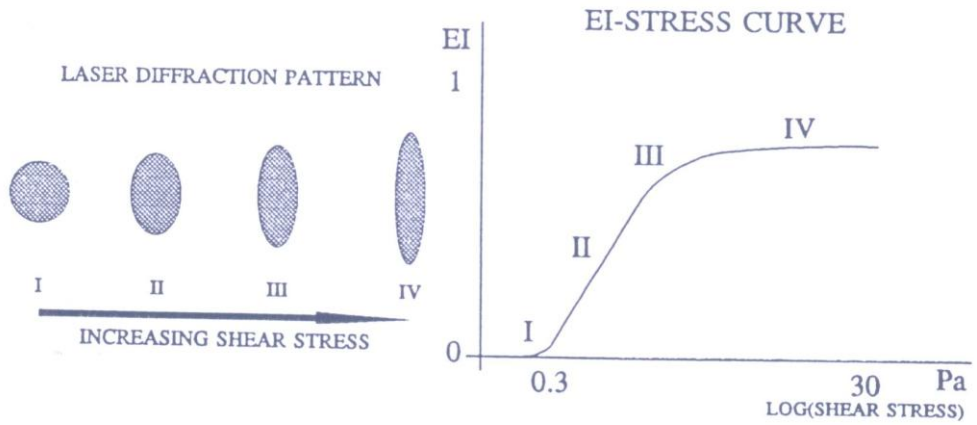


Figura 8 - Padrão de difração e alterações do índice de deformabilidade ou elongação com "shear stress" (modificado do manual do aparelho LORCA®).

4.7. Técnica utilizada

Para obter um meio viscoso, soluções com volume de 5ml de PBS em PVP a 6% e pH 6,7 foram previamente preparadas e congeladas. Essas soluções possuem osmolalidades de 150, 300 e 400 mOsm. A retirada do freezer dos tubos com a solução a ser utilizada ocorre imediatamente antes do uso, permanecendo em meio ambiente até a sua completa liquefação. As amostras foram todas analisadas aproximadamente 4 horas após a coleta.

Foram utilizados 25 microlitros de sangue anticoagulado em EDTA de um controle normal e dos pacientes em meios de osmolalidade crescentes e submetidos à técnica da ectacitometria no aparelho LORCA®. Foram obtidas curvas de deformabilidade em função do "*shear stress*" aplicado, de cada paciente, antes e após o tratamento. A seguir, os dados foram impressos para documentação e estudo comparativo.

Os resultados serão apresentados e analisados nos seguintes gráficos e tabelas.

5. Resultados

A TABELA 2 mostra os resultados dos índices hematimétricos de 21 doadores de sangue, por aférese, da Fundação Pró- Sangue/ Hemocentro de São Paulo, que constituiram o grupo controle.

A TABELA 3 mostra os resultados dos índices hematimétricos obtidos na análise de 21 pacientes portadores de anemia ferropriva antes do tratamento. Apresenta a idade dos pacientes e a sua média. Avalia os índices hematimétricos e as respectivas médias da taxa de hemoglobina em g/dl (Hb), do hematócrito em % (Ht), do volume corpuscular médio em fl (VCM), da hemoglobina corpuscular média em pg (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média em g/dl (CHCM), da porcentagem de reticulócitos, da porcentagem de hemácias microcíticas (VC< 60fl), da porcentagem de hemácias hipocrômicas (HC< 28fl) e da porcentagem de hemácias simultaneamente microcíticas e hipocrômicas (VC<60fl e HC< 28fl).

A TABELA 4 apresenta os mesmos doentes e parâmetros após o tratamento convencional da anemia ferropriva com sais de ferro.

Observa-se a melhora de todos os índices hematimétricos após a terapêutica que durou em média cinco meses (de três a sete meses).

TABELA 2 - RESULTADOS DE ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DE 21 DOADORES DE SANGUE
GRUPO CONTROLE

NOME	SEXO	IDADE (ANOS)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	RET (%)	MICRÓCITOS (%) VC<60fl	HIPOCROMIA (%) HC<28fl	MICOCITOSE+ HIPOCROMIA (%) VC<60fl e HC<28fl
M A R	M	35	15,2	43,8	91,2	31,6	34,6	0,5	0,4	0,3	0
J M F	M	28	15,1	44,6	93,5	31,6	33,7	0,6	0,3	0,8	0
L G O	M	27	15,0	46,5	98,1	31,7	32,3	0,9	0,1	1,8	0
J M S	M	20	15,0	46,8	91,0	29,2	32,1	1,1	0,6	1,0	0
A B	M	24	14,4	42,3	93,7	31,8	33,9	1,6	0,5	1,2	0
S R M	M	23	14,5	44,5	89,3	29,1	32,6	0,4	0,7	1,4	0
M G R	F	22	14,2	43,8	91,3	29,5	32,4	1,2	0,4	1,4	0
N A S	F	25	14,1	41,9	92,2	31,1	33,7	0,8	0,3	2,0	0
A C R	M	32	15,0	45,0	93,7	31,2	33,3	0,5	0,5	0,8	0
A F A	M	35	17,1	53,2	94,4	30,3	32,1	1,0	0,3	1,1	0
L C M	M	32	14,6	44,3	91,2	30,1	33,0	0,6	0,4	1,0	0
M B A	M	34	14,3	43,8	90,9	29,7	32,7	2,0	0,4	0,2	0
M C C	F	26	15,0	49,1	93,2	28,6	30,7	1,2	0,4	1,6	0
W C S	M	34	15,5	49,6	94,8	29,6	31,3	1,6	0,3	1,5	0
J Z F	M	33	16,0	51,3	97,0	30,2	31,2	1,3	0,1	1,0	0
V A S	M	35	15,2	53,9	95,4	26,8	28,1	1,0	0,2	0,9	0
J C R	M	30	14,5	47,8	90,6	27,6	30,5	0,8	0,5	2,8	0
G F C	M	29	14,9	46,3	93,5	30,0	32,1	1,3	0,3	0,4	0
L C F	M	23	15,5	46,5	93,0	31,0	33,3	0,1	0,3	0,7	0
J R S	M	30	14,2	39,5	91,6	33,0	36,0	1,1	0,7	0	0
W C	M	33	15,2	46,5	98,0	33,2	32,6	0,8	0,1	2,6	0
MÉDIA		29,05	14,98	46,24	93,22	30,33	32,49	0,97	0,37	1,17	0,00
DP		4,83	0,69	3,63	2,43	1,61	1,63	0,45	0,17	0,72	0,00

F – SEXO FEMININO; M – SEXO MASCULINO; Hb – HEMOGLOBINA; Ht – HEMATÓCRITO; VCM – VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO; HCM – HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA; CHCM – CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA; RET- RETICULÓCITO; DP – DESVIO PADRÃO

TABELA 3 - RESULTADOS DE ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DE 21 PACIENTES PORTADORES DE AMEMIA FERROPRIVA PRÉ TRATAMENTO

NOME	SEXO	IDADE (ANOS)	HB (g/dl)	HTO (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	RET(%)	MICRÓCITOS (%) VC<60fl	HIPOCROMIA (%) HC<28fl	MICOCITOSE+ HIPOCROMIA (%) VC<60fl e HC<28fl
A B	F	15	10,5	37,0	86,9	24,8	28,5	1,0	1,6	26,2	0,1
J R B	F	22	7,4	28,5	68,4	17,8	26,1	1,4	27,8	67,9	5,6
M J N	F	52	6,7	27,3	68,8	16,8	24,4	2,0	27,7	79,0	8,4
R C F	F	52	9,4	34,0	84,7	23,3	27,5	0,6	9,7	47,5	0,8
M E F C	F	46	9,4	30,9	75,0	22,8	30,4	0,4	8,9	21,4	0,3
E G O	F	49	6,2	23,5	65,7	17,4	26,5	1,2	32,6	63,9	9,3
T S C	F	17	9,5	32,8	78,5	22,7	29,0	1,1	9,5	36,3	0,4
M O	F	55	9,6	33,5	74,0	21,3	28,7	0,9	15,7	32,1	0,6
M A C S	F	46	9,3	34,3	66,2	18,0	27,2	0,9	33,0	51,6	5,0
N L	F	42	9,3	33,4	77,3	21,4	27,7	1,0	9,5	40,9	0,5
R L	F	37	9,6	34,7	83,0	22,9	27,6	1,3	4,9	42,6	0,3
N M	F	64	8,8	32,6	80,0	21,5	26,9	1,0	6,6	55,0	1,1
J S	F	46	7,8	27,5	79,7	22,6	28,3	0,9	6,0	40,0	0,4
A F R	F	33	10,0	35,7	84,7	23,6	27,9	0,6	3,5	45,9	0,4
R T V	M	15	11,0	36,8	82,9	24,8	30,0	1,1	2,9	32,9	0,1
G M S	M	46	10,6	31,6	79,8	26,8	33,6	1,2	6,4	35,3	0,9
S P P	F	73	8,2	30,6	81,5	21,7	26,7	0,9	5,0	64,9	0,8
E M	F	40	6,3	25,9	67,9	16,5	24,3	1,0	27,3	73,7	7,2
I L F	M	17	7,3	32,4	66,2	14,8	22,4	1,0	31,4	68,7	7,2
N S	M	20	6,2	24,1	74,3	19,1	25,7	0,8	15,6	83,8	4,3
M F C	F	56	5,8	22,1	63,2	16,7	26,5	0,6	43,4	52,1	10,3
MÉDIA		40,14	8,52	30,91	75,65	20,82	27,42	1,00	15,67	50,56	3,05
DP		16,96	1,62	4,40	7,39	3,30	2,36	0,34	12,63	17,77	3,54

F – SEXO FEMININO; M – SEXO MASCULINO; Hb – HEMOGLOBINA; Ht – HEMATÓCRITO; VCM – VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO; HCM – HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA; CHCM – CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA; RET- RETICULÓCITO;DP – DESVIO PADRÃO

TABELA 4 - RESULTADOS DE ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DE 21 PACIENTES PORTADORES DE AMEMIA FERROPRIVA PÓS TRATAMENTO

NOME	SEXO	IDADE (ANOS)	HB (g/dl)	HTO (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	RET(%)	MICRÓCITOS (%) VC<60fl	HIPOCROMIA (%) HC<28fl	MICOCITOSE+ HIPOCROMIA (%) VC<60fl e HC<28fl
A B	F	15	12,5	40,4	88,3	27,4	31,0	0,8	1,9	6,7	0,0
J R B	F	22	13,7	45,6	93,5	28,2	30,1	1,1	1,4	5,6	0,0
M J N	F	52	13,4	43,6	97,1	29,8	30,7	1,2	0,2	4,3	0,0
R C F	F	52	12,7	44,9	99,8	28,4	28,4	1,4	0,5	12,5	0,0
M E F C	F	46	13,9	43,8	89,7	28,3	31,6	1,0	2,6	1,5	0,0
E G O	F	49	13,6	39,1	86,2	29,9	34,7	1,0	1,5	1,5	0,0
T S C	F	17	12,8	40,0	94,6	30,2	32,0	1,2	0,3	2,2	0,0
M O	F	55	13,9	44,9	89,4	27,6	30,9	1,0	1,2	0,3	0,0
M A C	F	46	14,2	53,2	84,7	22,7	26,8	1,4	0,6	1,2	0,2
N L	F	42	11,8	41,5	91,2	25,9	28,4	1,1	1,3	0,2	0,1
R L	F	37	11,4	39,7	98,7	28,2	28,6	1,2	3,4	0,1	0,0
N M	F	64	12,2	42,6	105,0	30,1	28,6	2,0	13,5	0,2	0,0
J S	F	46	11,5	38,2	87,0	26,2	30,1	0,8	2,5	7,7	0,0
A F R	F	33	12,1	40,6	93,2	27,7	29,7	1,0	0,7	12,9	0,4
R T V	M	15	12,3	41,2	83,1	24,9	30,0	0,9	2,6	10,0	0,0
G M S	M	46	13,2	44,6	83,4	24,6	29,5	1,9	8,3	19,3	0,6
S P P	F	73	12,9	42,4	100,0	30,6	30,4	1,0	0,2	7,3	0,0
E M	F	40	12,2	37,8	90,3	29,2	32,3	1,2	2,7	1,8	0,1
I L F	M	17	12,6	39,9	77,6	24,5	31,6	0,6	18,5	12,5	1,2
N S	M	20	13,7	45,7	89,5	26,8	29,9	0,5	6,2	25,2	1,3
M F C	F	56	11,0	38,4	86,6	24,7	28,5	1,3	17,5	37,7	5,7
MÉDIA		40,14	12,74	42,29	90,90	27,42	30,18	1,12	4,14	8,13	0,46
DP		16,96	0,91	3,56	6,66	2,23	1,73	0,36	5,61	9,60	1,26

F – SEXO FEMININO; M – SEXO MASCULINO; Hb – HEMOGLOBINA; Ht – HEMATÓCRITO; VCM – VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO; HCM – HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA; CHCM – CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA; RET- RETICULÓCITO;DP – DESVIO PADRÃO

As FIGURAS de 9 a 13 mostram os gráficos de variação da média de Ht, Hb, VCM, HCM e CHCM, em controles normais e 21 pacientes portadores de anemia ferropriva antes e depois do tratamento. Evidenciam a eficácia da terapêutica e a melhora hematológica dos mesmos.

FIGURA 9

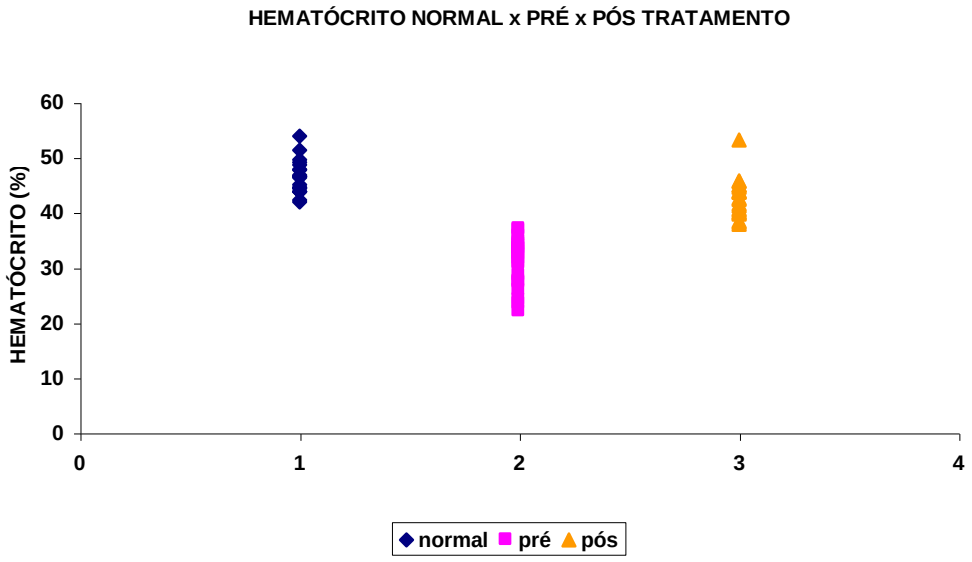


FIGURA 10

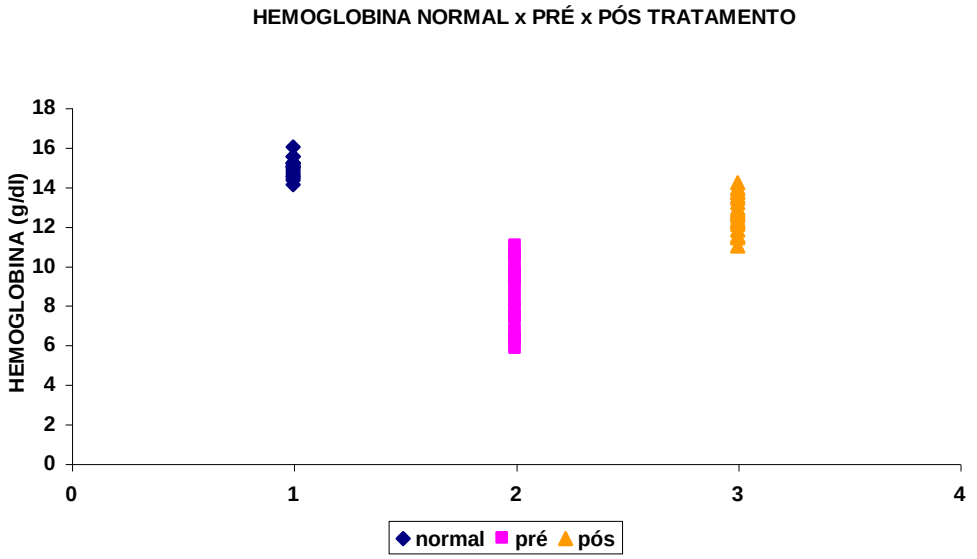


FIGURA 11

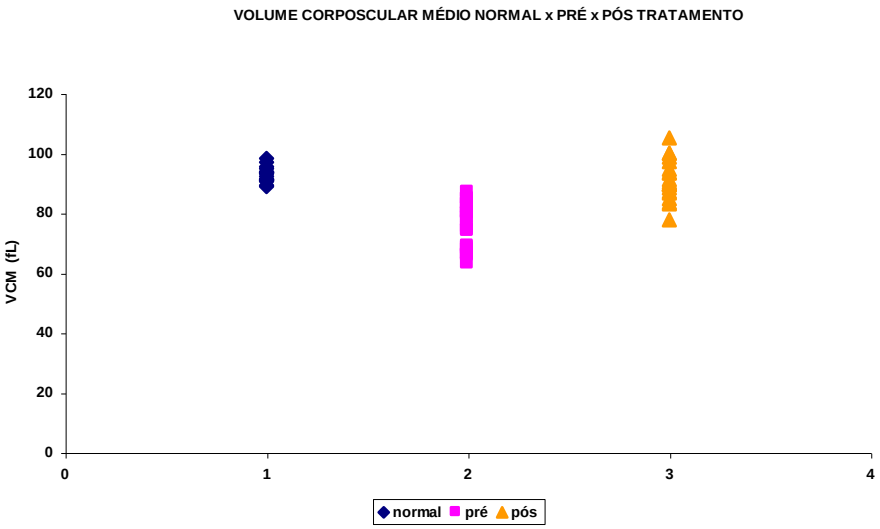


FIGURA 12

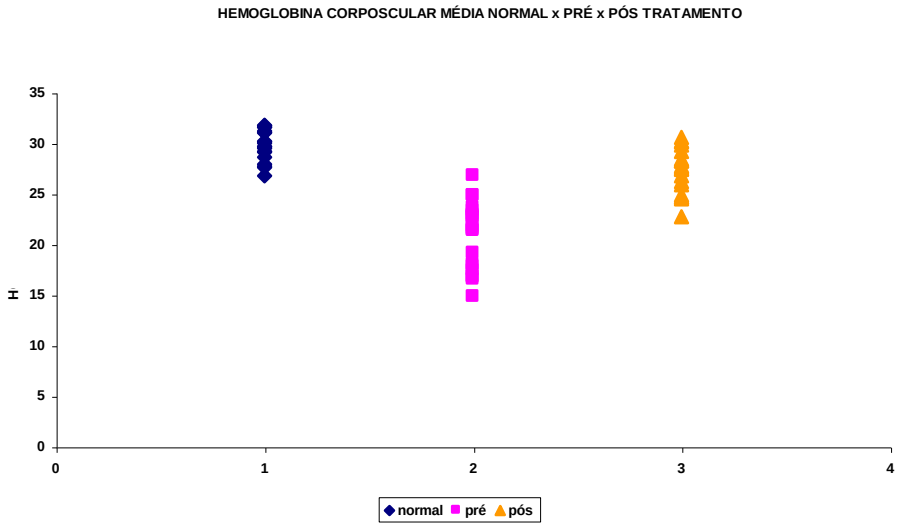
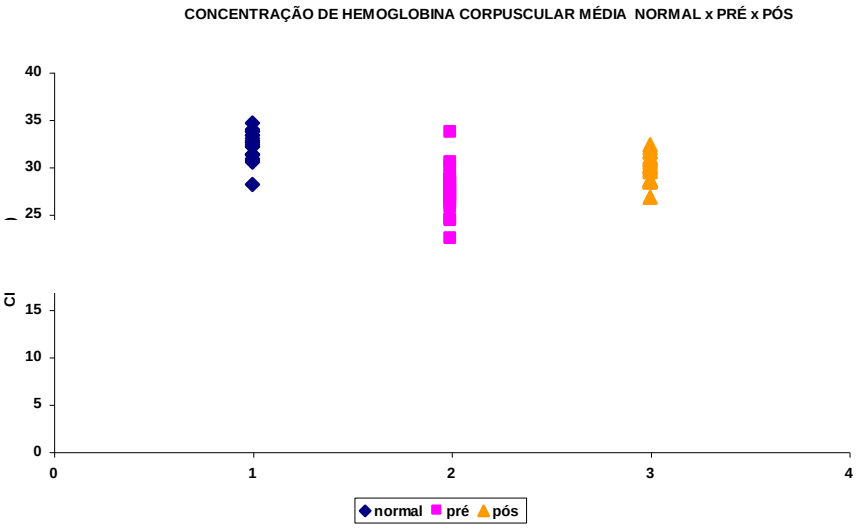


FIGURA 13



A TABELA 5 apresenta os resultados do perfil de ferro, que incluem a dosagem de ferro sérico, CTLF, saturação de ferro e dosagem de ferritina.

