DULCINEIA SAES PARRA

**DETERMINAÇÃO CINÉTICA DA HAPTOGLOBINA SÉRICA
EM PORTADORES DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS, CIRROSE
E HEPATITE VIRAL**

**Trabalho experimental apresentado à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo para obtenção do Grau de Mestre em
Farmácia e Bioquímica - Área de Análises Clínicas**

**São Paulo
1981**

Ao Prof.Dr. Gunter Hoxter

PELA ORIENTAÇÃO CRITERIOSA
DESTE TRABALHO

Aos meus pais

FULGÊNCIO E IRACEMA

dos quais sempre recebi apôio, amor e dedicação
e que me ensinaram a enfrentar todos os obstáculos
da vida com firmeza e resignação.

Ao meu marido

JOSE ROBERTO

pela compreensão, amor e estímulo que muito
contribuíram durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos e aos meus sogros

pelo carinho e incentivo
constantes.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Durval Mazzei Nogueira, que nos recebeu na Disciplina de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, permitindo o desenvolvimento de nossa carreira universitária.

- Ao Prof. Dr. Alexandre La Rocca Rossi, pela sincera amizade e colaboração.

- Ao Prof.Dr. Bruno Struffaldi e a todos os colegas da Disciplina de Bioquímica Clínica pelo apoio durante a realização deste trabalho.

- A Prof^a Dra^a Terezinha Verrastro de Almeida, Prof^a Dr^a Edna Strauss e ao Prof.Dr. Luiz Caetano da Silva, que gentilmente colaboraram para a obtenção do material biológico.

- Ao Dr. Amadeo Sáez-Alquēzar, que muito contribuiu no desenvolvimento de nossa carreira científica e profissional.

- A Sra. Rosa Maria Pelā, pela revisão linguística do texto.

- Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, que nos auxiliaram durante este trabalho.

- A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

ABREVIATURAS

AST	- Aspartato aminotransferase
ALT	- Alanina aminotransferase
CHE	- Colinesterase
B.T.	- Bilirrubina total
GGT	- Gama-glutamil transferase
Hp	- Haptoglobina
Ht	- Hematócrito
Hb	- Hemoglobina
CMHb	- Cianometahemoglobina
E.R.	- Eritrócitos
LD	- Lactato desidrogenase
HBsAg	- Antígeno de superfície do vírus B da hepatite
Anti-HBs	- Anticorpo anti-antígeno de superfície do vírus B da hepatite
Anti-Core	- Anticorpo anti-antígeno central do vírus B da hepatite
Anti-A	- Anticorpo anti-vírus A da hepatite

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Formação de complexos Hemoglobina-Haptoglobina...	4
1.3 Genética da Haptoglobina	5
1.4 Biossíntese da Haptoglobina	8
1.5 Degradação da Haptoglobina	10
1.6 Considerações sobre a Haptoglobina em Diversas Patologias	12
1.6.1 Processos Inflamatórios e Degenerativos...	12
1.6.2 Hepatopatias	14
1.6.3 Processos Hemolíticos	16
1.7 Aspectos Metodológicos	17
1.7.1 Medida da Atividade Peroxidásica do Complexo Hemoglobina-Haptoglobina	18
1.7.2 Métodos Imunoquímicos	19
1.7.3 Outros Métodos	20
2. PROPOSIÇÃO	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Material	24
3.1.1 Material biológico	24
3.1.2 Grupos de Estudo	24
3.1.2.1 Grupo Controle	24
3.1.2.2 Grupo de Pacientes com Anemias Hemolíticas	24

3.1.2.3	Grupo de Pacientes Cirróticos	28
3.1.2.4	Grupo de Pacientes com Hepatite	
	Viral	28
3.1.3	Determinação Cinética da Haptoglobina.....	31
3.1.3.1	Padrão de "pool" de Soros	31
3.1.3.2	Solução de Cianometahemoglobina...	31
3.1.3.3	Solução de Guaiacol	34
3.1.3.4	Solução de Peróxido de Hidrogênio.	34
3.1.4	Imunodifusão Radial	34
3.1.5	Aparelhagem Utilizada	35
3.1.5.1	Espectrofotômetro	35
3.1.5.2	Aparelhagem para Eletroforese....	35
3.1.5.3	Contagem Total de Eritrócitos.....	36
3.1.5.4	Radioimunoensaio	36
3.2	Métodos	36
3.2.1	Determinação Cinética de Haptoglobina.....	36
3.2.1.1	Curva de Calibração	37
3.2.1.2	Determinação da Atividade Peroxidã sica das Amostras	38
3.2.1.3	Cálculos	38
3.2.2	Determinação do Fenótipo da Haptoglobina Nativa	42
3.2.3	Dosagem de Bilirrubina	43
3.2.4	Contagem de Reticulócitos	44
3.2.6	Determinação das Atividades Enzimáticas ..	45