A TABELA 6 apresenta a avaliação qualitativa da morfologia eritrocitária, do sangue periférico dos 21 pacientes portadores de anemia ferropriva, à microscopia óptica comum. Utilizou-se o sistema de 1+ a 4+, sendo que, quanto maior o número de +, mais acentuada a alteração em análise.

A FIGURA 1 mostra a morfologia típica da anemia ferropriva, encontrada no sangue periférico de dois dos pacientes estudados. Observa-se a intensa aniso-poiquilocitose, microcitose, hipocromia, presença de freqüentes eliptócitos e raras hemácias em alvo.

A TABELA 7 mostra os valores obtidos por ***ectacitometria*** de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** do grupo controle de doadores de sangue, em *"shear stress"* progressivo, com solução de osmolalidade 300 mOsm, suas respectivas médias e desvio padrão.

As TABELAS 8 e 9 mostram os valores obtidos por ***ectacitometria*** de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** dos pacientes estudados, em *"shear stress"* progressivo, com solução de osmolalidade 300 mOsm, suas respectivas médias e desvio padrão, pré e pós tratamento.

A FIGURA 15 mostra o gráfico dos valores médios de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** na suspensão de 300 mOsm, em *"shear stress"* progressivo, dos pacientes controle.

A FIGURA 16 mostra o gráfico dos valores médios de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** na suspensão de 300 mOsm, em *"shear stress"* progressivo, dos pacientes portadores de anemia ferropriva antes do tratamento.

A FIGURA 17 mostra o gráfico dos valores médios de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** na suspensão de 300 mOsm, em *"shear stress"*

progressivo, dos pacientes portadores de anemia ferropriva depois do tratamento.

A FIGURA 18 mostra o gráfico dos valores médios de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** na suspensão de 300 mOsm, em *"shear stress"* progressivo, dos controles e dos pacientes portadores de anemia ferropriva antes do tratamento. Observa-se uma diferença estatisticamente expressiva após o *"shear stress"* de 0,95 Pa ($p < 0,0007$).

A FIGURA 19 mostra o gráfico dos valores médios de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** na suspensão de 300 mOsm, em *"shear stress"* progressivo, dos controles e dos pacientes portadores de anemia ferropriva depois do tratamento. Permanece a diferença estatística ($p < 0,005$).

A FIGURA 20 mostra o gráfico dos valores médios de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** na suspensão de 300 mOsm, em *"shear stress"* progressivo, dos pacientes portadores de anemia ferropriva antes e depois do tratamento. Verifica-se uma diferença estatisticamente significativa em valores de baixos *"shear stress"*: 1,69- 3,0 e 5,34 Pa ($p < 0,03$).

As FIGURAS de 21 a 28 mostram a correlação entre a hemoglobina pré e pós tratamento e o **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"**, em solução de 300 mOsm, nos *"shear stress"*de 1,69- 3,0- 5,34 e 16,86 Pa, respectivamente.

Na tentativa de avaliar os determinantes da deformabilidade eritrocitária responsáveis pela diminuição do ID encontrado nos pacientes estudados, buscamos correlacionar o ID com os valores gerados pelo hemocitômetro H•3. Os índices analisados foram a % de micrócitos, a % de células hipocrômicas e a % de células ao mesmo tempo microcíticas e hipocrômicas.

As FIGURAS de 29 a 36 mostram a correlação entre a porcentagem de micrócitos em todos os pacientes, e naqueles com mais de 20% de células microcíticas, em solução de 300 mOsm, nos *"shear stress"*de 1,69- 3,0- 5,34 e 16,86 Pa, respectivamente.

Observa-se que, nos pacientes com microcitose acima de 20%, o **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE"** tende a ser menor, nos diversos *"shear stress"* estudados.

As FIGURAS de 37 a 44 apresentam a correlação entre a porcentagem de células hipocrômicas em todos os casos estudados, e naqueles com esse índice acima de 40%, em solução de 300 mOsm, nos *"shear stress"*de 1,69- 3,0- 5,34 e 16,86 Pa, respectivamente.

A presença da hipocromia não mostra uma boa correlação com o ID**,** mesmo com porcentagens de células hipocrômicas acima de 40%.

As FIGURAS de 45 a 52 exibem a correlação entre a porcentagem de células ao mesmo tempo microcíticas e hipocrômicas em todos os pacientes, e naqueles com mais de 3% dessas células, em solução de 300 mOsm, nos *"shear stress"*de 1,69- 3,0- 5,34 e 16,86 Pa, respectivamente.

A associação de microcitose e hipocromia também não apresenta correlação com o ID, sugerindo uma provável compensação quando os dois fatores estão presentes na mesma célula.

TABELA 5 - PERFIL DE FERRO DE 21 PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FERROPRIVA
PRÉ E PÓS TRATAMENTO

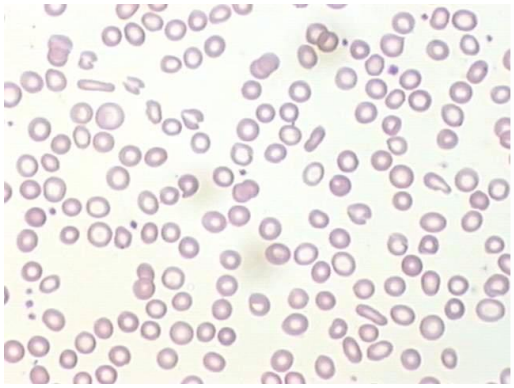
NOME	FERRO		CTLF		SATURAÇÃO		FERRITINA	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
A B	25	58	379	283	6	20	9	26
J R B	8	99	357	216	2	45	2	10
M J N	17	24	428	233	3	10	1	13
R C F	16	74	383	333	4	22	30	52
M E F C	16	108	399	316	4	34	2	37
E G O	24	71	383	303	6	23	1	20
T S C	24	198	333	241	7	82	3	28
M O	16	51	383	327	4	15	2	8
M A C S	8	108	413	299	1	36	2	24
N L	16	44	416	374	3	11	2	7
R L	33	58	433	399	7	14	3	5
N M	9	17	370	310	2	5	6	86
J S	8	74	310	299	2	24	4	13
A F R	33	26	366	374	9	6	7	3
R T V	24	24	283	299	8	8	8	11
G M S	16	83	383	349	4	23	25	412
S P P	8	41	413	249	1	16	2	21
E M	16	74	449	366	3	20	2	15
I L F	8	66	416	299	1	22	1	70
N S	8	33	399	333	2	9	1	11
M F C	42	33	466	366	9	9	9	73
MÉDIA	17,85	64,95	388,66	312,76	4,19	21,61	5,80	45,00
DP	9,71	41,04	43,91	49,81	2,61	17,28	7,72	87,42

FERRO- dosagem de ferro sérico; CTLF - capacidade total de ligação de ferro no plasma; Saturação – saturação de ferro;
FERRITINA- dosagem de ferritina no plasma

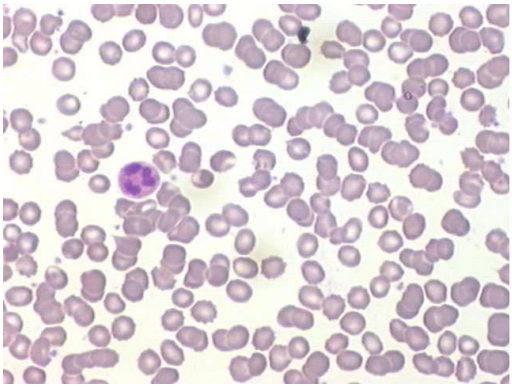
TABELA 6 - MORFOLOGIA ERITROCITÁRIA DE SANGUE PERIFÉRICO
DE 21 PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FERROPRIVA PRÉ E PÓS TRATAMENTO

NOME	ANISO CITOSE		POIQUILO CITOSE		MICRO CITOSE		HIPO CROMIA		MACRO CITOSE		ELIPTÓ CITOS		HEMÁCIAS EM ALVO		POLI CROMASIA	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
AB	1+	1+	1+	-	1+	-	1+	-	-	-	1+	-	-	-	-	-
JRB	3+	1+	3+	-	3+	-	3+	-	1+	-	2+	-	1+	-	-	-
MJN	2+	1+	2+	-	2+	-	3+	-	-	-	1+	-	-	-	-	-
RCF	1+	-	1+	-	1+	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEFC	2+	1+	2+	-	2+	-	3+	1+	1+	-	1+	-	-	-	-	-
EGO	2+	-	2+	-	2+	-	3+	-	-	-	1+	-	-	-	-	-
TSC	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MO	2+	-	2+	-	2+	-	3+	-	-	-	1+	-	1+	-	-	-
MAC	3+	1+	3+	-	3+	-	3+	-	1+	-	3+	-	-	-	-	-
NL	2+	-	2+	-	1+	-	2+	-	-	-	2+	-	-	-	-	-
RL	1+	-	1+	-	1+	-	1+	-	-	-	-	-	1+	-	-	-
NM	2+	1+	1+	-	2+	1+	3+	-	-	-	2+	-	-	-	-	-
JS	3+	1+	3+	-	2+	-	3+	-	1+	-	2+	-	1+	-	-	-
AFR	1+	-	1+	-	1+	-	1+	-	-	-	1+	-	-	-	-	-
RTV	1+	1+	1+	-	1+	-	1+	1+	-	-	1+	-	-	-	-	-
GMS	1+	-	1+	-	1+	-	1+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPP	2+	-	2+	-	1+	-	3+	-	1+	-	1+	-	1+	-	-	-
EM	3+	1+	3+	-	4+	-	4+	-	-	-	1+	-	1+	-	-	-
ILF	3+	1+	2+	-	2+		3+	-	1+	-	1+	-	-	-	-	-
NS	3+	1+	3+	-	3+	-	3+	-	-	-	3+	-	-	-	-	-
MFC	4+	1+	4+	1+	3+	1+	4+	1+	1+	-	1+	1+	-	-	-	-

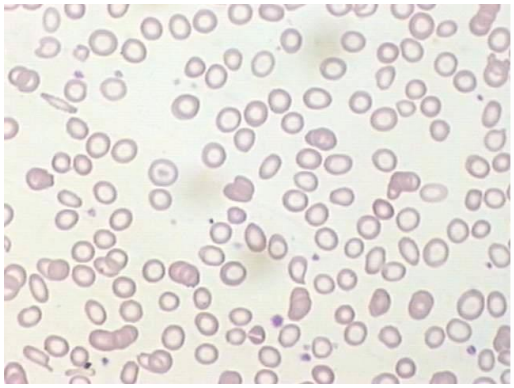
FIGURA 14 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SANGUE PERIFÉRICO À MICROSCOPIA ÓPTICA COMUM – 400 X



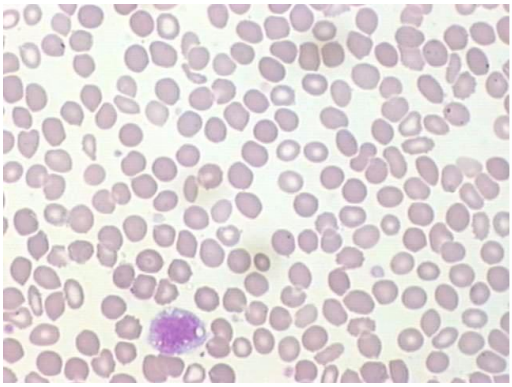
EM, 40 ANOS
PRÉ TRATAMENTO



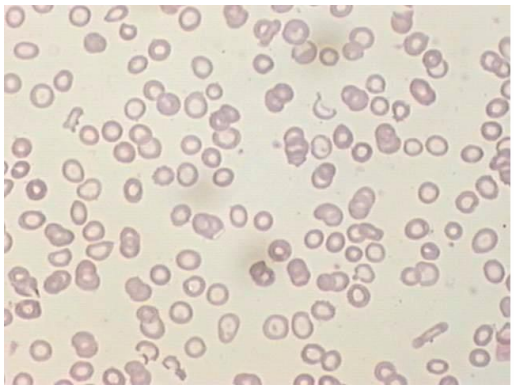
EM, 40 ANOS
PÓS TRATAMENTO



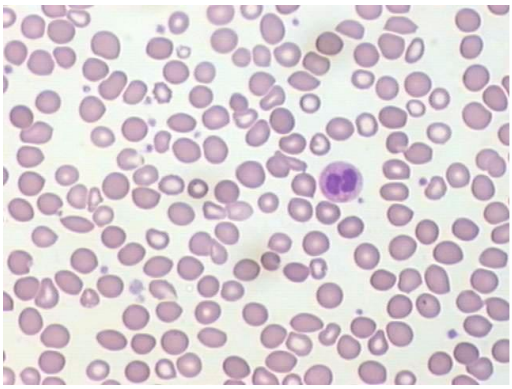
NS, 20 ANOS
PRÉ TRATAMENTO



NS, 20 ANOS
PÓS TRATAMENTO



MFC, 56 ANOS
PRÉ TRATAMENTO



MFC, 56 ANOS
PÓS TRATAMENTO

TABELA 7 - VALORES DE DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA EM 21 DOADORES DE SANGUE- GRUPO CONTROLE EM SOLUÇÃO DE 300mOsm, EM DIFERENTES VALORES DE “SHEAR STRESS’’

	“SHEAR STRESS” (Pascais)								
NOME	**0,30**	**0,53**	**0,95**	**1,69**	**3,00**	**5,34**	**9,48**	**16,86**	**30,05**
M A R	0,10	0,07	0,15	0,25	0,35	0,44	0,52	0,57	0,60
J M F	0,07	0,06	0,14	0,25	0,37	0,46	0,52	0,57	0,60
L G O	0,05	0,08	0,16	0,26	0,37	0,46	0,52	0,57	0,60
J M S	0,02	0,05	0,13	0,23	0,34	0,44	0,52	0,57	0,60
A B	0,07	0,11	0,19	0,30	0,39	0,47	0,53	0,57	0,61
S R M	0,10	0,08	0,16	0,27	0,37	0,47	0,53	0,58	0,61
M G R	0,06	0,10	0,18	0,29	0,39	0,47	0,53	0,58	0,61
N A S	0,07	0,11	0,19	0,30	0,39	0,48	0,54	0,59	0,62
A C R	0,08	0,06	0,14	0,25	0,36	0,45	0,52	0,56	0,60
A F A	0,32	0,13	0,13	0,24	0,34	0,43	0,50	0,55	0,58
L C M	0,18	0,07	0,15	0,25	0,36	0,44	0,51	0,56	0,59
M B A	0,01	0,05	0,13	0,24	0,36	0,46	0,53	0,58	0,62
M C C	0,11	0,06	0,13	0,24	0,35	0,44	0,51	0,56	0,59
W C S	0,02	0,08	0,16	0,26	0,37	0,45	0,52	0,56	0,60
J Z F	0,03	0,08	0,16	0,26	0,36	0,45	0,52	0,57	0,60
V A S	0,09	0,09	0,17	0,27	0,38	0,46	0,52	0,57	0,60
J C R	0,09	0,05	0,13	0,23	0,34	0,44	0,51	0,56	0,59
G F C	0,06	0,10	0,18	0,29	0,39	0,47	0,53	0,57	0,61
L C F	0,03	0,07	0,16	0,27	0,38	0,47	0,54	0,58	0,62
J R S	0,06	0,09	0,16	0,27	0,38	0,47	0,53	0,58	0,63
W C	0,05	0,10	0,18	0,29	0,39	0,47	0,52	0,57	0,60
MÉDIA	0,075	0,079	0,156	0,259	0,365	0,454	0,520	0,567	0,600
DP	0,0673	0,0181	0,0207	0,0219	0,0195	0,0180	0,0161	0,0149	0,0149

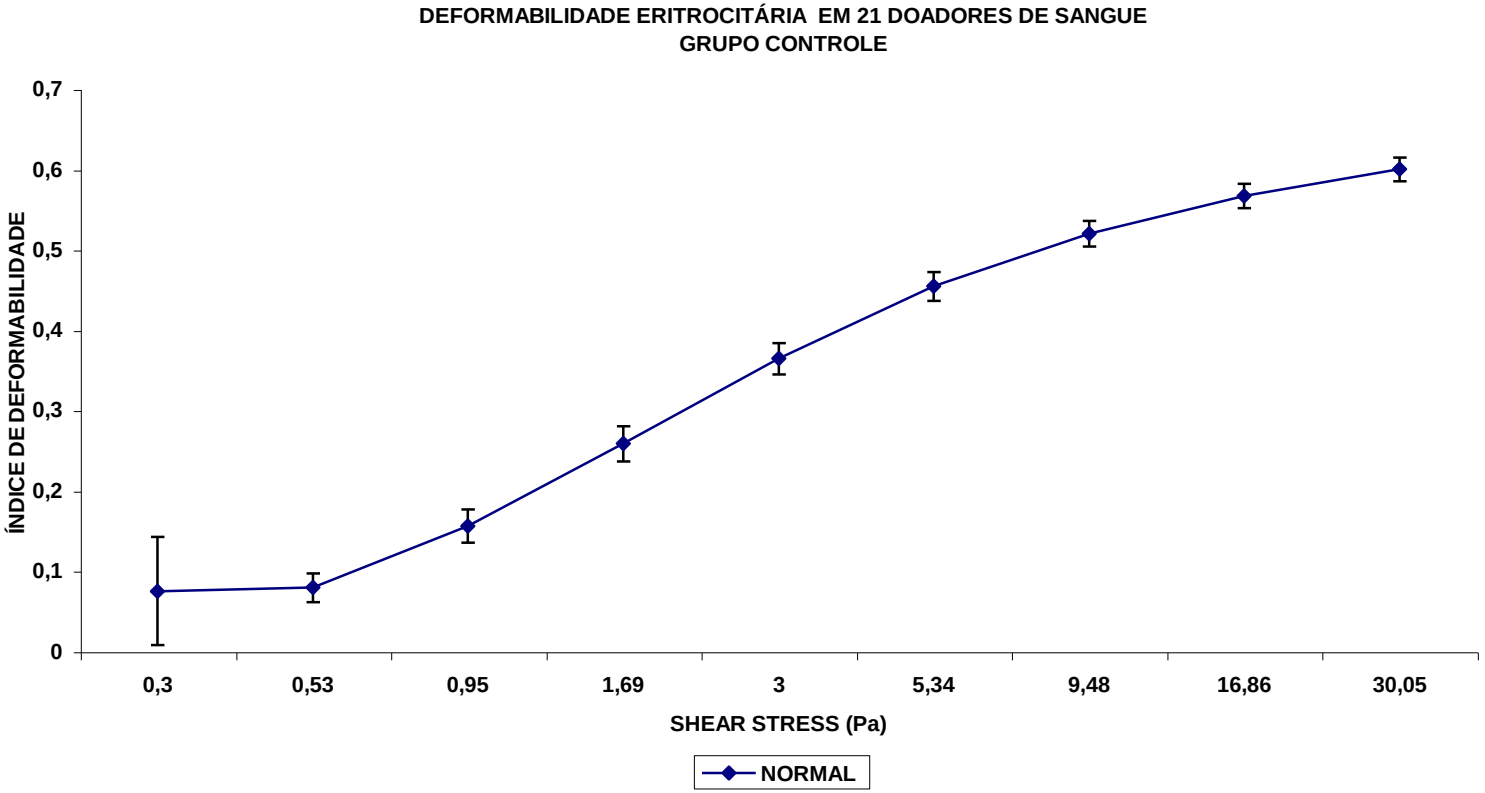
TABELA 8 - VALORES DE DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA EM 21 PACIENTES PRÉ-TRATAMENTO DE ANEMIA FERROPRIVA EM SOLUÇÃO DE 300mOsm, EM DIFERENTES VALORES DE “SHEAR STRESS”

	"SHEAR STRESS" (Pascais)								
NOME	**0,3**	**0,53**	**0,95**	**1,69**	**3**	**5,34**	**9,48**	**16,86**	**30,05**
A B	0,143	0,265	0,235	0,127	0,233	0,301	0,382	0,445	0,482
J R B	0,003	0,042	0,112	0,202	0,289	0,389	0,471	0,530	0,569
M J N	0,010	0,032	0,101	0,196	0,292	0,396	0,476	0,531	0,569
R C F	0,206	0,257	0,187	0,131	0,188	0,286	0,374	0,449	0,507
M E F C	0,227	0,264	0,149	0,102	0,172	0,275	0,370	0,446	0,510
E G O	0,003	0,031	0,101	0,194	0,305	0,407	0,495	0,554	0,593
T S C	0,031	0,052	0,127	0,231	0,351	0,453	0,530	0,581	0,612
M O	0,001	0,020	0,096	0,193	0,308	0,411	0,488	0,536	0,580
M A C	0,229	0,244	0,086	0,085	0,153	0,259	0,367	0,455	0,520
N L	0,010	0,025	0,102	0,202	0,319	0,424	0,505	0,559	0,597
R L	0,005	0,048	0,133	0,248	0,355	0,460	0,534	0,582	0,617
N M	0,019	0,025	0,113	0,229	0,362	0,475	0,549	0,599	0,628
J S	0,044	0,076	0,067	0,114	0,195	0,289	0,372	0,443	0,504
A F R	0,048	0,108	0,041	0,082	0,170	0,275	0,372	0,455	0,518
R T V	0,037	0,065	0,153	0,264	0,380	0,483	0,549	0,594	0,627
G M S	0,006	0,018	0,080	0,172	0,287	0,394	0,478	0,537	0,574
S P P	0,025	0,051	0,059	0,117	0,200	0,302	0,399	0,477	0,534
E M	0,011	0,013	0,069	0,158	0,272	0,385	0,470	0,534	0,570
I L F	0,009	0,017	0,059	0,137	0,239	0,346	0,436	0,496	0,548
N S	0,010	0,010	0,040	0,122	0,229	0,335	0,434	0,506	0,547
M F C	0,027	0,030	0,039	0,102	0,195	0,301	0,402	0,481	0,535
MÉDIA	0,048	0,080	0,102	0,162	0,262	0,364	0,450	0,514	0,559
DP	0,080	0,092	0,050	0,056	0,070	0,073	0,064	0,053	0,044

TABELA 9 - VALORES DE DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA EM 21 PACIENTES PÓS- TRATAMENTO DE ANEMIA FERROPRIVA EM SOLUÇÃO DE 300mOsm, EM DIFERENTES VALORES DE “SHEAR STRESS”

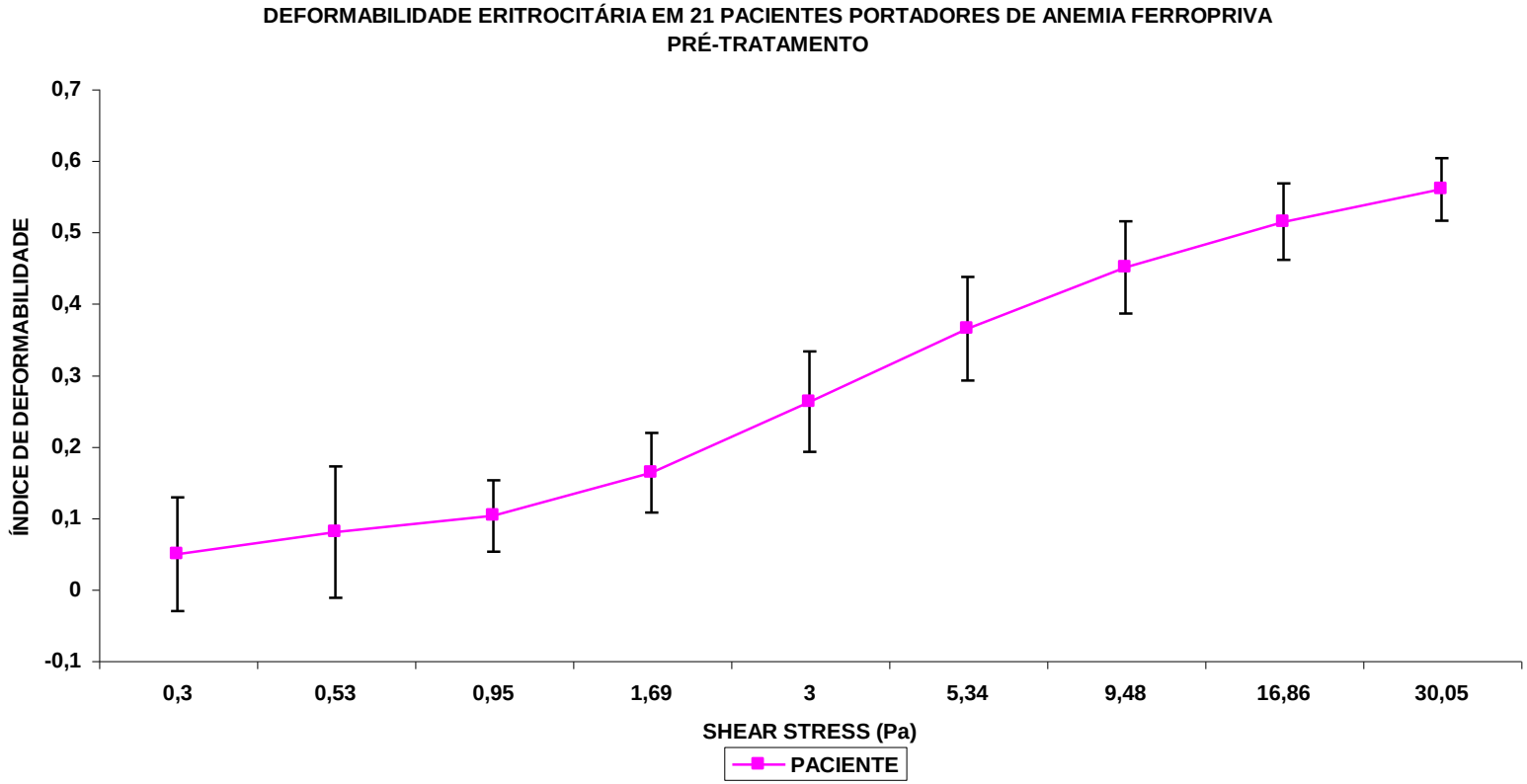
	"SHEAR STRESS" (Pascais)								
NOME	**0,3**	**0,53**	**0,95**	**1,69**	**3**	**5,34**	**9,48**	**16,86**	**30,05**
A B	0,008	0,058	0,137	0,240	0,358	0,454	0,521	0,571	0,605
J R B	-0,015	0,042	0,119	0,217	0,326	0,418	0,484	0,535	0,575
M J N	0,049	0,074	0,157	0,260	0,378	0,466	0,527	0,572	0,607
R C F	0,239	0,124	0,111	0,210	0,321	0,420	0,495	0,548	0,588
M E F C	0,198	0,110	0,109	0,199	0,308	0,408	0,486	0,537	0,566
E G O	0,142	0,298	0,254	0,158	0,249	0,349	0,433	0,481	0,508
T S C	0,003	0,057	0,131	0,243	0,352	0,440	0,504	0,553	0,590
M O	0,296	0,245	0,128	0,221	0,322	0,404	0,465	0,513	0,555
M A C	0,048	0,060	0,050	0,125	0,247	0,369	0,464	0,536	0,576
N L	0,160	0,051	0,112	0,210	0,317	0,408	0,480	0,530	0,571
R L	0,081	0,048	0,103	0,203	0,319	0,418	0,489	0,542	0,582
N M	0,326	0,065	0,141	0,253	0,371	0,463	0,526	0,571	0,603
J S	0,185	0,043	0,107	0,210	0,323	0,421	0,494	0,547	0,586
A F R	0,183	0,277	0,080	0,161	0,277	0,380	0,462	0,522	0,556
R T V	0,006	0,036	0,098	0,198	0,320	0,423	0,499	0,552	0,589
G M S	0,138	0,274	0,137	0,156	0,245	0,349	0,436	0,504	0,541
S P P	0,214	0,322	0,116	0,208	0,319	0,412	0,478	0,535	0,568
E M	0,116	0,228	0,208	0,127	0,211	0,297	0,375	0,437	0,459
I L F	0,003	0,035	0,091	0,183	0,289	0,386	0,462	0,519	0,561
N S	0,187	0,313	0,132	0,175	0,281	0,386	0,463	0,524	0,559
M F C	0,185	0,130	0,079	0,168	0,279	0,387	0,472	0,535	0,576
MÉDIA	0,131	0,138	0,124	0,196	0,305	0,403	0,477	0,532	0,568
DP	0,101	0,108	0,044	0,038	0,044	0,040	0,035	0,031	0,034

FIGURA 15



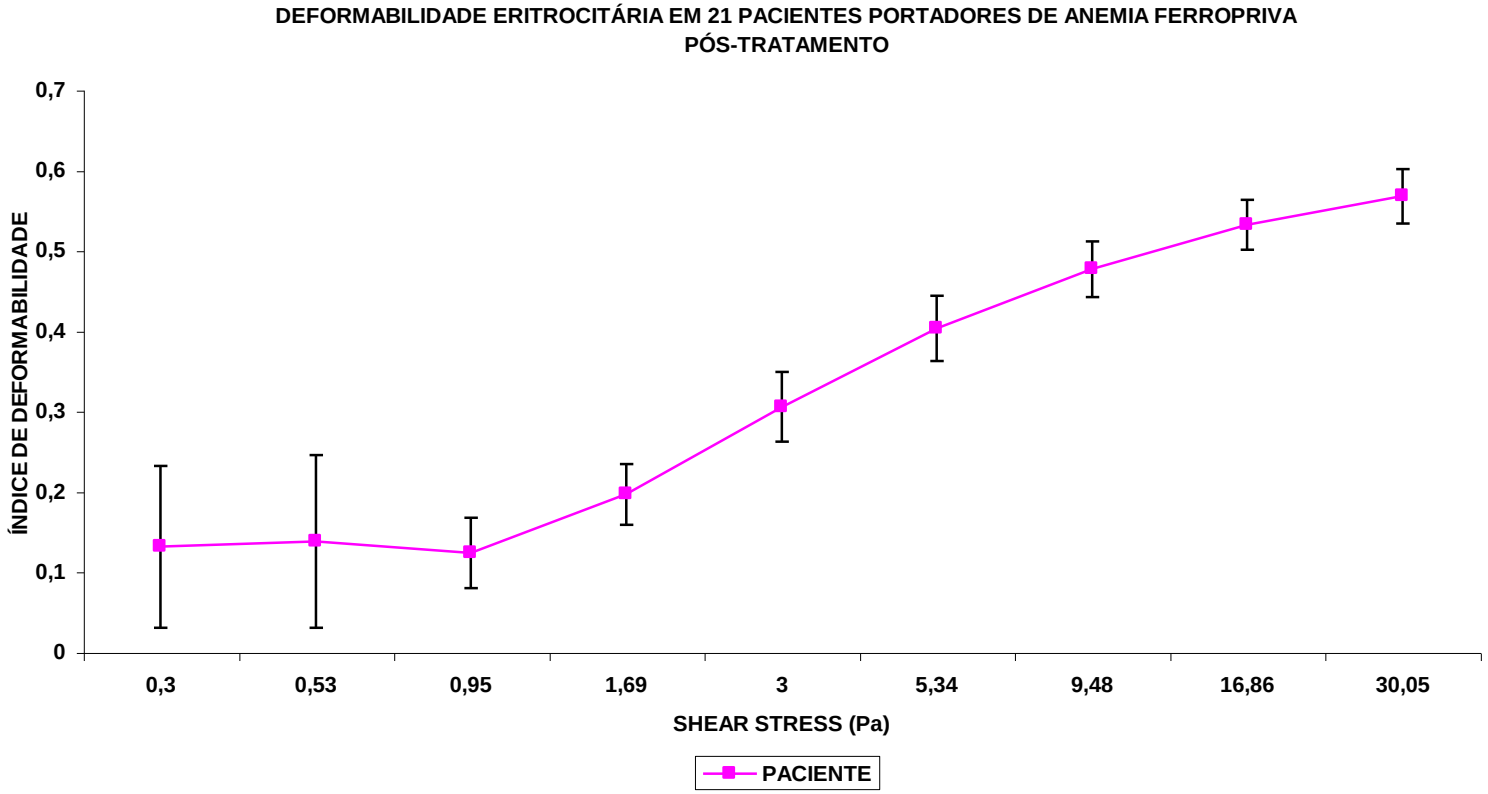
SHEAR STRESS	*0,3*	*0,53*	*0,95*	*1,69*	*3*	*5,34*	*9,48*	*16,86*	*30,05*
MÉDIA	0,075	0,079	0,156	0,259	0,365	0,454	0,520	0,567	0,600
DP	0,0673	0,0181	0,0207	0,0219	0,0195	0,0180	0,0161	0,0149	0,0149

FIGURA 16



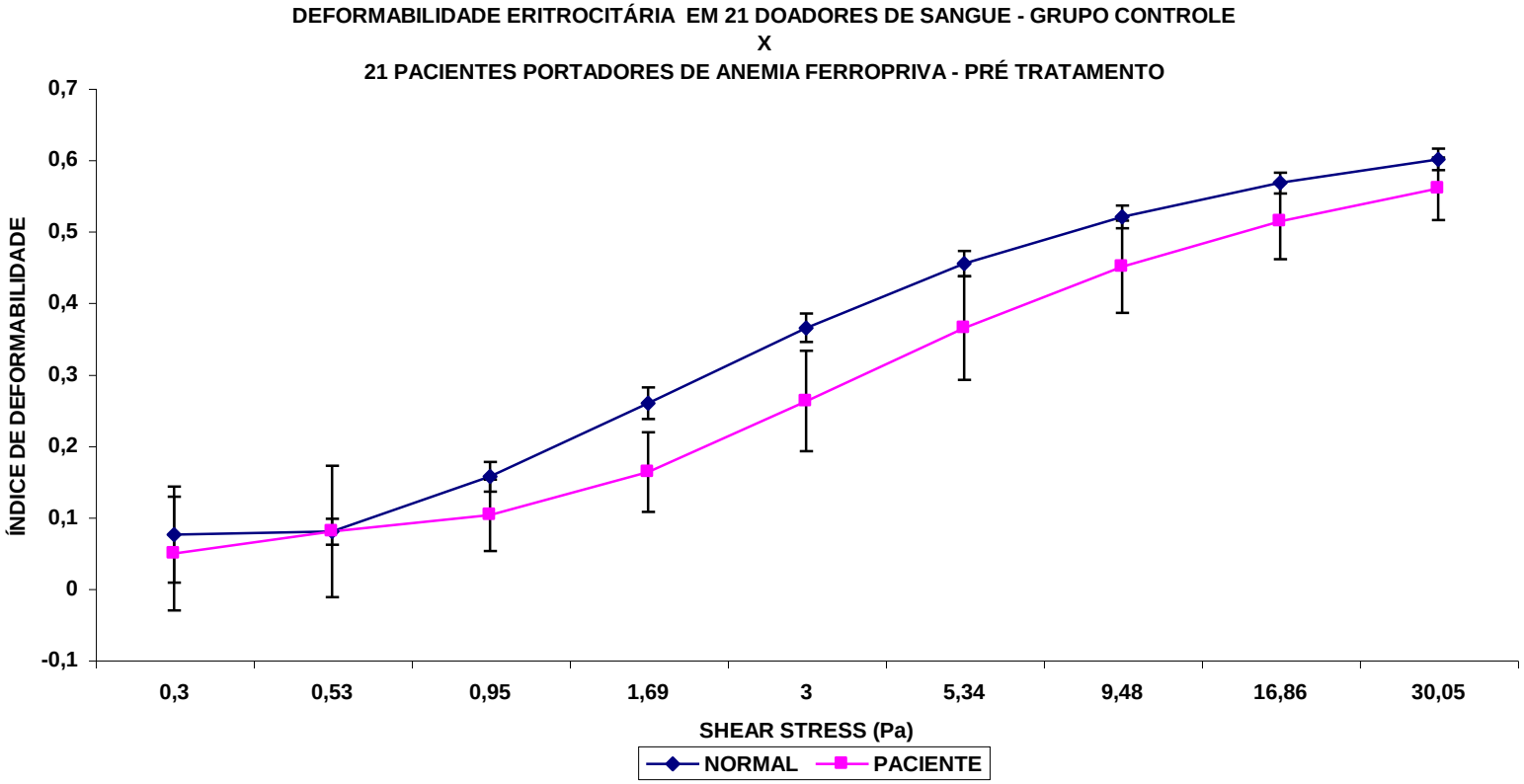
SHEAR STRESS	*0,3*	*0,53*	*0,95*	*1,69*	*3*	*5,34*	*9,48*	*16,86*	*30,05*
MÉDIA	0,048	0,080	0,102	0,162	0,262	0,364	0,450	0,514	0,559
DP	0,080	0,092	0,050	0,056	0,070	0,073	0,064	0,053	0,044

FIGURA 17



SHEAR STRESS	*0,3*	*0,53*	*0,95*	*1,69*	*3*	*5,34*	*9,48*	*16,86*	*30,05*
MÉDIA	0,131	0,138	0,124	0,196	0,305	0,403	0,477	0,532	0,568
DP	0,101	0,108	0,044	0,038	0,044	0,040	0,035	0,031	0,034

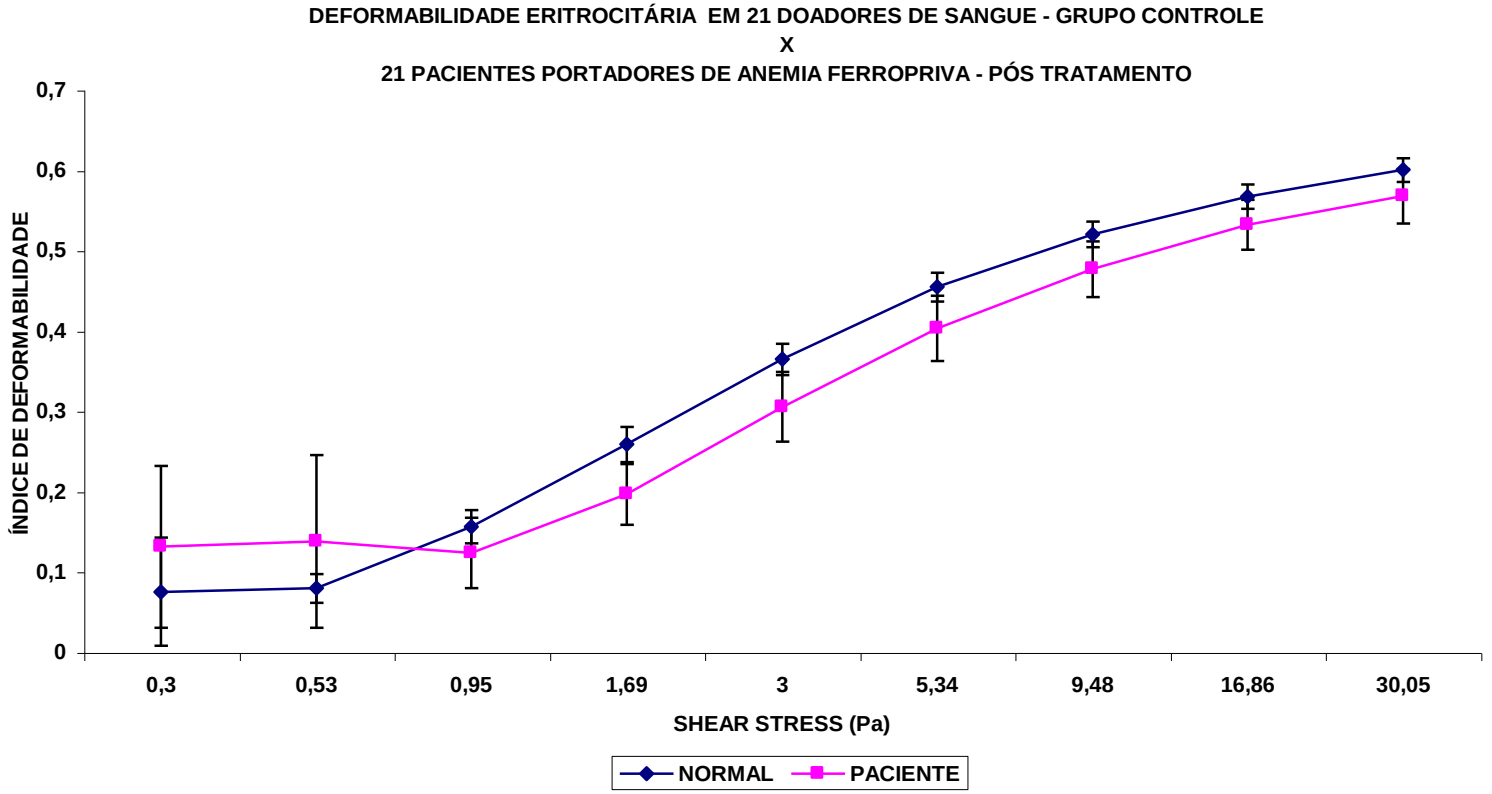
FIGURA 18



$p < 0,0007$

	SHEAR STRESS	***0,3***	***0,53***	***0,95***	***1,69***	***3***	***5,34***	***9,48***	***16,86***	***30,05***
NORMAL	MÉDIA	0,075	0,079	0,156	0,259	0,365	0,454	0,520	0,567	0,600
	DP	0,0673	0,0181	0,0207	0,0219	0,0195	0,0180	0,0161	0,0149	0,0149
PACIENTE	MÉDIA	0,048	0,080	0,102	0,162	0,262	0,364	0,450	0,514	0,559
	DP	0,080	0,092	0,050	0,056	0,070	0,073	0,064	0,053	0,044