3.2.7	Determinação da Atividade Peroxidásica do Complexo Hemoglobina-Haptoglobina pelo Método Não Cinético	47
3.2.8	Determinação do Tempo de Protrombina ...	47
3.2.9	Marcadores Imunológicos da Hepatite.....	48
3.2.10	Determinação do Hematócrito	48
3.2.11	Método Estatístico	48
4.	RESULTADOS	50
5.	DISCUSSÃO	75
5.1	Determinação Cinética da Haptoglobina	75
5.2	Fenótipos da Haptoglobina	84
5.3	Valor da Haptoglobina nas Anemias Hemolíticas..	88
5.4	Valor da Haptoglobina na Cirrose	95
5.5	Valor da Haptoglobina na Hepatite Viral	100
6.	CONCLUSÕES	107
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

POLONOWSKI & JAYLE ¹²³, em 1938, descobriram a haptoglobina e posteriormente ¹²⁴ a isolaram do plasma humano, verificando tratar-se de uma proteína que se complexava à oxihemoglobina aumentando sua atividade peroxidásica.

Em 1946, JAYLE & GILLARD ⁷³, utilizando fracionamento salino, descobriram a existência de dois tipos de haptoglobinas: tipos I e II. SMITHIES ¹⁴⁶, através da análise eletroforética de 43 soros humanos, classificou-os em três grupos em relação aos tipos de haptoglobina: grupo I, grupo IIB (grupos I e II de JAYLE ⁷³, respectivamente) e grupo IIA. SMITHIES & WALKER ¹⁴⁷ estabeleceram que o controle genético dos tipos de moléculas de haptoglobina era efetuado por um par de genes alelos autossômicos: Hp^1 e Hp^2 , resultando os fenótipos $Hp1-1$ (grupo I) e $Hp2-2$ (grupo IIB), homozigotos e $Hp2-1$ (grupo IIA), heterozigoto.

JAYLE & BOUSSIER ⁷⁴, em 1954, isolaram a haptoglobina da urina de uma paciente com síndrome nefrótica e obtiveram uma fração proteica, eletroforeticamente pura, com mobilidade de alfa 2-globulina. Devido ao seu alto conteúdo de glicosamina e ácido N-acetilneuramínico a haptoglobina foi considerada como uma glicoproteína, pertencente ao grupo das mucoproteínas ¹²¹.

Um modelo estrutural para Hpl-1 foi proposto por SHIM & BEARN ¹⁴¹ no qual a haptoglobina, à exemplo das imunoglobulinas, seria constituída por duas cadeias leves (alfa) e duas pesadas (beta) unidas por pontes dissulfídicas ⁹⁰, sendo que as cadeias alfa representariam 19% e as cadeias beta, 81% do total da molécula (FIG. 1).

FIGURA 1. Modelo Estrutural da Haptoglobina, Segundo SHIM & BEARN ¹⁴¹.

SMITHIES et al. ¹⁴⁹, através da análise eletroforética dos polipeptídeos resultantes da dissociação da molécula de haptoglobina com uréia e mercaptoetanol, verificaram que a Hpl-1 apresenta dois tipos de cadeia polipeptídica: a primeira com grande mobilidade eletroforética, denominada alfa¹ e a segunda, apresentando várias subfrações com menor mobilidade, designada beta. As cadeias alfa¹ subdivi-

dem-se, de acordo com as velocidades de migração, em α^{1F} ("fast" = rápida) e α^{1S} ("Slow" = lenta). A Hp2-2 possui um único tipo de cadeia alfa (α^2), com tamanho cerca de duas vezes o das cadeias α^1 . O tipo Hp2-1 apresenta a cadeia α^2 juntamente com a α^{1F} ou α^{1S} . A diferença estrutural entre as cadeias α^{1F} e α^{1S} consiste na presença de um resíduo de ácido glutâmico na posição 54 da cadeia α^{1S} , que é substituído pela lisina na cadeia α^{1F} (12). A digestão quimotríptica da cadeia α^2 (142 aa., PM=16000) resultou nos mesmos peptídeos da cadeia α^1 (83 aa., PM = 9100) juntamente com um polipeptídeo adicional. BLACK & DIXON¹² sugeriram que a cadeia α^2 originava-se de um "crossing-over" do gene estrutural Hp^1 , com posterior deleção nas porções de DNA (ácido desoxirribonucleico) que codificavam 12 aa. da cadeia α^1 . Portanto, a cadeia α^2 seria formada pela junção de duas cadeias α^1 com exclusão de 24 aminoácidos.