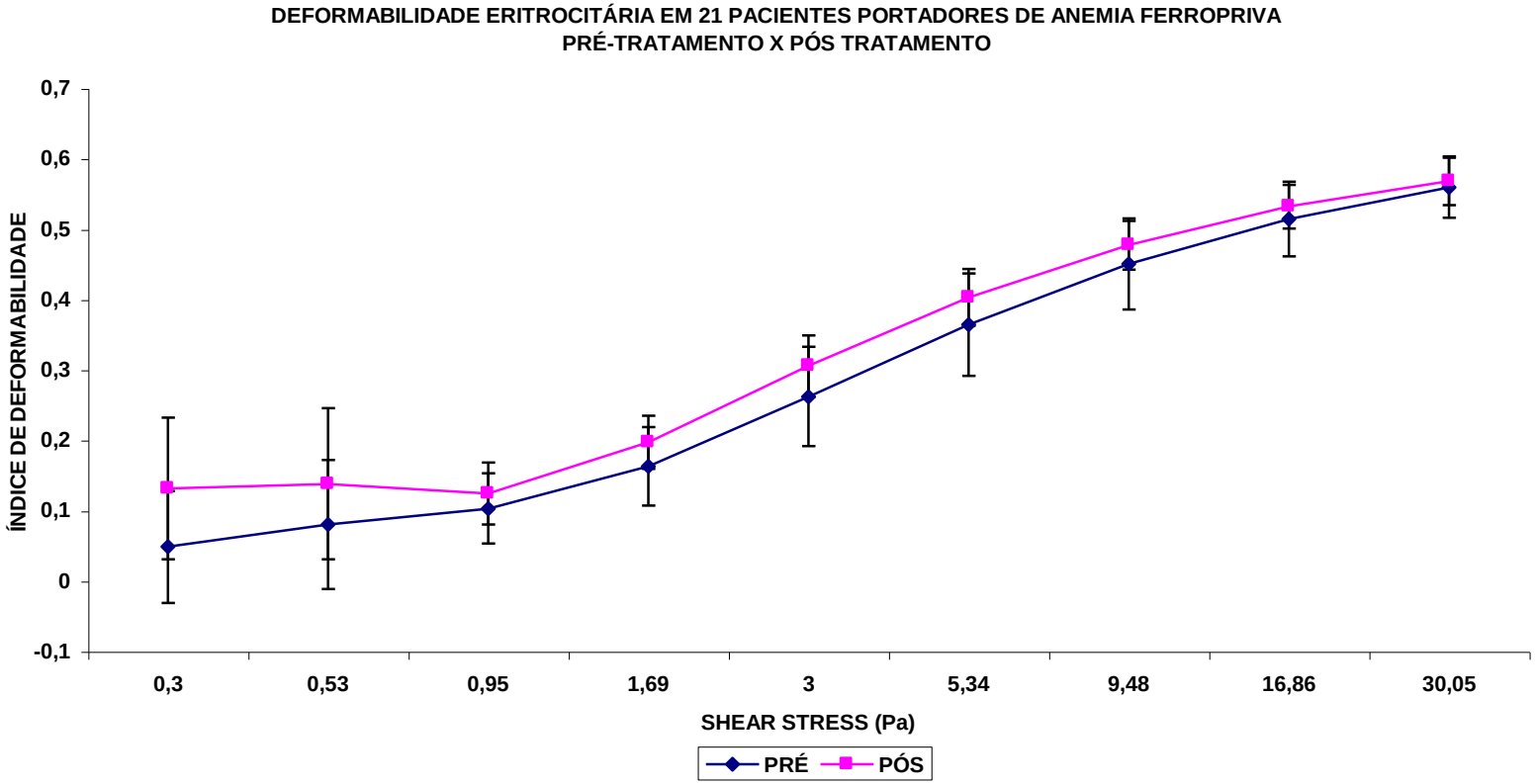
FIGURA 19



$p < 0,005$

	SHEAR STRESS	0,3	0,53	0,95	1,69	3	5,34	9,48	16,86	30,05
NORMAL	MÉDIA	0,075	0,079	0,156	0,259	0,365	0,454	0,520	0,567	0,600
	DP	0,0673	0,0181	0,0207	0,0219	0,0195	0,0180	0,0161	0,0149	0,0149
PACIENTE	MÉDIA	0,131	0,138	0,124	0,196	0,305	0,403	0,477	0,532	0,568
	DP	0,101	0,108	0,044	0,038	0,044	0,040	0,035	0,031	0,034

FIGURA 20



$p < 0,03$

	SHEAR STRESS	*0,3*	*0,53*	*0,95*	*1,69*	*3*	*5,34*	*9,48*	*16,86*	*30,05*
PRÉ	MÉDIA	0,048	0,080	0,102	0,162	0,262	0,364	0,450	0,514	0,559
	DP	0,080	0,092	0,050	0,056	0,070	0,073	0,064	0,053	0,044
PÓS	MÉDIA	0,131	0,138	0,124	0,196	0,305	0,403	0,477	0,532	0,568
	DP	0,101	0,108	0,044	0,038	0,044	0,040	0,035	0,031	0,034

FIGURA 21

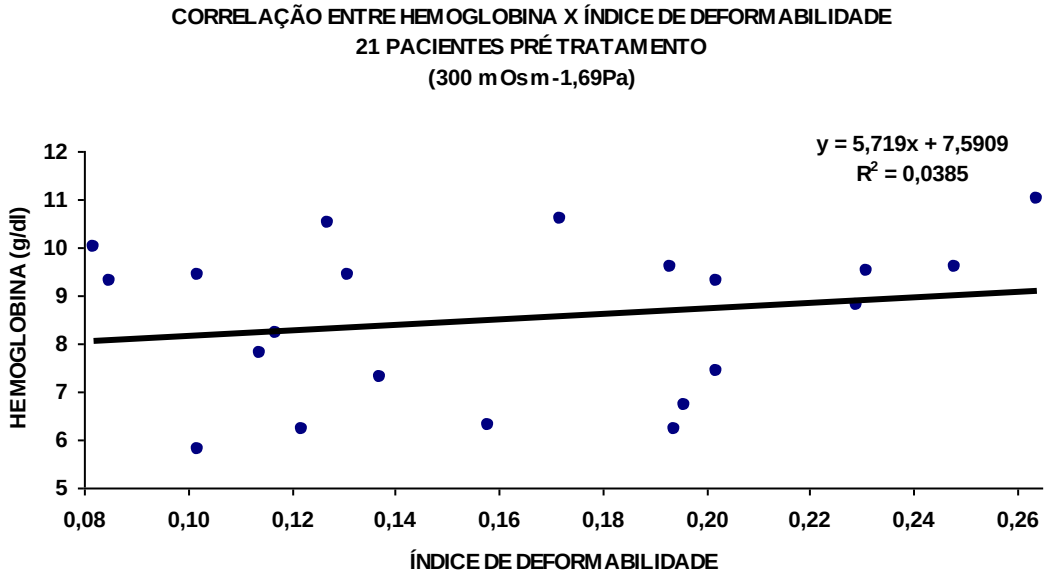


FIGURA 22

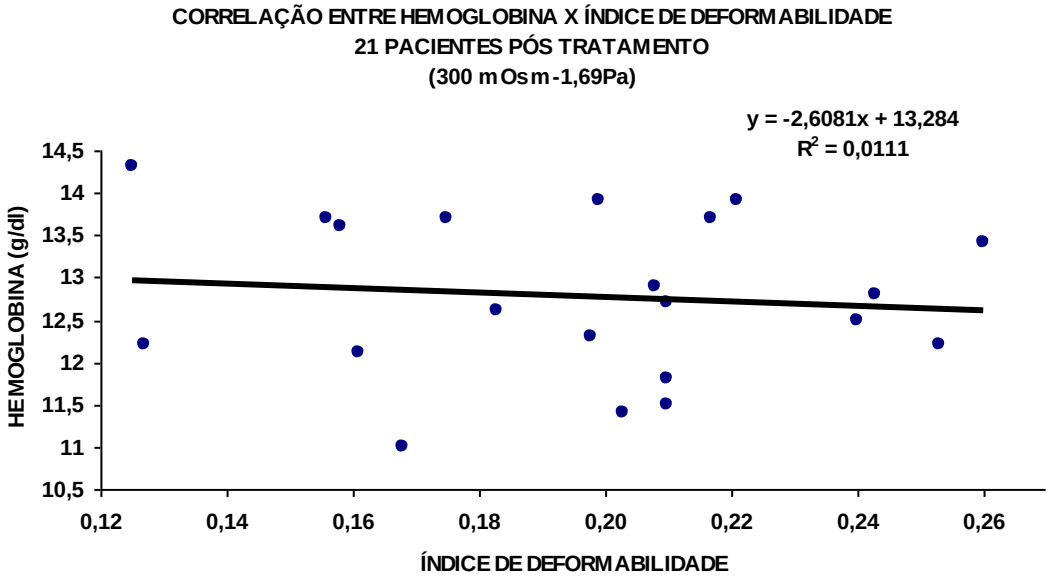


FIGURA 23

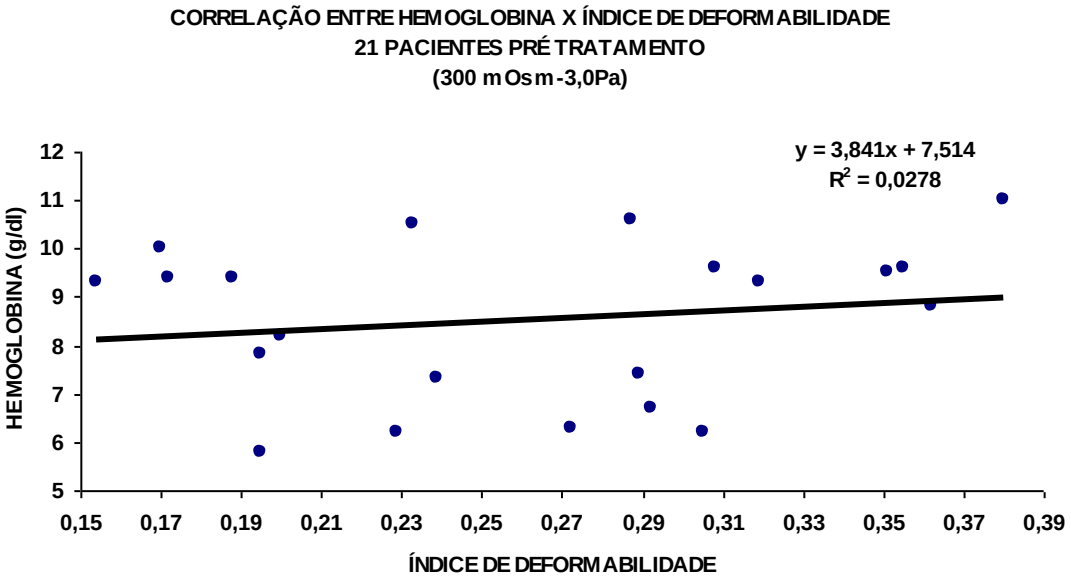


FIGURA 24

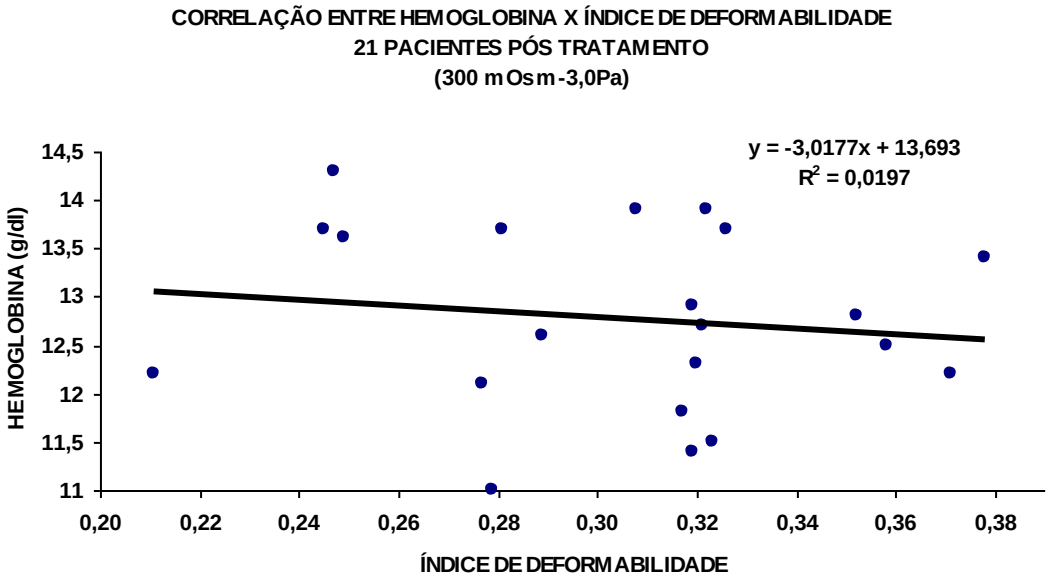


FIGURA 25

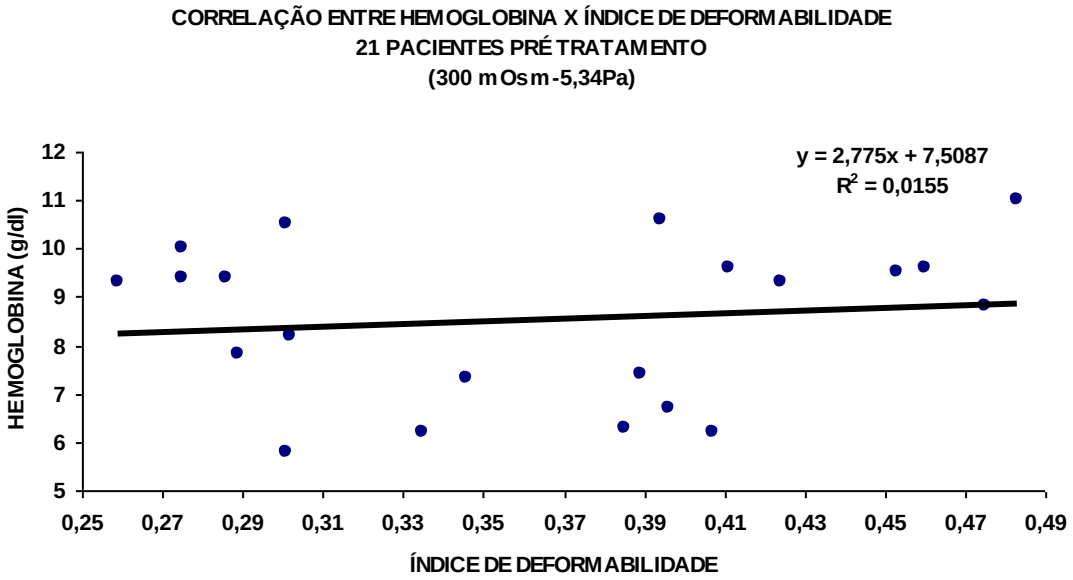


FIGURA 26

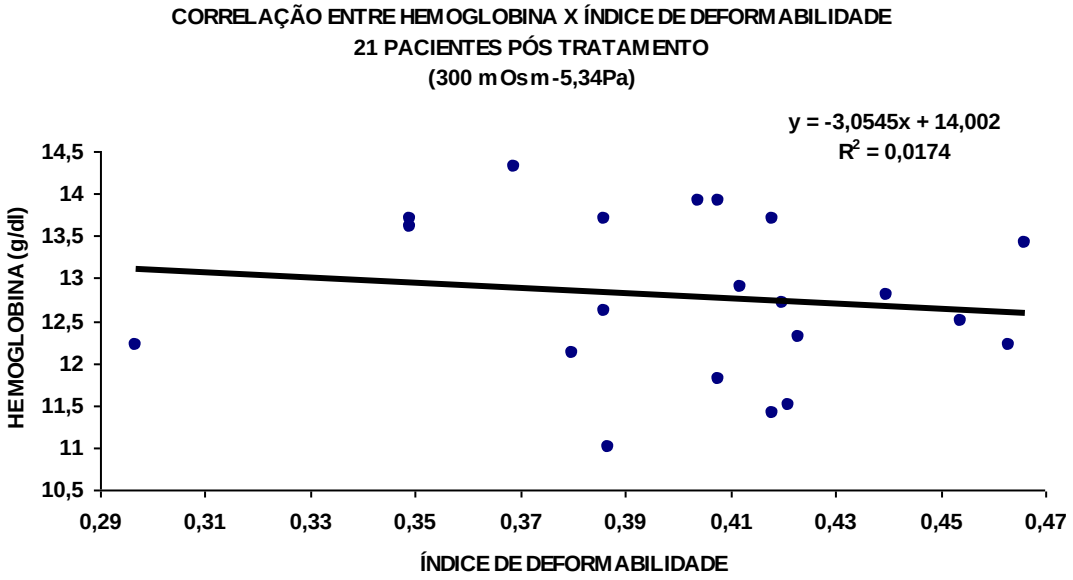


FIGURA 27

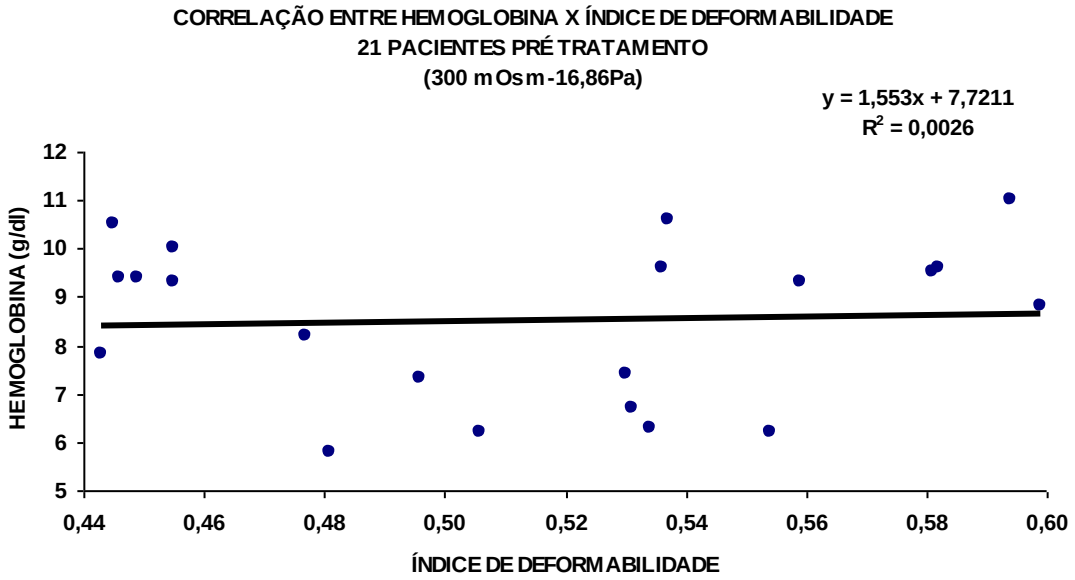


FIGURA 28

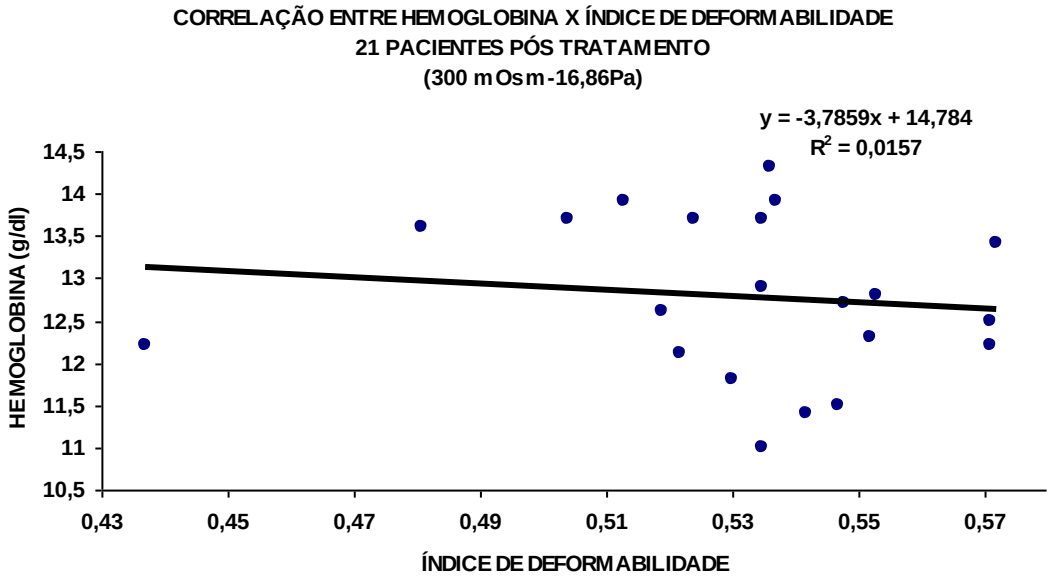


FIGURA 29

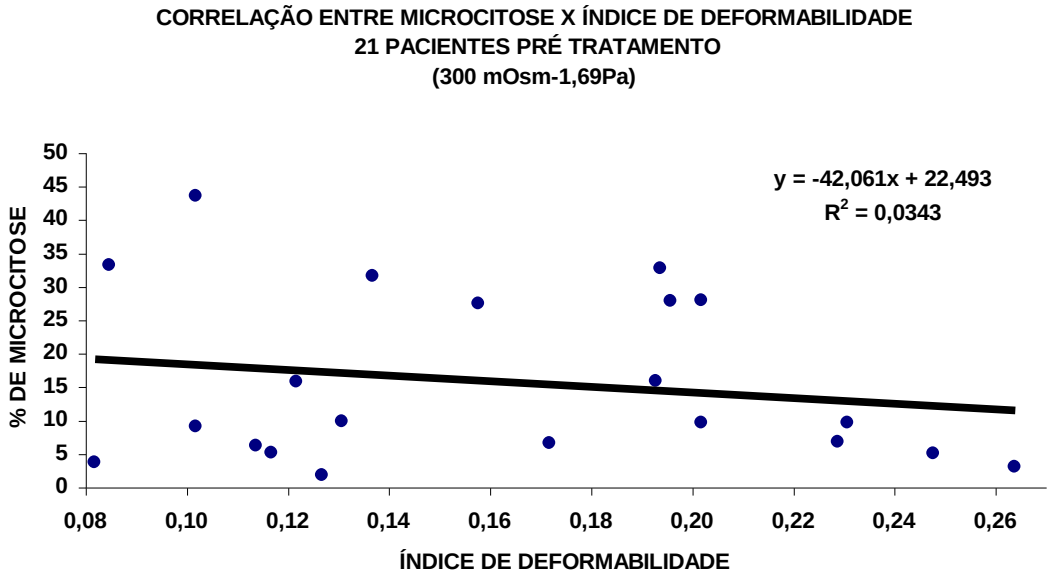


FIGURA 30

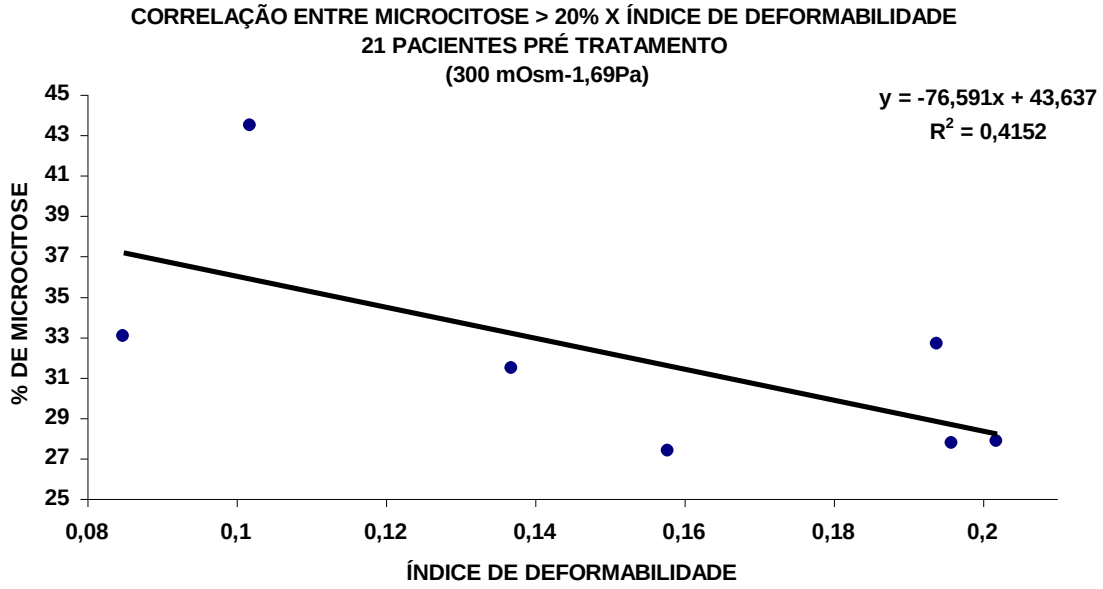


FIGURA 31

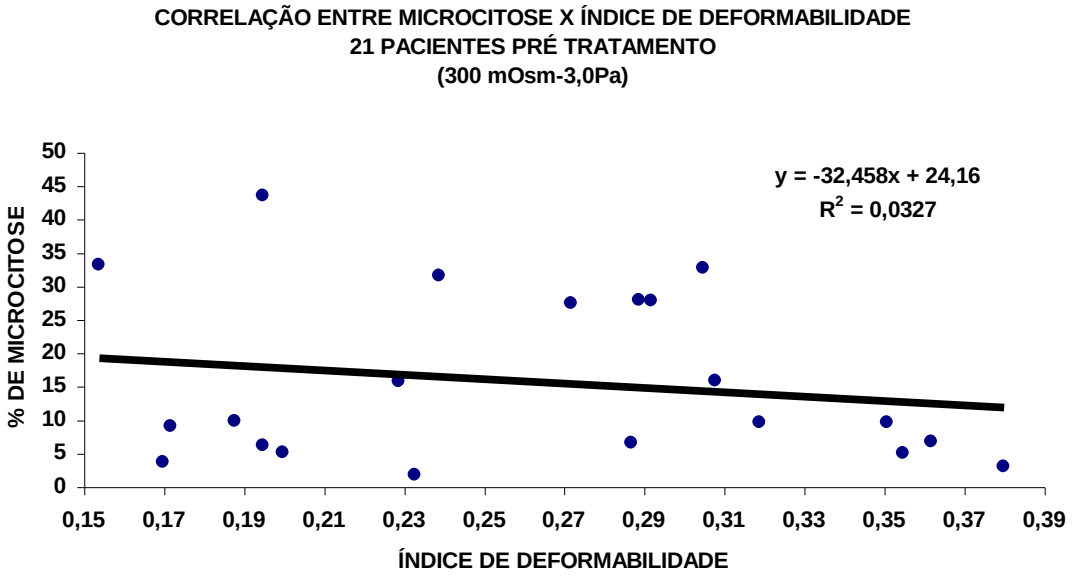


FIGURA 32

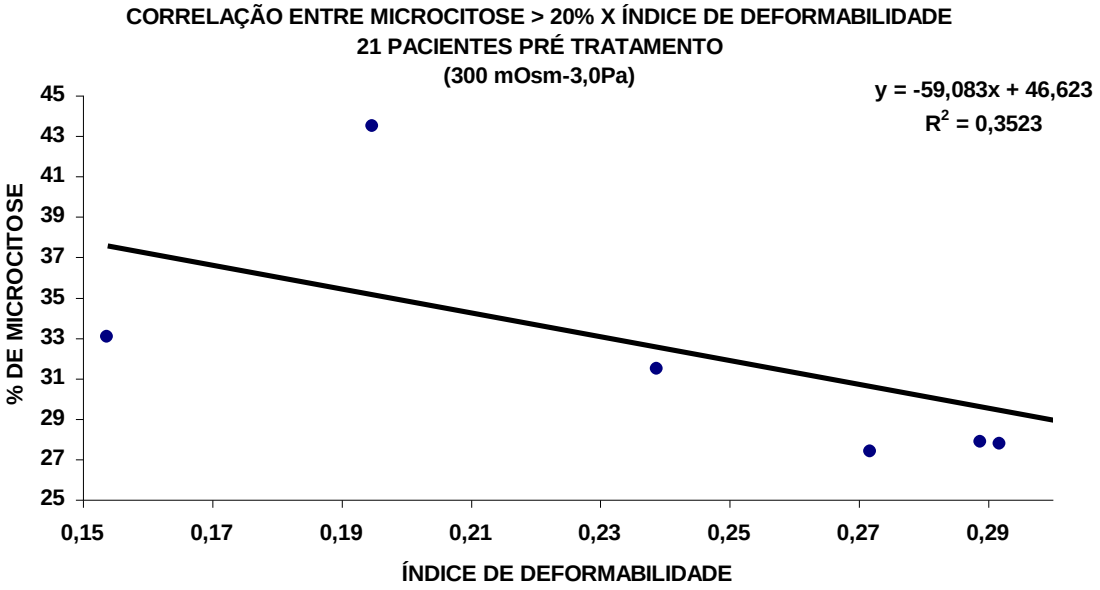


FIGURA 33

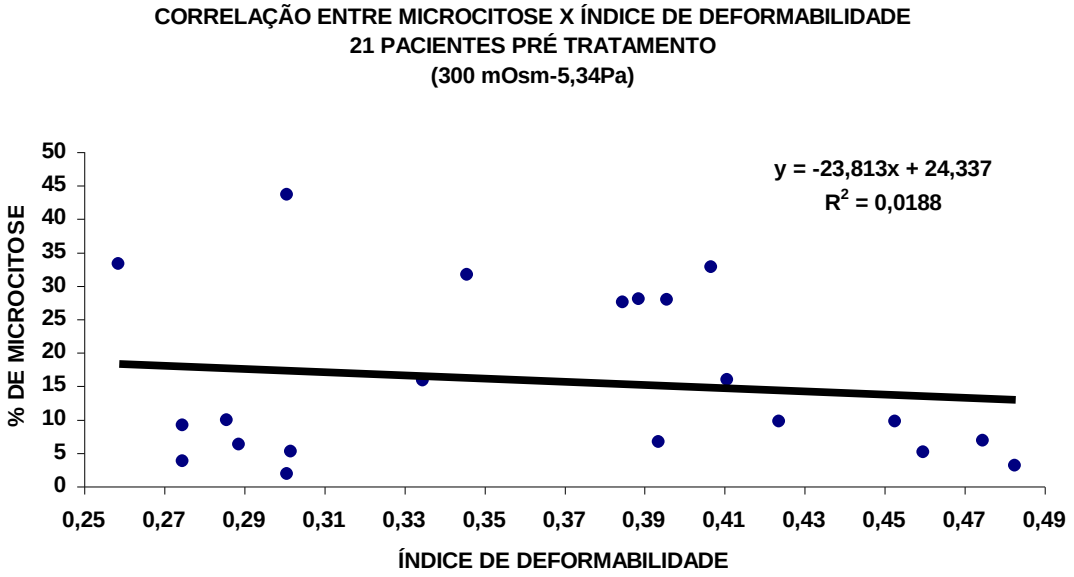


FIGURA 34

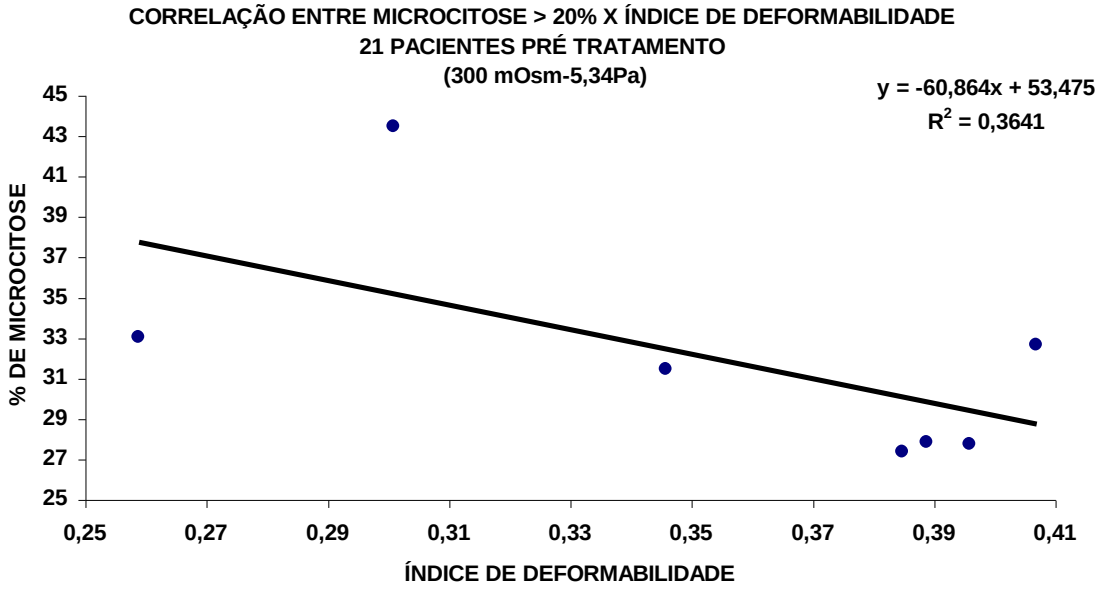


FIGURA 35

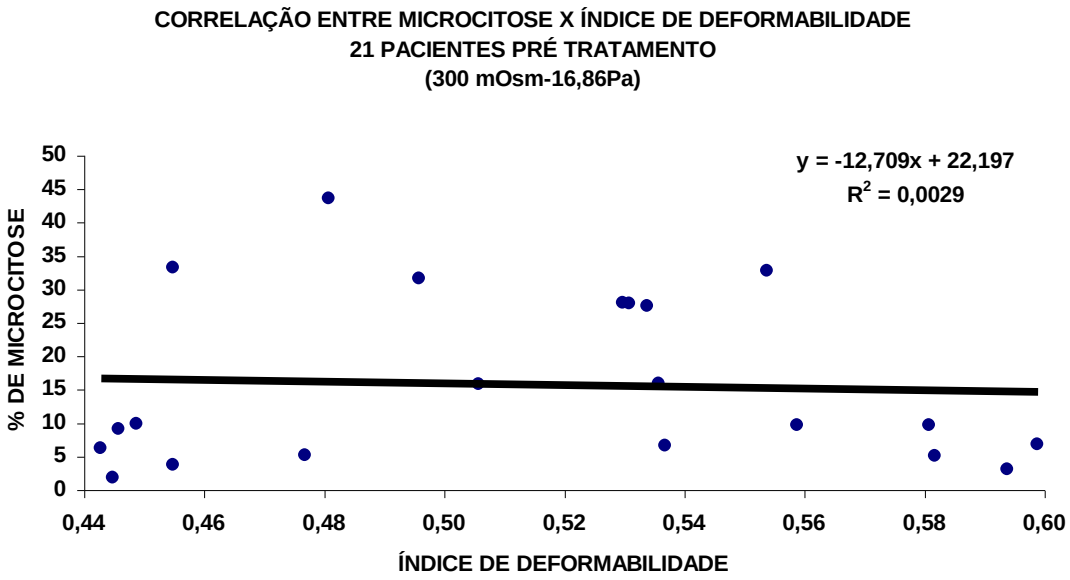


FIGURA 36

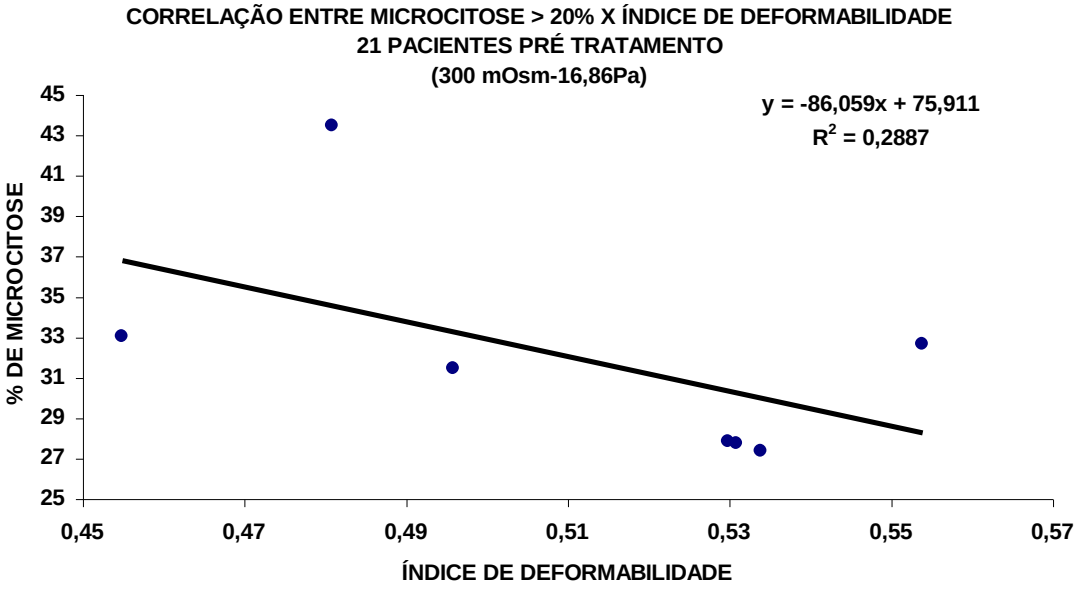


FIGURA 37

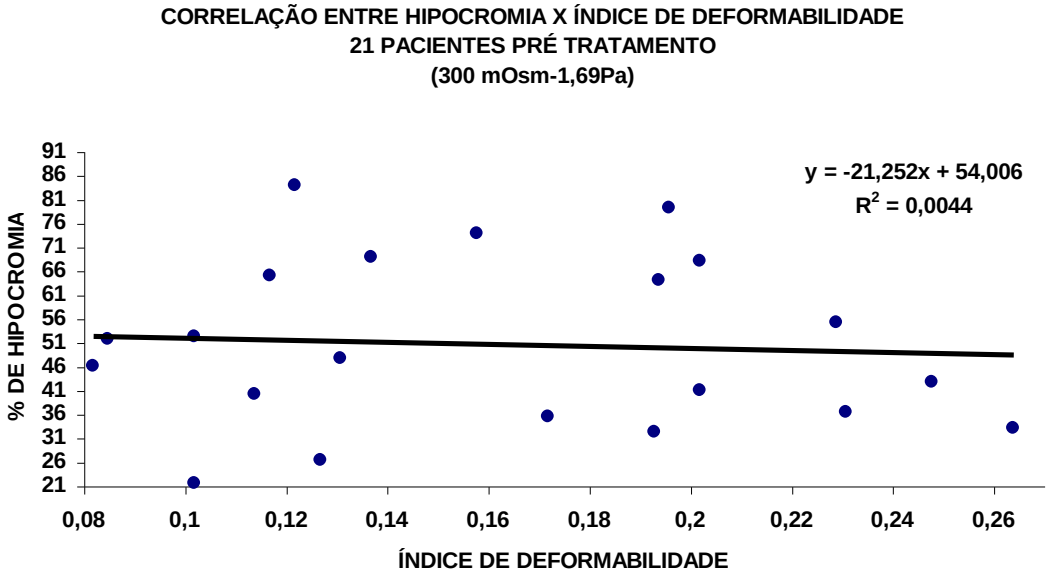


FIGURA 38

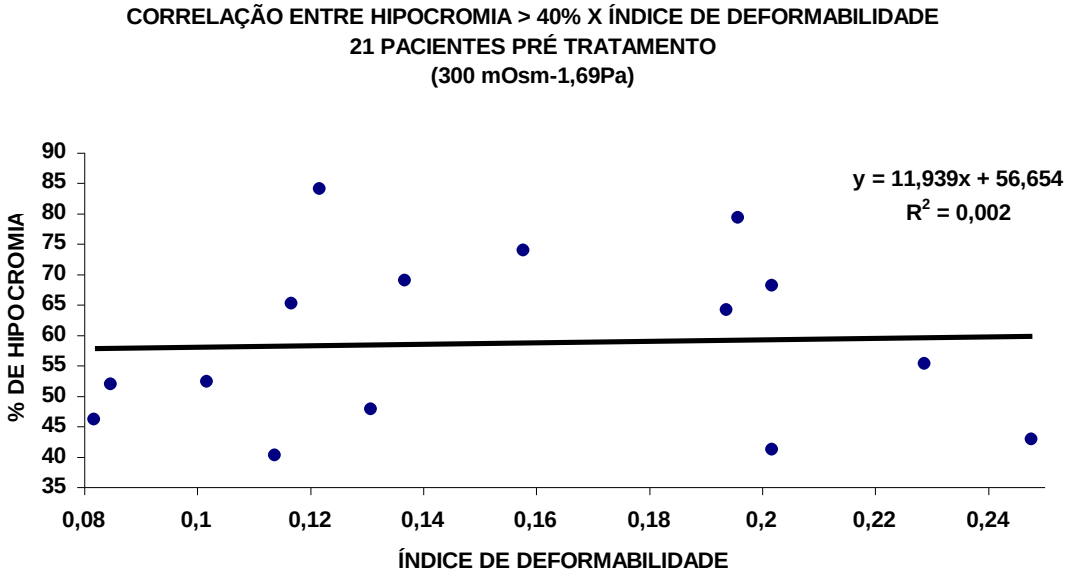


FIGURA 39

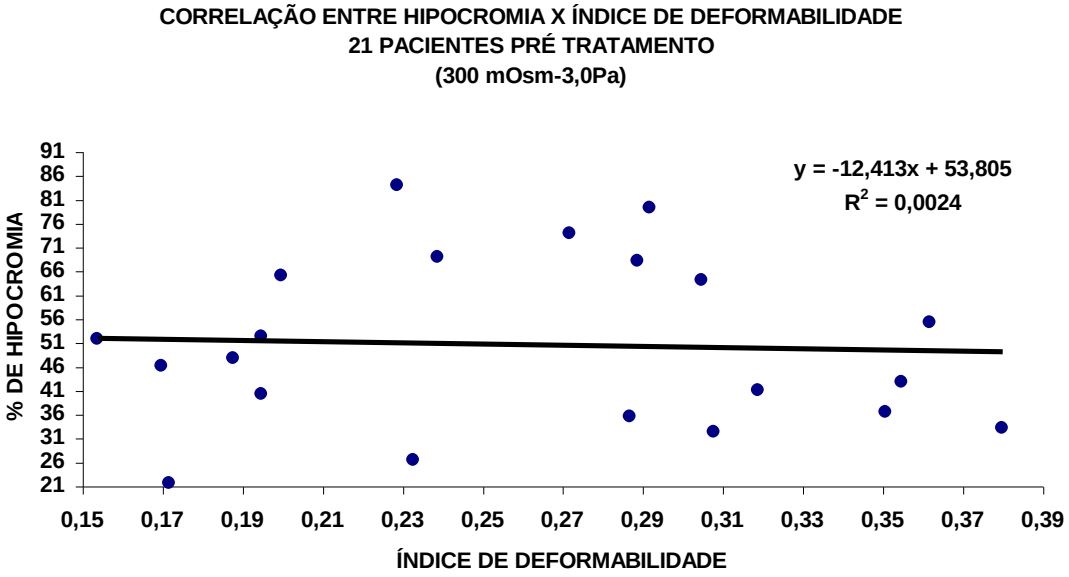


FIGURA 40

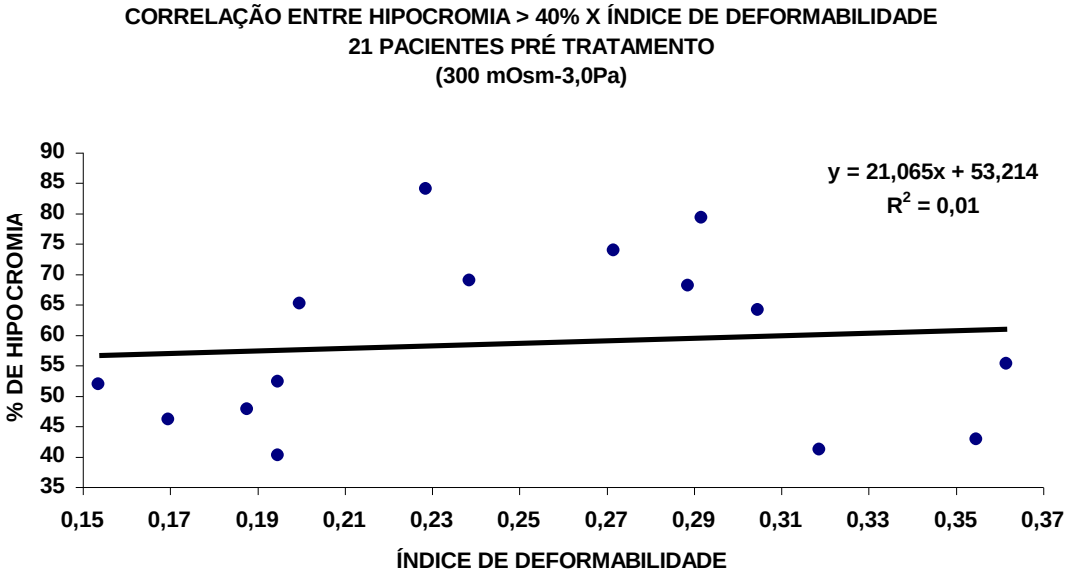


FIGURA 41

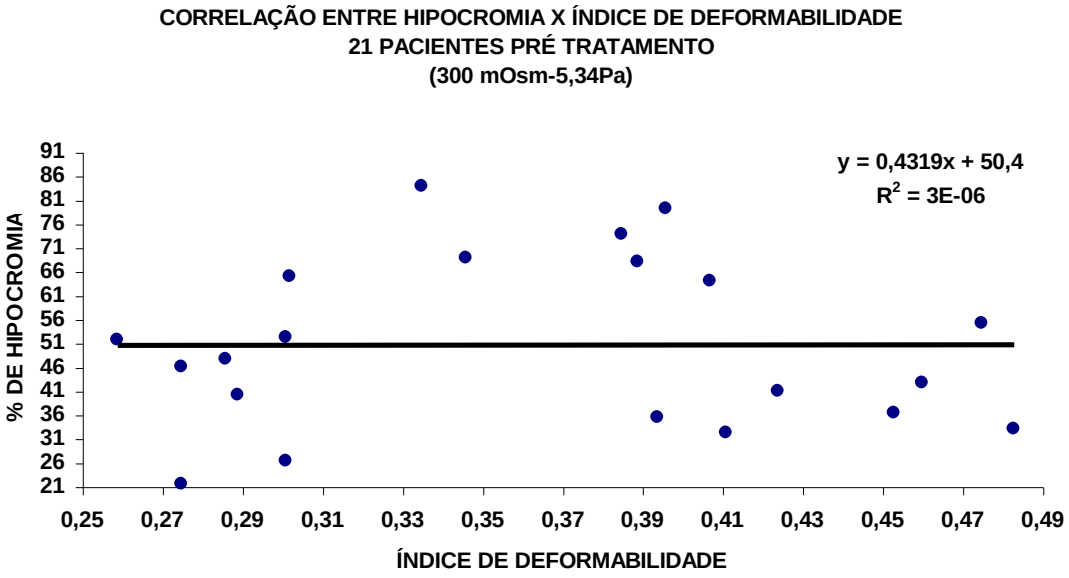


FIGURA 42

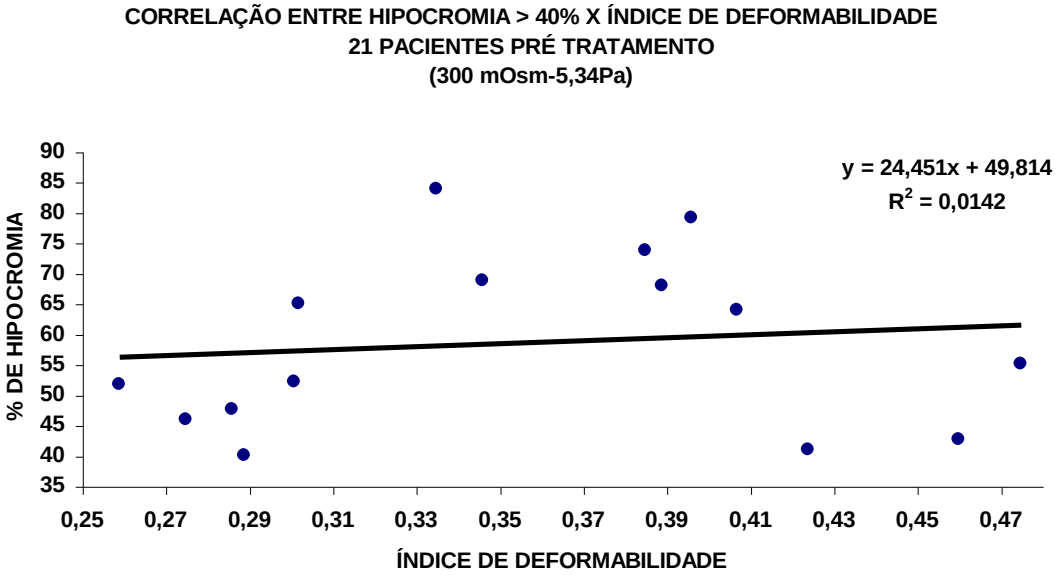


FIGURA 43

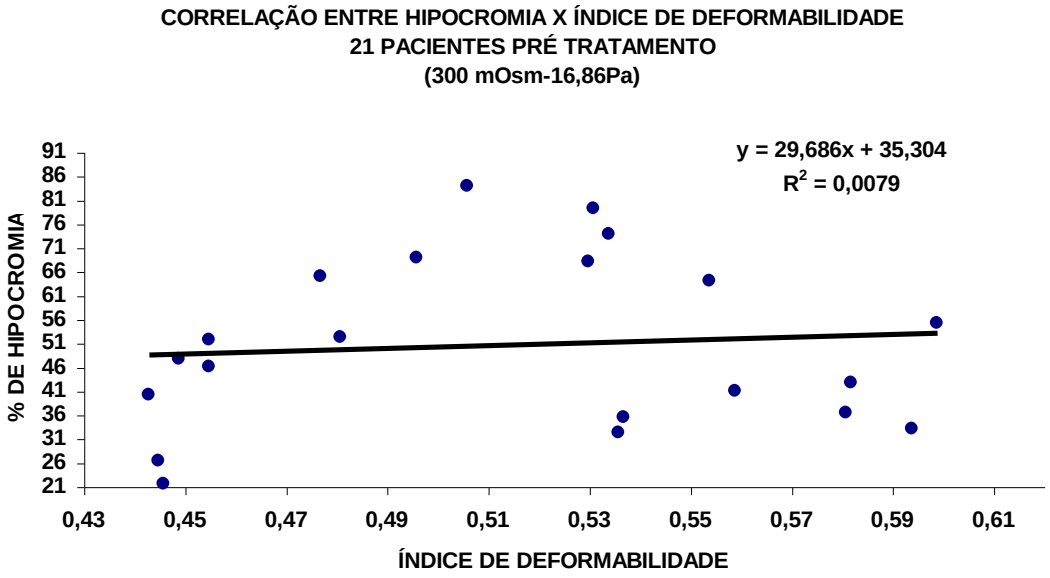


FIGURA 44

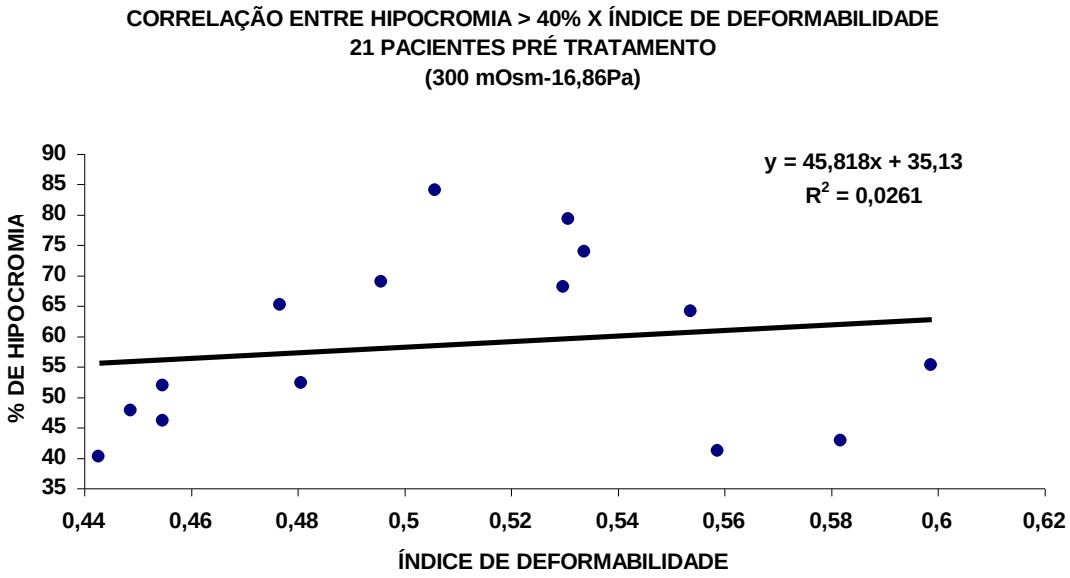


FIGURA 45

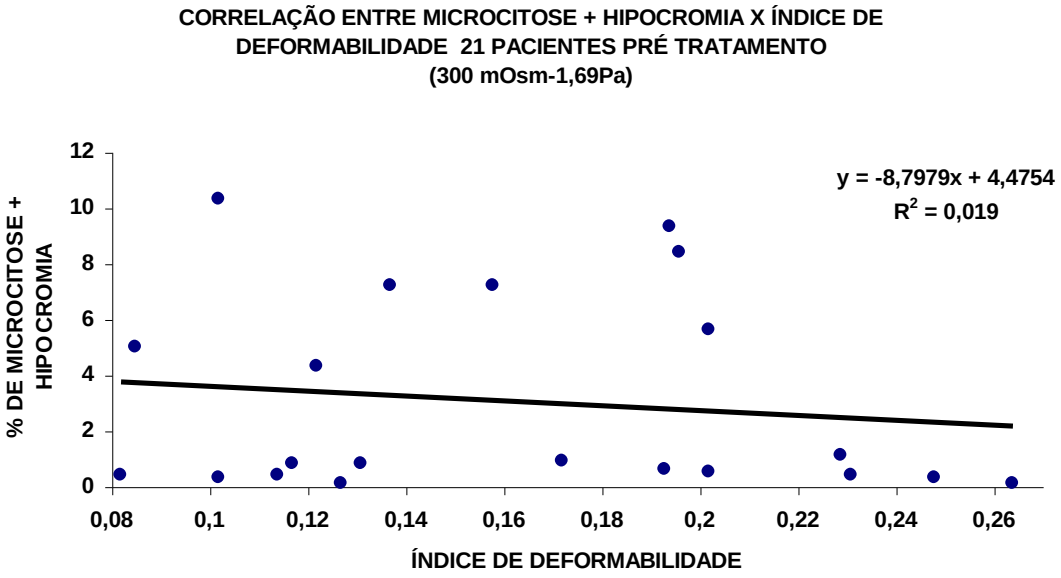


FIGURA 46

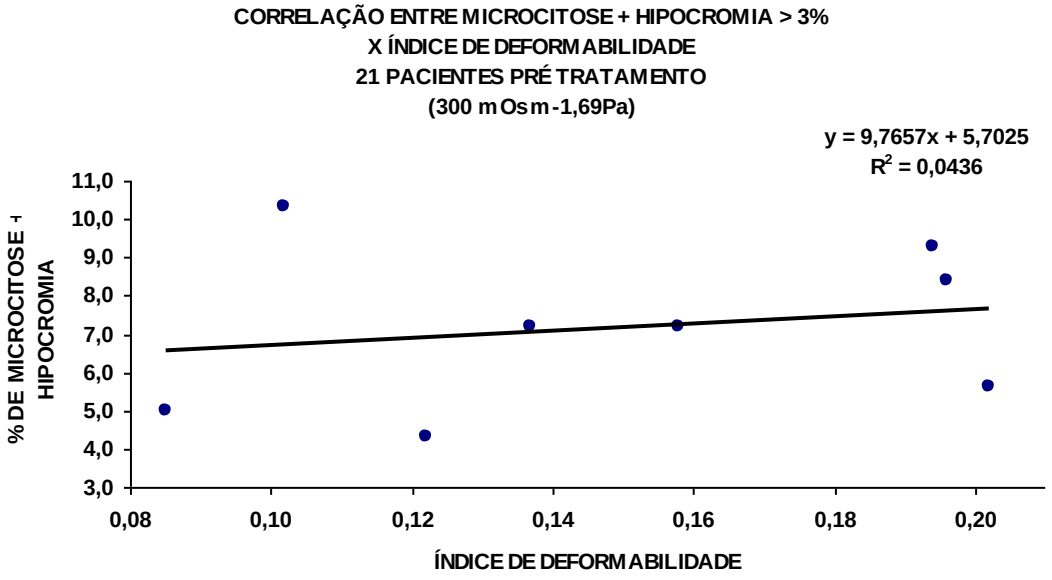


FIGURA 47

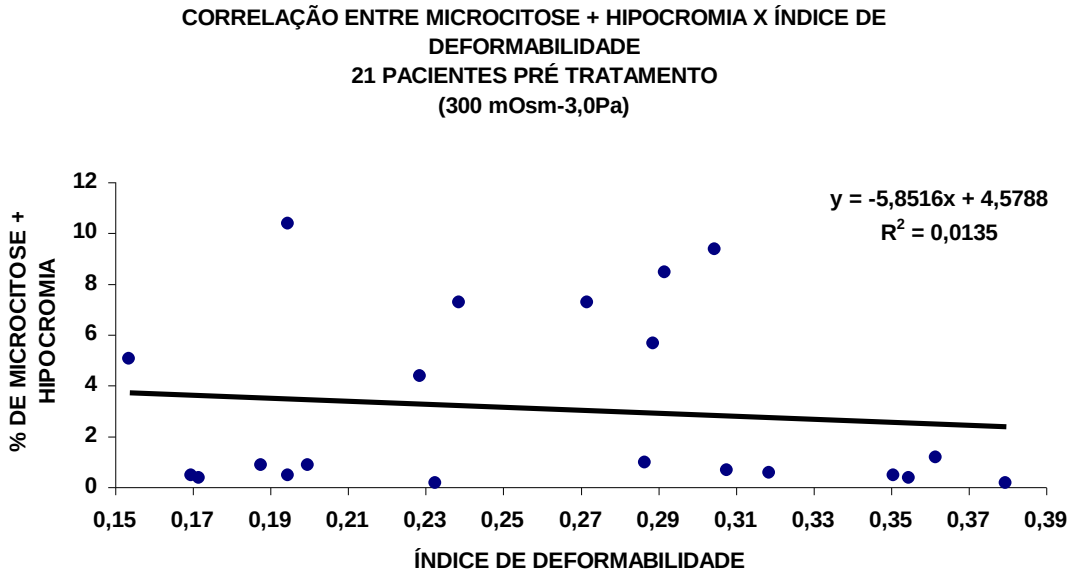


FIGURA 48

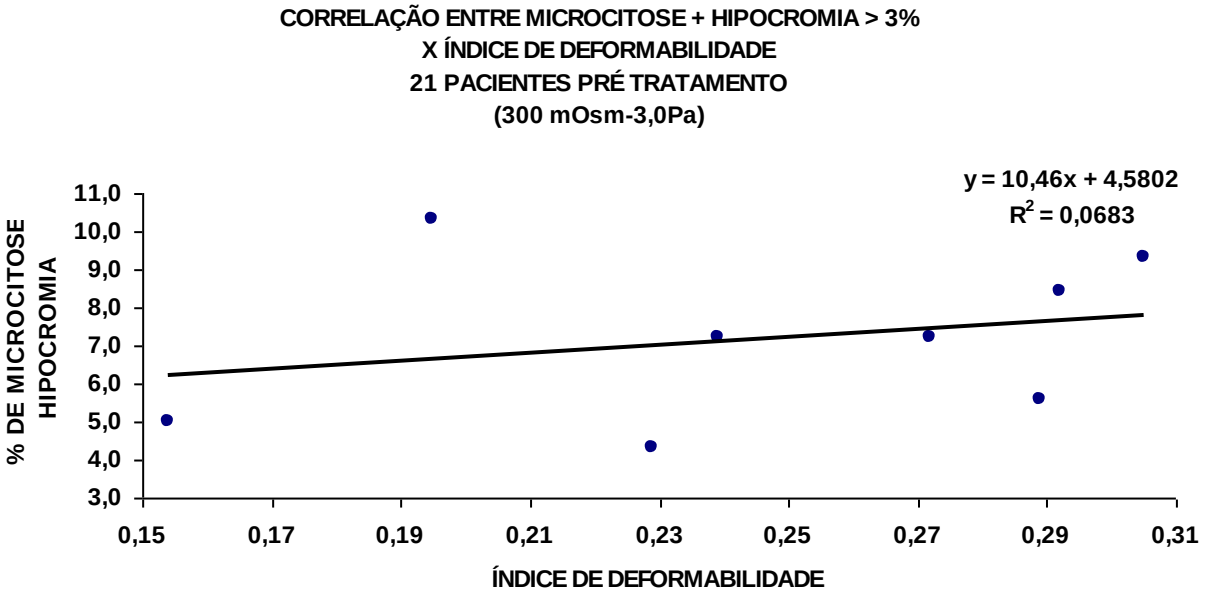


FIGURA 49

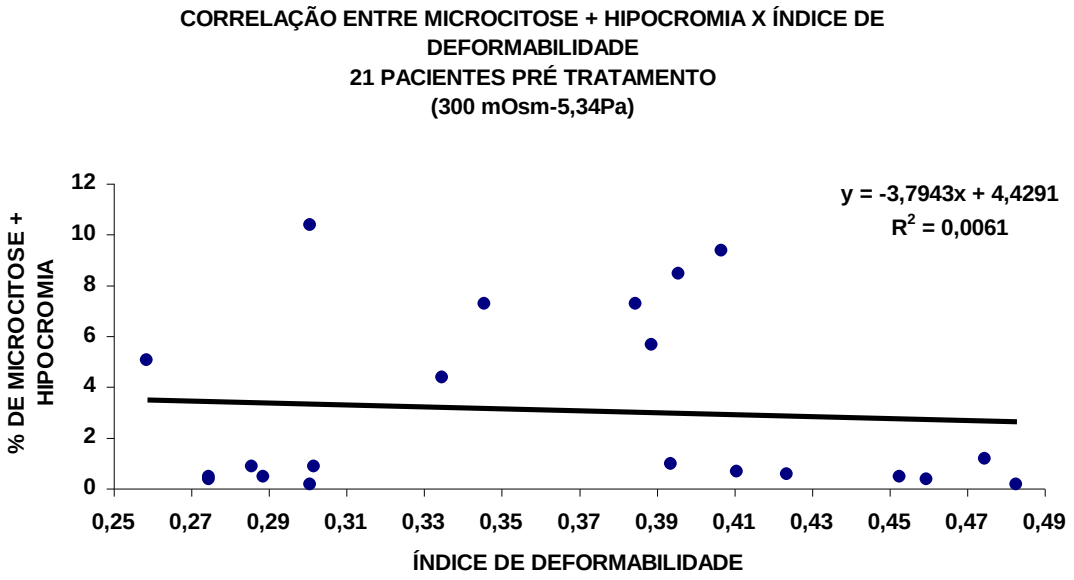


FIGURA 50

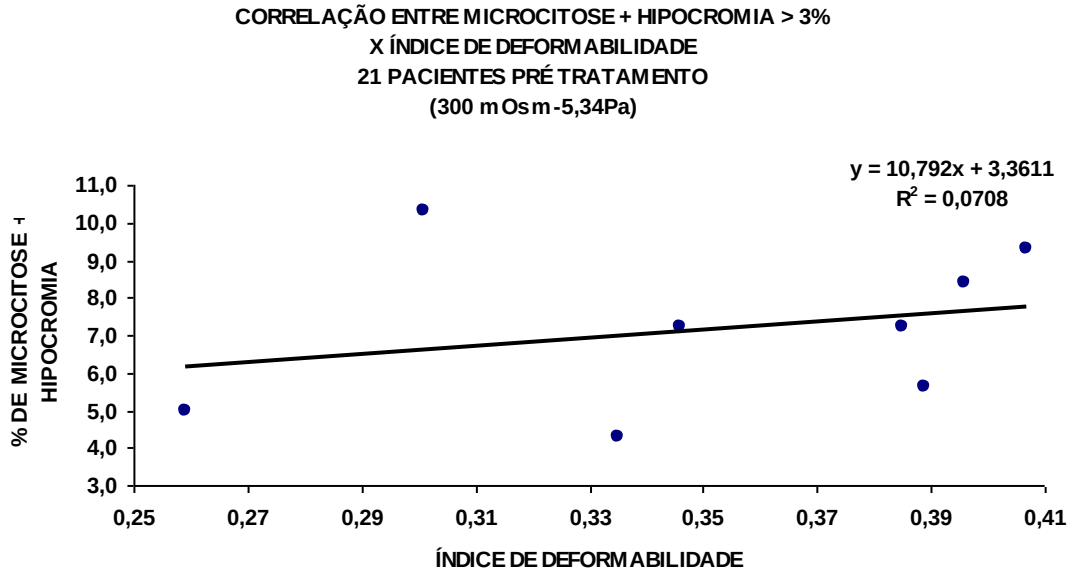


FIGURA 51

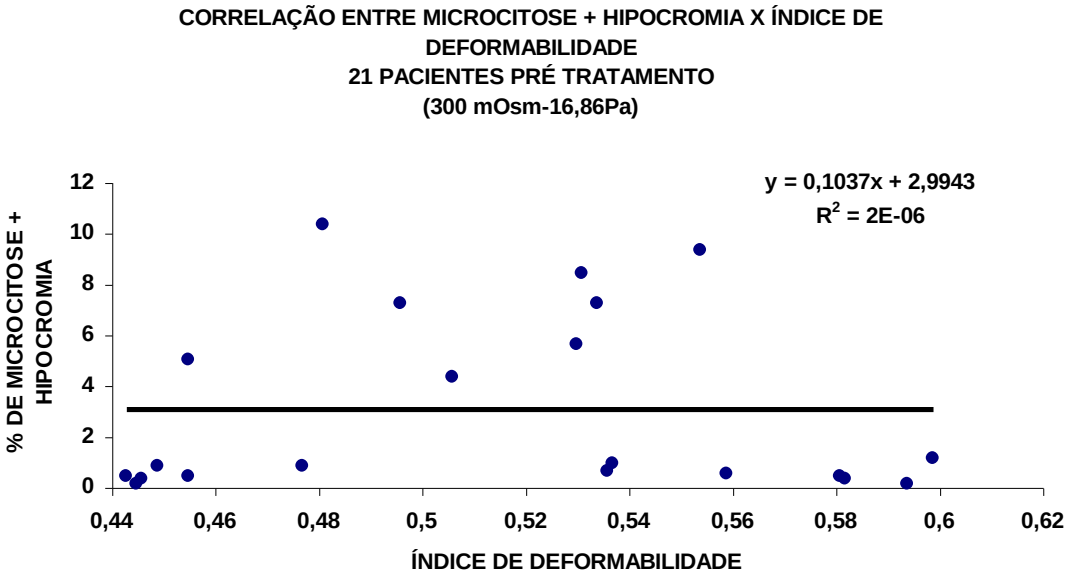
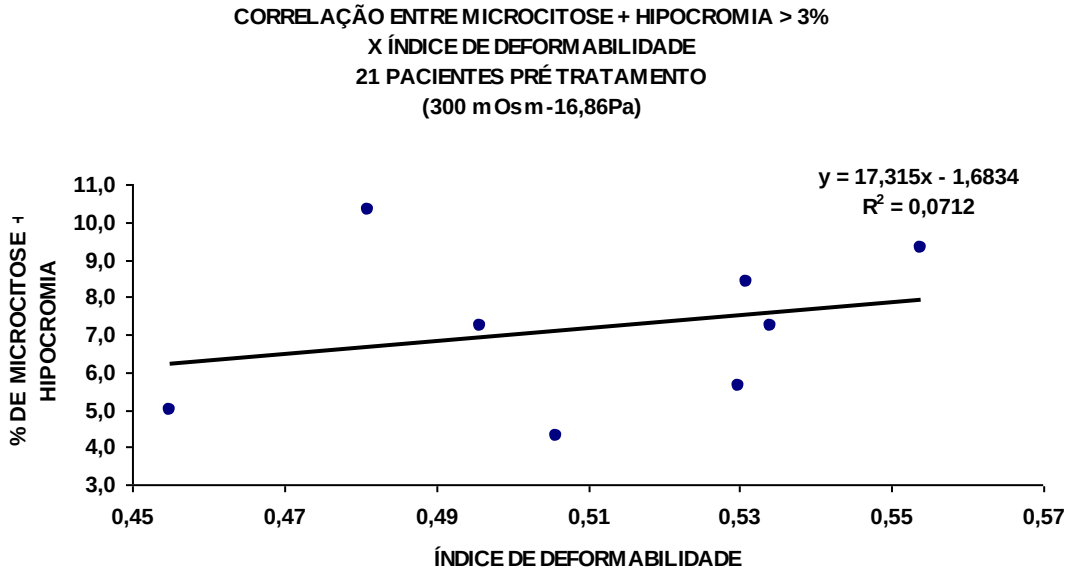


FIGURA 52



6. Discussão

A deformabilidade eritrocitária é um elemento importante para manter as características morfológicas e fisiológicas normais dos eritrócitos na circulação. A sua importância está bem documentada em uma série de anemias hemolíticas. Alguns autores relatam a sua importância na sobrevida da hemácia normal na circulação. Vários trabalhos demonstram alterações da deformabilidade em pacientes portadores de esferocitose hereditária, eliptocitose hereditária, talassemias, anemia falciforme, deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase e em anemias hemolíticas adquiridas (WEED, 1970; SMITH, 1979; MOHANDAS, 1979; CHASIS, 1989; SILVEIRA, 1997).

A deformabilidade eritrocitária em seres humanos é resultado de vários fatores, dependendo da ***geometria celular*** (volume, forma, relação superfície/volume), das ***propriedades físico-elásticas da membrana*** e do ***conteúdo citoplasmático*** (quantidade e qualidade da hemoglobina) (MOHANDAS, 1979; SCHÖENBEIN, 1981; STUART, 1985; FORTIER, 1988; REINHART, 1990; KUYPERS, 1990; MOHANDAS, 1993; JOHNSON, 1994; BOSCH, 1994; BEUTLER, 1995; LEE, 1999).

Em conseqüência disso, é de se esperar que patologias que cursam com anormalidades morfológicas eritrocitárias, ou com alterações da quantidade e/ou qualidade da hemoglobina, possam apresentar modificações da deformabilidade, e que tal fato possa estar envolvido na sua fisiopatologia.

Apesar da anemia ferropriva ser um quadro bastante comum na prática médica e caracterizada por acentuadas anormalidades morfológicas (aniso-poiquilocitose, microcitose, hipocromia, eliptócitos), a avaliação da deformabilidade eritrocitária tem sido pouco estudada nessa situação. Além disso,como as diferentes técnicas utilizadas para a avaliação da deformabilidade não podem ser comparadas entre si, os resultados dos trabalhos disponíveis têm sido controversos.

Nos últimos anos, alguns distúrbios trombóticos em microcirculação, observados em pacientes portadores de anemia ferropênica, foram atribuídos a anormalidades da deformabilidade eritrocitária, embora os estudos não sejam conclusivos (CHAN, 2000; HARTFIELD, 1997; KACER, 2001).

Em virtude da raridade de estudos e de dados controversos na literatura, foi nosso objetivo estudar a deformabilidade eritrocitária em um grupo de pacientes com anemia ferropriva, analisar alguns dos determinantes da deformabilidade e verificar se o tratamento da anemia corrigia possíveis alterações encontradas.

O nosso estudo avaliou 21 pacientes com anemia por deficiência de ferro, previamente documentada, antes e após o tratamento com sais de ferro.

A idade média dos pacientes foi de 40,1 anos (de 15 a 73 anos), sendo três do sexo masculino e dezoito do sexo feminino.

O nível de hemoglobina inicial variou de 5,8 a 11,0 g/dl (média de 8,52 g/dl), e o hematócrito variou entre 22,1% a 37,0% (média de 30,91%).

Após o tratamento com sais de ferro, houve melhora dos níveis de hemoglobina e hematócrito em todos os pacientes, que apresentaram valores de hemoglobina de 11,0 a 13,9 g/dl (média de 12,74 g/dl) e hematócrito de 37,8 a 53,2% (média de 42,29%), evidenciando boa resposta ao tratamento.

Os valores dos índices hematimétricos também mostraram melhora com o tratamento: VCM pré-tratamento de 63,2 a 86,9 fl (média de 75,65fl) e VCM de 83,1 a 105,0 fl (média de 90,90) pós-tratamento; HCM pré-tratamento de 16,7 a 26,8 pg (média de 20,82 pg) e HCM de 22,7 a 30,6 pg (média de 27,42 pg) pós-tratamento; CHCM de 22,4 a 33,6 g/dl (média de 27,42 g/dl) pré-tratamento e CHCM de 26,8 a 33,7 g/dl (média de 30,18 g/dl) pós tratamento.