O peso molecular para cada um dos três tipos de haptoglobina expressos como valor médio são, respectivamente¹³⁸: $\text{Hp}1-1 = 80000$, $\text{Hp}2 = 120000$ e $\text{Hp}2-2 = 160000$. A $\text{Hp}1-1$ é um monômero, apresentando a fórmula molecular $(\alpha_1\beta)_2$ ⁹¹. As moléculas de $\text{Hp}2-2$ apresentam estrutura polimérica⁴⁹, sendo cada polímero constituído de uma cadeia α^2 e uma beta, unidas por pontes dissulfídicas, apresentando estruturas tais como: $\alpha^2_3\beta_3$, $\alpha^2_4\beta_4 \dots \alpha^2_8\beta_8$, com fórmula geral igual a $(\alpha_2\beta)_n$ e peso molecular variável. A estrutura da $\text{Hp}2-1$ é resultante da incorporação de polipeptídeos α^1 aos

polímeros formados pela cadeia alfa² (com alto poder de polimerização), formando polímeros híbridos, com a seguinte fórmula molecular: $(\alpha_1\beta)_n \cdot (\alpha_2\beta)_n$ ⁷⁰.

1.2 Formação de Complexos Hemoglobina-Haptoglobina

A hemoglobina combina-se com a Hpl-1 estequiometricamente (1:1) quando em quantidades equimolares, ou em presença de excesso de hemoglobina²⁰.

NAGEL & GIBSON¹⁰⁴ sugeriram que as moléculas de haptoglobina não reagem diretamente com a molécula tetramérica da hemoglobina, mas com dímeros $\alpha^A\beta^A$, resultando com complexos do tipo $\beta^A\alpha^A\beta^A\alpha^A$ (onde α^A e β^A correspondem às cadeias polipeptídicas da hemoglobina tipo A; A e B representam as cadeias de haptoglobina. Existem quatro sítios de ligação na molécula de haptoglobina, sendo dois para as cadeias alfa e dois para as cadeias beta da hemoglobina²⁰, sendo que as últimas têm afinidade muito baixa pela haptoglobina²⁵.

Estudos da formação de complexos entre a haptoglobina humana e hemoglobina de vários animais (coelho, carneiro, galinha, etc.) demonstram que os complexos formados apresentam características diferentes à medida que aumenta a distância filogenética entre as espécies¹³².

A carboxihemoglobina, metahemoglobina e cianometahemoglobina ligam-se à haptoglobina na mesma intensidade que a oxihemoglobina¹²¹. Outros tipos de hemoglobina

tais como: $A_2(\alpha_2^A \alpha_2^A)$, $I(\alpha_2^A \beta_2^A)$, Lepore (α_2^A Lepore₂), $S(\alpha_2^A \beta^{6Val}_2)$, $C(\alpha_2^A \beta^{6Lys}_2)$ e D_{Punjab} apresentam afinidade pela haptoglobina humana. Entretanto, as hemoglobinas $H(\beta_4^A)$ e Barts (j_4^F) não formam complexos com a haptoglobina devido à ausência de cadeias α^{121} .

1.3 Genética da Haptoglobina

A hipótese genética mais simples para a hereditariedade da haptoglobina é a de que um único par de genes alelos co-dominantes, Hp^1 e Hp^2 , seriam responsáveis pelos três fenótipos comuns existentes: $Hp1-1$, $Hp2-2$ (homozigotos) e $Hp2-1$ (heterozigoto)¹⁴⁷.

A descoberta de outros fenótipos, através da despolimerização da haptoglobina purificada, tais como: $Hp1^F-1^F$, 1^F-1^S , $2-1^F$, $2-1^S$ levaram SMITHIES et al.¹⁴⁹ a proporem a existência de três genes alelos: Hp^{1F} , Hp^{1S} e Hp^2 , que controlariam a produção das cadeias polipeptídicas correspondentes (α^{1F} , α^{1S} e α^2). A cadeia beta parece não ser afetada pelo loco Hp ¹⁵⁰.

Não foram observados tipos variantes de haptoglobina em animais¹²¹.

Os genes alelos Hp^{1F} e Hp^{1S} parecem ter origem na alteração de um único par de bases no DNA, visto que a diferença estrutural entre as cadeias α^{1F} e α^{1S} consiste na substituição de um único aminoácido na posição 54^{12,26}. 0

gene Hp^2 pode ter-se originado da duplicação parcial dos genes Hp^{1S} e Hp^{1F} por "crossing-over" não homólogo, durante a meiose em indivíduos heterozigotos para Hp^{1S} e Hp^{1F} ^{12, 26}. Por este mecanismo originar-se-ia um novo cromossomo contendo um cistron duas vezes maior em relação àquele do gene Hp^1 , juntamente com outro cromossomo, portando uma deleção, que provavelmente não afeta a síntese de haptoglobina.

NANCE & SMITHIES¹⁰⁶ relataram a existência de quatro alelos para o gene Hp^2 , em heterozigotos $Hp2-1$, a saber: Hp^{2F-F} , Hp^{2F-S} , Hp^{2S-F} e Hp^{2S} .