A análise da morfologia eritrocitária à microscopia óptica comum revelou alterações importantes de forma e coloração das hemácias, freqüentes nos casos de ferropenia (TABELA 6). Houve melhora significativa após o

tratamento, porém vários pacientes ainda persistiam com anormalidades eritrocitárias à microscopia, na época da reavaliação.

A determinação da quantidade de células microcíticas e de células hipocrômicas, obtidas através do aparelho H•3, é um dado objetivo na análise das anormalidades morfológicas observadas na anemia ferropriva e na avaliação do resultado do tratamento instituído.

Antes do tratamento, observamos a média de micrócitos de 15,67% (variação de 1,6 a 43,4%) e de 50,56% células hipocrômicas (variação de 21,4 a 79,0%); a presença de hemácias ao mesmo tempo microcíticas e hipocrômica variou de 0,1 a 10,3% (média de 3,05%).

Após o tratamento houve nítida melhora dos valores, mas com vários casos mantendo ainda grande número de células microcíticas e hipocrômicas: células microcíticas com média de 4,14% (variação de 0,2 a 18,5%) e de células hipocrômicas com média de 8,13% (variação de 0,1 a 37,7%) e células ao mesmo tempo microcíticas e hipocrômicas variando de zero a 5,7% (média de 0,46%). Observamos que, apesar da correção da anemia, houve a manutenção das anormalidades morfológicas eritrocitárias em boa parte dos pacientes após o tratamento.

A carência de ferro dos pacientes foi documentada pelos seguintes resultados antes do tratamento: dosagem de ferro de 8 a 42 µg/dl (média de 17,85 µg/dl); CTLF de 283 a 449 µg/dl (média de 388,66 µg/dl); saturação de ferro de 1,0 a 9,0% (média de 4,19%) e dosagem de ferritina de 1,0 a 30,0 ng/ml (média de 5,8 ng/ml).

Depois da terapêutica, os valores encontrados foram: dosagem de ferro de 17,0 a 198,0 µg/dl (média de 64,95µg/dl); CTLF de 333 a 374 µg/dl (média de 312,76µg/dl); saturação de ferro de 5,0 a 82,0% (média de 21,61%) e dosagem de ferritina de 5,0 a 412,0 ng/ml (média de 45,0 ng/ml).

A análise dos resultados apresentados mostra que todos os pacientes melhoraram após o tratamento, que variou de 3 a 7 meses (média de 5 meses), e que os valores obtidos na reavaliação estão próximos da normalidade.

Os dados da literatura referentes ao estudo da deformabilidade eritrocitária em anemia ferropriva são controversos. As técnicas utilizadas para estudar a deformabilidade eritrocitária incluem a ***filtração***, a ***aspiração em micropipeta*** e a ***ectacitometria***. Elas geralmente avaliam um fator específico isolado envolvido nesse fenômeno e não podem ser equiparadas entre si, o que dificulta a comparação entre os estudos.

Nesta pesquisa, utilizamos a ***ectacitometria*** e realizamos as medidas de **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE" (ID) OU "ÍNDICE DE ELONGAÇÃO" (IE)** no aparelho **LORCA®**. As medidas foram obtidas cerca de 4 horas após a coleta das amostras de sangue.

As análises foram feitas em solução fisiológica de 300 mOsm, em *"shear stress"* progressivos de 0,3- 0,53- 0,95- 1,69- 3,0- 5,34- 9,48- 16,86 e 30,03 Pascais. Os valores obtidos do grupo controle estão na TABELA 7 e dos pacientes estudados, nas TABELAS 8 e 9.

A deformabilidade eritrocitária, determinada pelo **"ÍNDICE DE DEFORMABILIDADE" (ID)** à ***ectacitometria***, mostrou estar diminuída na anemia ferropriva.

O gráfico comparativo entre os valores médios de **ID** em pacientes antes do tratamento e o grupo controle (FIGURA 18), evidenciam diferença estatisticamente significante ($p < 0,007$) em *"shear stress"* de 0,95 a 30,05 Pa. A ausência de significância nos dois primeiros pontos pode estar relacionada a fatores inerentes ao aparelho. Sabe-se que os valores obtidos no início do processo podem se referir à homogeneização da amostra e acomodação dentro do recipiente de vidro do ***ectacitômetro***, o que pode explicar o resultado diferente nos dois pontos iniciais da curva de deformabilidade gerada.

Os resultados encontrados estão de acordo com alguns trabalhos apresentados na revisão bibliográfica, e que demonstram diminuição da deformabilidade eritrocitária na anemia por deficiência de ferro (LEVANDER, 1978; TILLMANN, 1980; YIP, 1983; ANDERSON, 2000).

Após o tratamento com sais de ferro, notamos que houve uma melhora na deformabilidade eritrocitária nos diversos *"shear stress"*. Comparando-se as curvas das médias dos valores da deformabilidade normal e pós-tratamento (FIGURA 19), observamos melhora dos índices, porém, ainda sem atingir completamente a normalidade ($p < 0,005$). Essa constatação pode estar relacionada à manutenção das anormalidades morfológicas eritrocitárias, mesmo após a correção dos níveis de hemoglobina.

Quando se analisa o gráfico com as curvas das médias de **ID** pré e pós-tratamento (FIGURA 20), encontra-se a manutenção da diferença, com valores estatísticos significativos ($p < 0,03$) apenas em baixos *"shear stress"* (1,69-3,0 e 5,34 Pa). Podemos supor que, em valores reduzidos de *"shear stress"*, alguns dos fatores que diminuem a deformabilidade eritrocitária na anemia ferropriva fiquem mais evidentes. Lembramos ainda que alguns pacientes ainda permaneciam com as alterações morfológicas decorrentes da ferropenia por ocasião da reavaliação final.

YIP et al (1983) relataram diminuição da deformabilidade eritrocitária em baixos "*shear stress*". Quando o valor de "*shear stress*" aplicado era aumentado progressivamente, a deformabilidade dos eritrócitos deficientes em ferro e dos "*ghost*" aproximava-se dos valores obtidos nas amostras normais. Isso indica, segundo esses autores, que a deformabilidade diminuída em baixos valores de "*shear stress*", é decorrente do decréscimo da viscoelasticidade da membrana, uma vez que os fatores viscosidade intracelular e relação superfície/volume foram retirados.

Após a constatação de que a deformabilidade eritrocitária é diminuída na anemia ferropriva, tentamos analisar a importância de alguns dos fatores.

Verifica-se nas FIGURAS de 21 a 28 que não encontramos correlação entre o índice de deformabilidade e o grau da anemia, medido pela dosagem de hemoglobina.

A correlação do **ID** com os parâmetros especiais obtidos pelo aparelho H•3 e indicativos dos determinantes da deformabilidade (volume celular e conteúdo de hemoglobina intracelular) foi importante para analisar alguns desses fatores. Quando se avalia a porcentagem de micrócitos em função dos diferentes "*shear stress*" em todos os pacientes, não se observa correlação importante, em vista da grande dispersão dos valores obtidos (FIGURAS 29, 31, 33, 35 e 37). Porém, quando se analisam apenas os casos com grande porcentagem de micrócitos (maior que 20%), notamos que existe uma tendência à obtenção de menores valores de **ID**. Ou seja, quanto maior a quantidade de micrócitos, maior é a diminuição da deformabilidade (FIGURAS 30, 32, 34, 36 e 38).

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por TILLMANN e SCHRÖTER (1980), que estudaram a deformabilidade eritrocitária através da técnica de ***filtração***. Os autores concluíram que o decréscimo de fluxo de eritrócitos através de filtros, de pacientes com anemia ferropriva, depende exclusivamente do seu volume reduzido.

REINHART (1992), estudando 14 pacientes com anemia ferropriva, pelas técnicas de ***filtração***, ***aspiração*** e ***ectacitometria***, não encontrou diferença entre o grupo controle e o grupo deficiente em ferro. O autor sugere até que a microcitose seria vantajosa "*in vivo*", facilitando a passagem do eritrócito através da microcirculação.

Sabemos que a microcitose é muito importante na diminuição da deformabilidade em várias doenças, muitas vezes com valor prognóstico. Maiores quantidades de micrócitos estão relacionadas à gravidade clínica na esferocitose hereditária e na eliptocitose hereditária. Verifica-se que, quanto pior o quadro clínico do paciente, mais anormalidades da membrana é

encontrado e mais prejudicada é a deformabilidade eritrocitária (LUX, 1996; SILVEIRA, 1997).

Outro determinante da deformabilidade eritrocitária analisado foi a viscosidade do meio interno eritróide, por meio da quantificação das células hipocrômicas. Poderíamos supor que, células hipocrômicas, com menor viscosidade citoplasmática, deformassem mais. Entretanto, quando se analisa a quantidade de células hipocrômicas, não se evidencia correlação com a deformabilidade, mesmo se esse índice está muito elevado, acima de 40% (FIGURAS de 39 a 44). Essa constatação pode sugerir que, nos pacientes estudados, esse fator, isoladamente, foi pouco importante nos resultados.

Neste trabalho, tivemos a oportunidade de utilizar o aparelho H•3, que fornece a porcentagem de hemácias de acordo com o seu tamanho (VCM) e coloração (HCM e CHCM). Assim, foi possível obter a quantidade de células ao mesmo tempo microcíticas e hipocrômicas.

Quando se analisa a concomitância de microcitose e hipocromia em todos os pacientes estudados, não se encontra correlação significativa com a deformabilidade eritrocitária (FIGURAS 45, 47, 49 e 51). Entretanto, se esse índice está acima de 3%, verifica-se uma discreta tendência à diminuição do **ID** nos "*shear stress*" estudados (FIGURAS 46, 48, 50 e 52). Nessa situação, podemos especular que, os dois fatores associados, microcitose e hipocromia, podem interagir, um diminuindo e o outro aumentando a capacidade de deformação da hemácia. Dependendo da sua intensidade, esses fatores podem anular ou somar os seus efeitos sobre a deformabilidade eritrocitária.

TILLMANN (1980) já havia observado que o efeito da redução do volume celular na deformabilidade do micrócito poderia ser contrabalançado, em parte, pelo aumento da fluidez da hemoglobina. Isso poderia explicar, segundo o autor, a discreta diminuição da flexibilidade do eritrócito na anemia ferropriva e também a pequena redução da sua sobrevida "*in vivo*".

Podemos observar que os diversos autores interessados na ***reologia eritrocitária*** são unânimes em afirmar que há necessidade de maiores estudos dessa propriedade do eritrócito, uma vez que os fatores determinantes da deformabilidade da hemácia interagem profundamente.