O loco para a cadeia alfa da haptoglobina foi inicialmente descrito como situado em um dos cromossomos do grupo D_1 (porção longa do cromossomo 13)¹³. ROBSON et al.¹³³ demonstraram, entretanto, que o gene Hp está localizado no cromossomo 16 com a probabilidade de 97%. TEISBERG & GJONE¹⁵⁷ sugeriram que o loco para o gene $LCAT$ (que codifica a enzima lecitina-colesterol aciltransferase) está situado próximo ao loco Hp , no cromossomo 16, porém não constatarem recombinação entre ambos. A única ligação do loco Hp , conhecida até o momento, é com o loco da catalase eritrocitária numa frequência de recombinação de 14,3%¹²¹.

A eletroforese da haptoglobina nativa em gel de amido, pH = 8,3, após coloração das frações com benzidina ou orto-tolidina, apresenta os seguintes perfis para os três fenótipos:

1) $[Hp1-1]$ - apresenta uma única fração intensamente corada, com menor mobilidade que a hemoglobina livre.

2) Hp2-1— encontra-se a fração correspondente à Hpl-1, fracamente corada, e outras seis frações em posição catódica, sendo a primeira delas de coloração mais intensa e um pouco mais separada das demais.

3) Hp2-2— caracteriza-se pela ausência da fração Hpl-1, apresentando apenas as bandas catódicas (FIG.2)

FIGURA 2. Representação esquemática do padrão eletroforético, em gel de amido, dos complexos hemoglobina-haptoglobina, segundo BLOOM¹³.

Muitos outros fenótipos variantes foram descritos com base nos padrões eletroforéticos em gel de amido, resultantes de variações nas cadeias polipeptídicas, devidas a alterações genéticas^{4,5,53,54,55,149}. Pode-se citar como exemplos: Hp2-1 modificado (Hp2-1M), Hp Carlberg (Ca) e Hp Johnson (J).

1.4 Biossíntese da Haptoglobina

A biossíntese da haptoglobina ocorre principalmente, no fígado ^{65,83,100,114,127}.

HOCHWALD et al.⁶⁵, através de estudos de incorporação de ¹⁴C-L-lisina e ¹⁴C-L-isoleucina a proteínas em culturas de vários tecidos de rato, e posterior demonstração autorradiográfica das proteínas marcadas, concluíram que o tecido hepático é o responsável pela síntese de haptoglobina.

WADA et al.¹⁶⁵ verificaram que as células do sistema reticuloendotelial (SRE) do fígado são as principais produtoras de haptoglobina e que ocorre síntese adicional, em pequena proporção, nas células do SRE do baço, gânglios linfáticos e timo.

Dados conclusivos de que o fígado é local de síntese da haptoglobina foram fornecidos pelos transplantes de fígado humano, realizados por KASHIWAGI et al.⁷⁹. Esses autores verificaram que os indivíduos receptores do órgão passaram a apresentar o fenótipo haptoglobínico do doador comprovando a síntese de haptoglobina pelo fígado transplantado.

BERGSTRAND et al.⁹ não conseguiram detectar níveis de haptoglobina no soro humano fetal e no sangue de cordão umbilical. Cerca de 70% dos recém-nascidos (1 a 11 dias) estudados apresentaram anaptoglobinemia, tendo os restantes 30% níveis extremamente baixos. Os autores atribuíram este fato à imaturidade do fígado para a síntese de haptoglobina.

globina. Após o primeiro ano de vida os níveis séricos de haptoglobina assemelham-se aos da idade adulta. Não se observaram variações significantes dos níveis de haptoglobina em pessoas idosas⁵⁰.

Muitos autores observaram hiperhaptoglobinemia em resposta a estímulos inflamatórios diversos^{44,96,116,117}.

Em 1972, isolou-se de leucócitos polimorfonucleares um fator proteico (PM entre 10.000 e 30.000) denominado LEM ("leucocytic endogenous mediator") responsável pelo aumento das glicoproteínas plasmáticas de fase aguda, dentre elas a haptoglobina⁷⁸.

PALMER¹¹⁵ verificou, em camundongos, que fatores solúveis liberados por macrófagos, "in vitro", causavam maior aumento de haptoglobina do que aqueles produzidos pelos leucócitos polimorfonucleares. Vários estudos confirmaram, posteriormente, que a produção hepática de haptoglobina é estimulada por fatores liberados na circulação pelas células fagocitárias^{111,116,117,125}.

Os níveis séricos de haptoglobina sofrem influências de vários hormônios, sendo que a cortisona, a testosterona e o hormônio paratireoideano provocam aumento da velocidade de síntese da haptoglobina e os estrógenos apresentam efeito inverso¹²¹. Os mecanismos envolvidos ainda não foram devidamente esclarecidos.

Alguns tipos de prostaglandinas (PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGA_2) provocam aumento de haptoglobina sérica, provavelmente por estímulo da síntese hepática ¹⁴².

1.5 Degradação da Haptoglobina

O catabolismo da haptoglobina pode ocorrer sob duas formas: da molécula livre ou da molécula complexada à hemoglobina ¹²¹. Poucos são os estudos e pesquisas sobre a primeira possibilidade.