As técnicas até hoje disponíveis não possibilitam a avaliação dos elementos responsáveis pela deformação das hemácias separadamente. Além disso, parece que a ***geometria celular***, as ***propriedades viscoelásticas da membrana*** e a ***viscosidade intracelular*** podem interrelacionar-se de maneira sinérgica ou antagônica nas doenças eritrocitárias.

Dessa maneira, a diminuição da deformabilidade eritrocitária estaria relacionada com a maior rigidez da membrana e com a geometria celular alterada do micrócito. A viscosidade intracelular pode, em determinadas condições, compensar esses dois fatores, tornando a célula mais fluida e aumentando a sua deformabilidade.

O resultado aparentemente normal do **ID**, em algumas situações, poderia expressar o somatório das alterações antagônicas desses componentes.

A medida da deformabilidade tem sido usada somente como ferramenta de pesquisa para explicar a redução da sobrevida dos glóbulos vermelhos. Entretanto, novas evidências comprovam a importância da deformabilidade na função do eritrócito normal e alterado, o que deve ser considerado dado importante na avaliação das doenças do eritrócito.

Dos diversos métodos disponíveis na atualidade, para estudo da deformabilidade eritrocitária, a **ectacitometria** se destaca pela sua rapidez e versatilidade. A escassez de aparelhos tem limitado os estudos das alterações reológicas do sangue, por técnicos convenientemente treinados para operá-los, apenas para pesquisa científica.

Entretanto, a ocorrência bastante comum das anemias na prática médica e a possibilidade de tratamento eficaz devem ser um estímulo para estudos de

fenômenos fisiopatológicos. No caso específico da anemia ferropriva, há necessidade de compreender alguns fenômenos importantes que ocorrem na deficiência de ferro.

Recentemente foram relatados casos de acidente vascular cerebral, trombose cérebro-vascular, trombose de artéria carótida e oclusão da veia central da retina em pacientes portadores de anemia ferropriva. Os autores algumas vezes interrogam se alterações da deformabilidade eritrocitária poderiam favorecer o aparecimento desses fenômenos (ROUDAT, 1981; STHELE, 1991; AKINS, 1996; HARTFIELD, 1997; MEENA, 2000; CHAN, 2000; KACER, 2001).

O estudo da deformabilidade eritrocitária é plenamente possível, em Laboratório de Referência em Hematologia, com a técnica da ***ectacitometria***.

Os resultados obtidos confirmaram em grande parte o que se observa na literatura. No entanto, há necessidade de estudos específicos de casos selecionados, em longo prazo.

7. Conclusões

7.1. Na anemia ferropriva, a deformabilidade eritrocitária analisada pela ***ectacitometria*** está diminuida

7.2. O tratamento convencional adequado da deficiência de ferro melhora a deformabilidade eritrocitária, embora possa não corrigi-la completamente, devido à manutenção de algumas alterações morfológicas das hemácias.

7.3. Não houve correlação entre a deformabilidade eritrocitária e o grau da anemia, quando avaliada pela dosagem da hemoglobina.

7.4. Dos determinantes da deformabilidade eritrocitária, a geometria celular, representada pela porcentagem de micrócitos, parece ser o componente mais importante na carência de ferro.

7.5. A hipocromia, sugestiva da viscosidade citoplasmática, não mostra correlação com as alterações de deformabilidade eritrocitária.

8. Referências bibliográficas

1. AKINS, P.T.; GLENN, S.; NEMETH, P.M.; DERDEYN, C.P. Carotid artery thrombus associated with severe iron deficiency anemia and thrombocytosis. **Stroke**, v.27, p.1002-5, 1996.
2. ANDERSON, C.; ARONSON, I.; JACOBS, P. Erythrocyte deformability is reduced and fragility increased by iron deficiency. **Hematology**, v.4, p.457-60, 2000.
3. ARTMANN, G.M. Microscopic photometric quantification of stiffness and relaxation time of red blood cells in a flow chamber. **Biorheology**, v.32, p.553-70, 1995.
4. BAILAR, III; JOHN C.; MOSTELLER, F. **Medical uses of Statistics**. 2.ed. Boston, NEJM Books, 1992.
5. BALLAS, S.K.; TABBARA, K.F.; MURPHY, D. L.; MOHANDAS, N.; CLARK, M.R.; SHOHET, S.B. Erythrocyte deformability changes in autoimmune hemolytic anemia during developement of NZB mice and their (NZB/NZW)F_1 hybrid. **J. Clin. Lab. Immunol.**, v.16, p.217-22, 1985.
6. BASKURT, O.K.; MEISELMAN, H.J. Cellular determinants of low-shear blood viscosity. **Biorheology**, v.34, p.235-47, 1997.
7. BASKURT, O.K.; GELMONT, D.; MEISELMAN, H.J. Red blood cell deformability in sepsis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.157, p.421-27, 1998.
8. BASKURT, O.K.; MEISELMAN, H.J. Cellular determinants of low-shear blood viscosity. **Biorheology**, v.34, p.235-47, 1997.
9. BESSIS, M.; MOHANDAS, N. Deformability of normal, shape-altered and pathological red cells. **Blood Cells**, v.1, p.315-21, 1975.

10.BESSIS, M.; MOHANDAS, N. La déformabilié des globules rouges, intérêt de as mesure en clinique. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, v.105, p.1568-70, 1975.

11. BESSIS, N.; MOHANDAS, N. Mesure continue de la déformabilité cellulaire par une méthode diffractométrique. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v.278, p.3263-65, 1974.

12. BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.; COLLER, B. S.; KIPPS, T. J. Williams. **Hematology.** 5.ed. New York, Mc Graw-Hill, 1995. v.1, p.406-41.

13. BOISSEAU, M. R. Haematological and general factors influencing sieving. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 41, 1981. Supplement 156.

14. BOSCH, F.H.; WERRE, J.M.; SCHIPPER, L.; STOELWINDER, B.R.; HULS, T.; WILLEKENS, F.L.A.; WICHERS, G.; HALIE, M.R. Determinants of red rlood cell deformability in relation to cell age. **Eur. J. Haematol**., v. 52, p.35-41, 1994.

15. BRANEMARK, P. I. Welcome address. **Scand. J. Clin. Lab. Invest**., v.41, 1981. Supplement 156.

16. BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística Básica**, 4.ed., Atual, São Paulo, 1987.

17. CARD, R.T.; MOHANDAS, N.; PERKINS, H. A.; SHOET, S.B. Deformability of stored red blood cells. **Transfusion**, v.22, p.96-101, 1982.

18. CARD, R.T.; WEINTRAUB, L.R. Metabolic abnormalites of erythrocytes in severe iron deficiency. **Blood**, v.37, p.725-31, 1971.

19. CARD, R.T.; MOHANDAS, N.; PERKINS, H.A.; SHOHET, S., B. Deformability of stored red blood cells. **Transfusion**, v. 22, p.96-111, 1982.

20. CHAN, A.K.C.; VEBER, G. Prothrombotic disorders and ischemic stroke in children. **Semin. Pediatr. Neurol.**, v.7, p.301-8, 2000.

21. CHASIS, J.A.; MOHANDAS, N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. **J. Cell Biol.**, v.103, p.343-50, 1986.

22. CHASIS, J.A.; PRENANT, M.; LEUNG, A.; MOHANDAS, N. Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. **Blood**, v.74, p.1112- 20, 1989.

23. CHASIS, J.A.; SCHRIER, S.L. Membrane deformability and the capacity for shape change in the erythrocyte. **Blood**, v.74, p.2562-68, 1989.

24. CHIEN, S. Determinants of blood viscosity and red cell deformability. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.7-12, 1981.

25. CHUNCHARUNEE, S.; UNGKANONT, A.; ANGCHAISUKSIRI, P.; ROJANASTHEIN, S.; ARCHARARIT, N.; JOOTAR, S.; BUNYARATAVEJ, A.; ATICHARTACARN, V. Etiology and incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in thai patients with extreme thrombocytosis. **J. Med. Assoc. Thai.**, v.83, p.95-100, 2000.

26. CHUNG, T.W.; HO, C.P. Changes in viscosity of low shear rates and viscoelastic properties of oxidative erythocyte suspensions. **Clin. Hemorheol. Microcirc**., v.21, p.99-103, 1999.

27. CLARK, M.R.; MOHANDAS, N.; SHOHET, B. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. **Blood**, v.61, p.899-910, 1983

28. CUMMINGS, D.M.; BALLAS, S.K.; ELLISON, M.J. Lack of effect of pentoxifylline on red blood cell deformability. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 32, p.1050-53, 1992.

29. ENANS, E.; MOHANDAS, N. Developements in red cell rheology at the Institut de Pathologie Cellulaire**. Blood Cells**, v.12, p.43-56, 1986.

30. ENGSTRÖEM, K.G.; LÖFVENBERG, E. Treatment of Myeloproliferative disorders with hydroxyurea: effects on red blood cell geometry and deformability. **Blood**, v.91, p.3986-91, 1998.

31. EVANS, C.R.; CHAPMAN, D. Red blood cell biomembrane structure and deformability. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.99-109, 1981. Supplement 156.

32. EVANS, E.; MOHANDAS, N. Developments in red cell rheology at the Institut de Pathologie Cellulaire. **Blood Cells**, v.12, p. 43-56, 1986.

33. FICHER, T.M. Erythrocyte deformation under shear flow. **Blood**, v.73, p.1074-75, 1989.

34. FORTIER, N.; SNYDER, L. N.; GARVER, F.; KIEFER, C.; McKENNEY, J.; MOHANDAS, N. The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. **Blood**, v.71, p.1427-31, 1988.

35. FORTIER, N.; SNYDER, M.; GARVER, F.; KIEFER, C.; McKENNEY, J.; MOHANDAS, N. The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane regidity. **Blood**, v.71, p.1427- 31, 1988.

36. FRANCESCHI, L.; BACHIR, D.; GALACTEROS, F.; TCHERNIA, G.; CYNOBER, T.; ALPER, S.; PLATT, O.; BEUZARD, Y.; BRUGNARA, C. Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. **J. Clin. Invest.**, v.100, p.1847-52, 1997.

37. HARDEMAN, M.R.; INCE, C. Clinical potential of in vitro measured red cell deformability, a myth? **Clin. Hemorheol. Microcirc.**, v.21, p.277, 1999.

38. HARTFIELD, D.S.; LOWRY, N.J.; KEENE, D.L.; YAGER, J.Y. Iron deficiency: a cause of stroke in infancts and children. **Pediatr. Neurol.**, v.16, p.50-3, 1997.

39. HEATH, B.P.; MOHANDAS, N.; WYATT, J.L.; SHOHET, S.B. Deformability of isolated red blood cell membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.691, p.211-9, 1982.

40. HOCHMTH, R.M.; MOHANDAS, N.; SPAETH, E.E.; WILLIAMSON, J.R.; BLACHSHEAR, P.L.; JOHNSON, D.W. Surface adhesion, deformation and detachment at low shear of red cells and white cells. **Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs**, v.18, p.325-34, 1972.

41. HOCHMUTH, R.M. Deformability and viscoelasticity of human erythrocyte membrane. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 41, p.63-6, 1981. Supplement 156.

42. HOFFMAN, R.; BENZ, E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J. **Hematology basic principles and practice.** New York, Churchill Linvingstone, 1991. p.264-302.

43. HUTTON, R.D. The effect of iron deficiency on whole blood viscosity in polycythaemic patients. **Br. J. Hematol.**, v.43, p. 191-9, 1979.

44. JOHNSON, R. M. Ektacytometry of red blood cells. **Methods Enzymol.**, v.173, p.35-55, 1989.

45. JOHNSON, R.M. Ektacytometry of red blood cells. **Subcell. Biochem.**, v.23, p.161-203, 1994.

46. JOHNSON, R. M. ; RAVINDRANATH, Y. Osmotic scan ektacytometry in clinical diagnosis. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v.18, p.122-129, 1995.

47. KACER, B.; HATTENBACH, L.O.; HÖRLE, S.; SCHARRER, I.; KROLL, P.; KOCH, F. Central retinal vein occlusion and nonarteritic ischemic optic neuropathy in 2 patients with mild iron deficiency anemia. **Ophthalmologica**, v.215, p.128-31, 2001.

48. KELLER, S.R.; SKALAK, R. Motion of a tank-treading ellipsoidal particle in a shear flow. **J. Fluid Mech.**, v.120, p.27-47, 1982.

49. KUMARAVEL, M.; SINGH, M. Aggregation and deformability of erythrocytes in leprosy. **Indian J. Exp. Biol.**, v.33, p. 408-15, 1995.

50. KUYPERS, F.A.; SCOTT, M.D.; SCHOTT, M.A.; LUBIN, B.; CHIU, D.T. Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. **J. Lab. Clin. Med.**, v.116, p.535-45, 1990.

51. LANGENFELD, J.E.; MACHIEDO, G.H.; LYONS, M.; RUSH, B.F.; DIKDAN, G.; LYSZ, T.W. Correlation between red blood cell deformability and changes in hemodynamic function. **Surgery**¸ v.116, p.859- 67, 1994.

52. LEBLOND, PF.; COULONBE, L. Evaluation of a simplified filtration technique for the routine measurement of erythrocyte

deformability. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.35-40, 1981. Supplement 156.

53. LEBLOND, P.F. ; COULONBE, L. The measurement of erythrocyte deformability using micropore membranes. **J. Lab. Clin. Med.**, v.94, p.133- 43, 1979.

54. LEE, G.R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; RODGERS, G.M. **Wintrobe's clinical hematology.** 10.ed. Baltimore, Lippincott Willians & Wilkins, 1999. v.1, p.193-227.

55. LEVANDER, O.A.; MORRIS, V.C. Effect of iron deficiency on the filterability of rat red blood cells (RBC). **Fed. Proc.**, v.37, p.487, 1978.

56. LINDE, T.; RONQUIST, G.; SANDHAGEN, B.; WIKSTRÖM, B.; FRITHZ, G.; PETTERSSON, L.; DANIELSON, B.G. Treatment of renal anaemia with recombinant human erythropoietin results in decreased red cell uptake of Ca^{45} **Nephron**, v.68, p.419-26, 1994.

57. LIU, S.C. ; DERICK, L.H. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: structure- function relationships. **Semin. Hematol.**, v.29, p.231- 43, 1992.

58. LUX, S.E.; FORGET, B.G.; PLATT, O.S. Inherited disorders of the red blood cell membrane. American Society of Hematology (ASH), p.1-9, 1996. [Section one: Red blood cells].

59. MAZERON, P.; MULLER, S. ; AZOUZI, H. Deformation of erythrocytes under shear: a small- angle light scattering study. **Biorheology**, v.34, p.99-110, 1997.

60. MEENA, A.K.; NAIDU, K.S.; MURTHY, J.M.K. Cortical sinovenous thrombosis in a child with nephrotic syndrome and iron deficiency anaemia. **Neurol. India**, v.48, p.292-94, 2000.

61. MEISELMAN, H.J. Morphological determinants of red cell deformability. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.27-34, 1981. Supplement 156.

62. MOHANDAS, N. Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties. **Biochem. Soc. Trans.**,v.20 , p.776-82, 1992.

63. MOHANDAS, N.; CHASIS, J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. **Semin. Hematol.**, v.30, p.171- 92, 1993.

64. MOHANDAS, N.; CLARK, M.R.; JACOBS, M.S.; SHOHET, S. B. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. **J. Clin. Invest.**, v.66, p.563- 73, 1980.

65. MOHANDAS, N.; GRONER, W. Cell membrane and volume changes during red cell development and aging. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.554, p.217-24, 1989.

66. MOHANDAS, N.; JOHNSON, A.; WYATT, J.;CROISILLE, L.; REEVES, J.; TYCKO, D.; GRONER, W. Automatic quantitation of cell density distribution and hyperdense cell fraction in RBC disorders. **Blood**, v.74, p.442-47, 1989.

67. MOHANDAS, N.; KIM, Y.R.; TYCKO, D.H.; ORLIK, J.; WYATT, J.; GRONR, W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. **Blood**, v.68, p.506-13, 1986.

68. MOHANDAS, N.; PHILLIPS, W.M.; BESSIS, M. Red blood cell deformability and hemolytic anemias. **Semin. Hematol.**, v.6, p 95-114, 1979.

69. NASH, G.B.; PARMAR, J.; REID, M.E. Effects of deficiencies of glycophorins C and D on the physical properties of the red cell. **Br. J. Haematol.**, v.76, p.282-87, 1990.

70. NORTON, J.M.; RAND, P.W. Decreased deformability of erythrocytes from smokers. **Blood**, v.57, p.671-74, 1981.

71. PIJPER, A. The diffraction method of measuring red blood cells. **J. Lab. Clin. Med.**, v.32, p.857-77, 1947.

72. REINHART, W. H. The influence of iron deficiency on erythrocyte deformability. **Br. J. Haematol**, v.80, p.550-5, 1992.

73. REINHART, W. H.; SINGH, A. Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.20, p.458-62, 1990.

74. ROUDAUT, M.F.L.; MANUAU, J.P.; BRICAUD, H.; BOISSEAU, M.R. Filterability and cerebro-vascular thrombosis. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.203-8, 1981. Supplement 156.

75. RUTHERFORD, R.B. Essencial hemodynamic principles. **Vascular surgery.** 4.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1995. v.1, p.18-36.

76. SALBAS, K. Effect of acute smoking on red blood cell deformability in healthy young and elderly non-smokers, and effect of verapamil on age and acute smoking-induced change in red blood cell deformability. **Scand. J. Clin Lab. Invest.**, v.54, p.411-16, 1994.

77. SCHÖNBEIN, H.C.; GAEHTGENS, P. What is red cell deformability ? **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.13-26, 1981. Supplement 156.

78. SCHÖNBEIN, H.S. ;WELLS, R. Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear. **Science**, v.165, p.288-91, 1969.

79. SCHRIER, S.L.; MOHANDAS, N. Globin-chain speciality of oxidation-induced changes in red blood cell membrane properties. **Blood**, v.79, p.1586-92, 1992.

80. SILVEIRA, P.; CYNOBER, T.; DHERMY, D.; MOHANDAS, N.; TCHERNIA, G. Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.108, p.391-9, 1997.

81. SMITH, J.E.; MOHANDAS, N.; SHOHET, S.B. Variability in erythrocyte deformability among various mammals. **Am. J. Physiol.**, v.236, p.H725-H30, 1979.

82. SPEICHER, D.W.; WEGLARZ, L.; DeSILVA, T.M. Properties of human red cell-spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of essential nucleation site. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.14775-82, 1992.

83. STEHLE, G.; BUSS, J.; HEENE, D.L. Noninfectious thrombosis of the superior sagittal sinus in a patient with iron deficiency anemia. **Stroke**, v.22, p.414, 1991.

84. STOLTZ, J. F.; RAVEY, J. C.; LARCAN, A.; MAZERON, P.; LUCIUS, M.; GUILLOT, M. Deformation and orientation of red blood cells in a simple shear flow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.41, p.67-75, 1981. Supplement 156.

85. STREEKSTRA, G.J.; HOEKSTRA, A.G.; HEETHAAR, R.M. Anomallous diffraction by arbitrarily oriented ellipsoids: applications in ektacytometry. **Applied Optics**, v.33, p. 7288-96, 1994.

86. STREEKSTRA, G.J.; HOEKSTRA, A.G.; NIJHOF, E.J.; HEETHAAR,R. M. Light scattering by red blood cells in

ektacytometry: Fraunhofer versus anomalous diffraction. **Applied Optics**, v.32, p.2266-72, 1993.

87. STUART, J. Erythocyte rheology. **J. Clin. Pathol.**, v.38, p.965-77, 1985.

88. TAKAKUWA, Y.; ISHIBASHI, T.; MOHANDAS, N. Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network. **Biorheology**, v.27, p.357-65, 1990.

89. TAY, R.T.S.; SUTERA, S.P.; ZAHALAK, G.I.; RAO, P.R. Membrane stress and internal pressure in a red blood cell freely suspended in a shear flow. **Biophisics**., v.51, p.915-24, 1987.

90. TILLMANN, W.; SCHÖTER, W. Deformability of erytrocytes in iron deficiency anemia. **Blut**, v.40, p.179-86. 1980.

91. TRACEY, M.C.; GREENAWAY, R.S.; DAS, A.; KAYE, P.H.; BARNES, A.J. A sSilicon micromachined device for use in blood cell deformability studies. **IEEE Trans. Biomed. Eng.**, v.42, p.751-61`, 1995.

92. TSE, W.T.; LUX, S.E. Red blood cell membrane disorders. **Br. J. Haematol.**, v.104, p.2-13. 1999.

93. WEED, R.I. The importance of erythrocyte deformability. **Am. J. Med.**, v.49, p.147-50. 1970.

94. YESILKAYA, A.; ERTUG, Z.; YEGIN, A.; MELIKOGLU, N.; BASKURT, O.K. Deformability and oxidant stress in red blood cells under the influence of halothane and isoflurane anesthesia. **Gen. Pharmacol**., v.31, p.33-6, 1998.

95. YIP, R.; MOHANDAS, N.; CLARK, M.; JAIN, S.; SHOHET, B. S.; DALLMAN, P. R. Red cell membrane stiffness in iron deficiency. **Blood**, v.l62, p.99-106, 1983.