MOURAY et al. ⁹⁹ demonstraram que a taxa de catabolismo da haptoglobina, em condições fisiológicas é constante estando entre 17% a 20% ao dia.

DOBRYSZYCKA et al. ³⁶ determinaram a meia-vida ($T^{1/2}$) da haptoglobina "in vivo", utilizando ^{14}C ou ^{35}S , em indivíduos com processos inflamatórios e no estado normal, encontrando $T^{1/2}$ igual a 2,6 dias e 4,4 dias, respectivamente.

A hemoglobina liberada na circulação combina-se com a haptoglobina para ser catabolizada ⁶⁰. Quando a haptoglobina disponível para formação de complexo se esgota, outras vias de eliminação da hemoglobina são utilizadas.

Não ocorre filtração glomerular do complexo hemoglobina-haptoglobina devido a seu alto peso molecular, ao passo que a hemoglobina é filtrada facilmente ⁸⁷. Dessa forma, a formação de complexos hemoglobina-haptoglobina evita a deposição de ferro nos rins, evitando lesões renais, assim

como impede a excreção renal de ferro e proteína ^{48,113}.

A saturação completa da haptoglobina pela hemoglobina leva a uma queda rápida dos níveis plasmáticos de haptoglobina ^{83,100} devido à remoção total do complexo em cerca de oito horas ³⁷.

Estudos autorradiográficos ^{42,164} indicam que o complexo ¹⁴C-haptoglobina-hemoglobina é fagocitado pelas células do SRE do fígado e, em menor grau, do baço, gânglios linfáticos e timo. O complexo haptoglobina-hemoglobina, após ser fagocitado pelas células de Küpffer, é transferido para as células parenquimatosas do fígado, onde é metabolizado ¹⁶⁴. O ferro é reciclado para a medula óssea através da transferrina ¹⁰¹. Parte do complexo haptoglobina-hemoglobina captada pelo fígado é transferida diretamente para a bile ⁶³.

Adicionalmente, a haptoglobina parece ativar a conversão enzimática da hemoglobina a um precursor da biliverdina, pois a enzima que catalisa o processo alfa-metenil-heme-oxigenase apresenta maior especificidade para o complexo hemoglobina-haptoglobina que para a hemoglobina livre ¹⁰⁵.

1.6 Considerações Sobre a Haptoglobina em Diversas Patologias

1.6.1 Processos Inflamatórios e Degenerativos

Em uma reação inflamatória, após as alterações iniciais locais, ocorre aumento acentuado de algumas glicoproteínas denominadas "proteínas de fase aguda" (IRG = "inflammatory reaction glycoproteins" ou APR = "acute phase reactants"), a saber: α_1 -antitripsin, haptoglobina, α_1 -glicoproteína ácida, fibrinogênio, ceruloplasmina, fração C_3 do complemento e proteína C reativa¹¹⁶. Alterações dessas proteínas ocorrem de forma não específica em várias lesões, infecções agudas ou crônicas, doenças inflamatórias e degenerativas¹⁶⁶.

Existe boa correlação entre a atividade dos processos inflamatórios, sejam de causa bacteriana, viral ou neoplásica e os níveis séricos de haptoglobina^{29,59,61,96,108,112}.

Algumas das funções atribuídas à haptoglobina na inflamação são a inibição da catepsina B, enzima proteolítica liberada nos estados inflamatórios e tumorais¹⁵² e a incorporação de ^{14}C -prolina na hidroxiprolina do colágeno¹⁴. Dessa forma, a haptoglobina protegeria os tecidos contra a ação de enzimas proteolíticas e atuaria na regeneração do colágeno.

Em casos de pneumonia, a concentração sérica de haptoglobina aumenta dentro de dois dias após o início

dos sintomas, atingindo níveis cerca de 4 a 7 vezes mais altos que os normais após uma semana ¹¹⁰.

Pacientes portadores de tumores malignos com metástases ósseas e pulmonares ¹¹⁰, leucemia mielóide crônica²¹ e câncer intestinal¹⁶⁶ apresentam níveis séricos aumentados de haptoglobina. Após cirurgia para a extirpação de tumor intestinal, a elevação rápida e progressiva dos níveis plasmáticos de haptoglobina indica recidiva local do tumor ou metástases envolvendo a parede intestinal¹⁶⁶. Da mesma forma, após histerectomia em pacientes que apresentavam tumor cervical, a determinação sequencial de haptoglobina e da fração C₉ do complemento mostrou-se útil para a monitoração de recidiva e crescimento tumoral¹⁶³.

WEIMER et al.¹⁶⁷ sugeriram que níveis elevados de haptoglobina, fibrinogênio e seromucóide representam resposta não específica ao trauma persistente associado ao crescimento tumoral.

Nos processos reumáticos inflamatórios, a haptoglobina apresenta níveis mais elevados que a α_1 -antitripsina e α_1 -glicoproteína ácida ¹¹⁷. Aumento altamente significativo ocorre na febre reumática⁵² e artrite reumatóide e menos acentuado na artrose com inflamação e gota aguda¹¹⁷.

No 6º dia após enfarte do miocárdio, ocorre aumento pronunciado dos níveis séricos de haptoglobina, persistindo por cerca de dois meses ^{3,6}. Observa-se normalização mais rápida em pacientes com evolução favorável, enquanto a elevação mais prolongada, ou aparecimento de um novo pico,

implicam em complicações ou novo episódio de enfarte³. A haptoglobina e a α_1 -glicoproteína ácida foram detectadas na área enfartada entre o terceiro e oitavo dias após enfarte, período que coincidiu com a maior atividade do processo de cicatrização, sugerindo que a haptoglobina poderia atuar na biossíntese do tecido cicatricial¹.

Níveis aumentados de haptoglobina e outras glicoproteínas foram observados em pacientes com doença coronariana¹³⁴. SNYDER et al.¹⁵² sugerem as hipóteses de que alterações iniciais das glicoproteínas resultam em efeitos secundários sobre lipídios e plaquetas, ou que as anormalidades das glicoproteínas resultem do próprio processo aterosclerótico e potencializam os fatores aterogênicos já existentes.

1.6.2 Hepatopatias

Existem vários estudos sobre a utilização de proteínas sintetizadas no fígado para a avaliação das doenças hepatobiliares^{110,120,144}.

MEHROTA & TANDAN⁹⁷ estabeleceram um valor crítico para o nível sérico de haptoglobina, através do qual foi possível diagnosticar 93,3% dos casos de icterícia por obstrução biliar e 90% dos casos de icterícia hepatocelular. Concentrações superiores ao valor crítico estabelecido (0,78 g/l, para faixa normal = 0,50 - 1,00 g/l) associaram-se à icterícia obstrutiva e valores inferiores, à icterícia hepatocelular. Observaram-se níveis séricos de atividade da fosfa-

tase alcalina aumentados em 86,6% tanto dos casos de icterícia obstrutiva, quanto hepatocelular.

Pacientes com inflamação do sistema biliar sem sinais de obstrução apresentam níveis elevados de haptoglobina; entretanto, portadores de obstrução biliar sem componente inflamatório mostram apenas 40% de valores acima da faixa normal ¹¹⁰.

Existem dados contraditórios na literatura em relação à associação entre tumores hepáticos primários e níveis séricos de haptoglobina. Alguns autores ^{64,109,110} relatam diminuição, enquanto outros ^{76,144} indicam aumento dos níveis de haptoglobina, semelhante à reação de fase aguda. Em alguns casos tem-se detectado haptoglobina no líquido ascítico de pacientes com neoplasia hepática ¹¹. Nos tumores metastáticos para fígado geralmente não ocorrem variações dos níveis de haptoglobina ¹¹⁰.

Utiliza-se, frequentemente, a concentração de diferentes proteínas plasmáticas de origem hepática como indicador da capacidade funcional do fígado. A haptoglobina, geralmente está diminuída em cirróticos ^{2,86,93,110}, sem apresentar correlação com a albumina ². Em alcoólatras crônicos observam-se níveis elevados de haptoglobina, que não se normalizam pelo tratamento com agentes anti-inflamatórios, indicando não se tratar de um processo inflamatório clássico ⁸⁶. Entretanto, na cirrose alcoólica constata-se diminuição dos níveis séricos de haptoglobina ^{86,93}.

Estudos da concentração sérica de haptoglobina na hepatite aguda por vírus mostram resultados conflitantes^{23,77}. NYMAN¹¹⁰ verificou valores dentro da normalidade durante a evolução da doença, com casos esporádicos de hipoproteinemia ou anaptoglobulinemia. Entretanto, CIĘSLUK & KRAJ²³ e KALINOWSKA⁷⁷ concluíram que a haptoglobina tem valor prognóstico na hepatite viral.

1.6.3 Processos Hemolíticos

A haptoglobina combina-se rapidamente com a hemoglobina, à medida que esta aparece no plasma. Diminuição dos níveis séricos de haptoglobina indicam, primariamente formação e depuração do complexo hemoglobina-haptoglobina, resultante da hemólise intravascular³⁷.

Comparação dos níveis séricos de haptoglobina pré e pós-transfusoriais ajudam na avaliação de casos suspeitos de reações hemolíticas provocadas pelas transfusões sanguíneas⁴⁶.

ENGLER et al.⁴¹, utilizando a determinação da haptoglobina e hemopexina como indicadores de hemólise, verificaram que nos casos de hemólise intravascular moderada, não associada com reação inflamatória aguda, a concentração da haptoglobina estava abaixo da sensibilidade do método utilizado (nefelometria) e a de hemopexina, diminuída. Na hemólise intravascular moderada associada à presença de processo

inflamatório agudo, a haptoglobina apresentou-se diminuída e a hemopexina, normal.

Na hemólise intravascular associada a doenças crônicas (com diminuição discreta de hemoglobina e ferro sérico) há correlação entre elevação da haptoglobina e diminuição de siderofilina³⁵. A razão haptoglobina/siderofilina, que é de $0,43 \pm 0,26$ em indivíduos normais, aumenta para 1,35 a 3,85 nas "anemias inflamatórias". DEVRED & BILSKI-PASQUIER³⁵ consideram essa razão como excelente critério para distinguir a natureza inflamatória das anemias com diminuição de ferro. Na anemia por deficiência de ferro (ferro sérico menor que 40 mcg/100 ml) não associada a doenças inflamatórias observa-se diminuição significativa de haptoglobina, indicando a presença do componente hemolítico³³.

1.7 Aspectos Metodológicos

As diversas metodologias empregadas para a determinação da haptoglobina baseiam-se nas alterações das propriedades da haptoglobina ou da hemoglobina, com a formação de complexo entre ambas. As propriedades mais utilizadas são: aumento da atividade peroxidásica da hemoglobina, alterações da mobilidade eletroforética, aumento do peso molecular na filtração em gel, bem como propriedades espectrais e imunoquímicas.

1.7.1 Medida da Atividade Peroxidásica do Complexo Hemoglobina-Haptoglobina

A haptoglobina combinando-se com hemoglobina proporciona-lhe aumento de atividade peroxidásica, conferindo-lhe propriedades de peroxidase verdadeira⁷⁴.

O primeiro método descrito por JAYLE⁷², em 1951, baseava-se na diferença de atividade peroxidásica entre hemoglobina livre e complexada. Utilizava peróxido de etila como substrato oxidante e íon iodeto como doador de elêtrons. A titulação do iodo liberado com tiosulfato indicava a concentração de haptoglobina na amostra.

CONNEL & SMITHIES¹⁹, em 1959, mediram a atividade peroxidásica do complexo metahemoglobina-haptoglobina, utilizando peróxido de hidrogênio como substrato oxidante e guaiacol como redutor. O produto final da reação foi medido espectrofotometricamente e a concentração da haptoglobina, expressa como capacidade de ligação com a metahemoglobina, obtida pela comparação com uma série de padrões. Este método é preciso, porém bastante laborioso.

OWEN, BETTER & HOBAN¹¹⁴, utilizando a mesma reação colorimétrica de CONNEL & SMITHIES¹⁹, padroniza-ram um método mais simples, onde a concentração das amostras era obtida por uma curva de calibração construída a partir de um "pool" de soros. Este método é considerado de referência, sendo a maior desvantagem o curto espaço de tempo disponível para a leitura final, devido ao produto formado ser

fotossensível, o que dificulta a análise concomitante de grande número de amostras.

Em 1976, STANDING & PRICE¹⁵⁴ descreveram um método cinético para a determinação de haptoglobina, utilizando a atividade peroxidásica do complexo haptoglobina cianometahemoglobina, num sistema de reação contendo guaiacol e peróxido de hidrogênio como substratos. Os autores padronizaram o método em um sistema automatizado, considerando-o simples, rápido e reprodutível.

1.7.2 Métodos Imunoquímicos

Vários métodos nefelométricos têm sido utilizados para quantificar a haptoglobina pela formação de complexos antígeno-anticorpo^{88,95,130}.

A imunoeletroforese bidimensional de LAURELL também é utilizada; no entanto, a quantificação e análise dos picos apresenta alguma dificuldade¹²².

O método de imunodifusão radial permite a quantificação da haptoglobina através da medida do halo de precipitação, resultante da difusão do soro em gel de ágar, contendo anticorpos específicos¹²¹. Esta técnica é bastante utilizada, porém apresenta o inconveniente do tempo necessário para a completa difusão do soro (no mínimo 48 horas), além de necessitar da tipagem prévia do fenótipo haptoglobínico da amostra¹⁶¹. Quando se utiliza haptoglobina 2-1 como padrão, os valores obtidos para a haptoglobina 2-2 são corre

tos, porém a concentração da Hpl-1 apresenta-se falsamente elevada¹⁶¹. Fatores determinados experimentalmente corrigem essas diferenças, desde que se conheça o tipo de haptoglobina da amostra, determinado por qualquer dos métodos existentes^{118, 119, 128, 146}.

1.7.3 Outros Métodos

Os métodos eletroforéticos são apenas semi-quantitativos e baseiam-se nos diferentes pontos isoelétricos apresentados pela hemoglobina livre ($PI = 6,9$) e pelo complexo hemoglobina-haptoglobina ($PI = 4,85$), que migram, respectivamente, na região beta e na área das α_2 -globulinas.

As propriedades de absorção espectral na banda Soret podem ser utilizadas para a avaliação quantitativa da haptoglobina^{18,39}. A absorção da hemoglobina complexada à haptoglobina, em $pH = 3,7$, na região da banda Soret é preservada, enquanto a hemoglobina livre denatura-se em pH ácido e não absorve nesta região. Determina-se, desta forma, o coeficiente de extinção do complexo hemoglobina-haptoglobina, utilizando-o na quantificação da haptoglobina. Entretanto os métodos baseados nesse princípio são pouco práticos.

A hemoglobina ligada à haptoglobina separa-se da hemoglobina livre em coluna de Sephadex G100, resultando um pico bem determinado¹²¹. Contudo os métodos de

filtração em gel são demorados e podem sofrer interferências da hiperbilirrubinemia e hiperlipemia¹²¹.

Em 1962, SASS & SPAR¹³⁷, utilizaram hemoglobina marcada com Fe^{59} para quantificação da haptoglobina por eletroforese determinando a radioatividade da fração referente ao complexo hemoglobina-haptoglobina, em relação à radioatividade total. Além do tempo consumido pela eletroforese, outra desvantagem seria a obtenção da hemoglobina isotopicamente marcada.

O radioimunoensaio para a determinação da haptoglobina sérica requer antígeno (haptoglobina) altamente purificado e anticorpos específicos com afinidade adequada. Tem-se descrito¹⁴⁹ a utilização de ^{125}I -haptoglobina como antígeno porém a ocorrência de grande porcentagem de reações cruzadas dificultam o emprego da metodologia.

HOOPER et al.⁶⁸ em 1979, padronizaram um radioensaio baseado na ligação da hemoglobina em fase sólida (acoplada à Sepharose-4B). O método é bastante complexo, tendo sido utilizado apenas para a determinação da incorporação de aminoácidos marcados na molécula de haptoglobina em sistemas celulares "in vitro".

2. PROPOSIÇÃO

A determinação sérica da haptoglobina tem-se revelado útil no acompanhamento de várias patologias. Entretanto, as dificuldades inerentes às diversas metodologias disponíveis para a avaliação da haptoglobina têm contribuído, muitas vezes, para restringir sua utilização mais frequentemente.

Nas doenças hemolíticas, a haptoglobina parece ser um indicador sensível da hemólise intravascular, sendo poucos os estudos que a correlacionam com vários parâmetros capazes de indicar a ocorrência e evolução de um processo hemolítico.

Sendo o fígado o principal local de síntese da haptoglobina, nas hepatopatias ocorre alteração variável dos níveis séricos de haptoglobina, de acordo com a natureza do processo e o grau de comprometimento do parênquima hepático. Na hepatite, doença inflamatória do fígado, a haptoglobina poderia comportar-se como uma "proteína de fase aguda", com aumento de seus níveis séricos, ou revelar distúrbios da síntese hepática pela diminuição de seus níveis plasmáticos.

O objetivo desse estudo foi adaptar um método rápido e reprodutível para dosagem rotineira da haptoglobina, determinar o fenótipo haptoglobínico nos indivíduos estudados, assim como comparar a haptoglobina com outros pa

râmetros de hemólise nos processos hemolíticos e estudar o comportamento dos níveis séricos de haptoglobina na cirrose e hepatite viral, com o intuito de avaliar o grau de comprometimento hepático, juntamente com outras informações atualmente utilizados na clínica médica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material Biológico

Obteve-se sangue por punção venosa e o soro foi separado após centrifugação a 2 500 rpm por 10 minutos. Para as determinações hematológicas utilizou-se EDTA a 8% (ácido etilenodiaminotetracético) como anticoagulante e oxalato de sódio 1,34% para determinação do tempo de protrombina. Quando as dosagens não foram efetuadas no mesmo dia, os soros foram armazenados a -20°C.

3.1.2 Grupos de Estudo

3.1.2.1 Grupo Controle

Este grupo é composto por 101 indivíduos (46 do sexo masculino e 55 do sexo feminino) na faixa etária de 6 a 74 anos. Foram considerados normais aqueles indivíduos que não apresentaram sinais clínicos de enfermidade e anormalidades nos exames hematológicos ou bioquímicos. Os dados de identificação estão contidos no quadro 1.

3.1.2.2 Grupo de Pacientes com Anemias Hemolíticas

Consta de 20 pacientes (13 homens e 7 mulheres), na faixa etária compreendida entre 9 a 54 anos, por-

QUADRO 1
Identificação do Grupo Normal

Amostra		Idade (anos)	Sexo	Cor	Amostra		Idade (anos)	Sexo	Cor
Nº	Nome				Nº	Nome			
01	F.M.R.	53	M	Br	23	M.A.F.	22	F	P
02	B.S.O.	6	M	Br	24	N.G.	6	M	Br
03	A.C.S.S.	36	F	Br	25	R.T.G.	8	M	Br
04	L.V.B.	68	M	Br	26	M.T.	7	F	Br
05	L.S.A.	38	F	Br	27	A.A.S.	6	F	P
06	M.J.R.	6	M	Br	28	H.V.	64	F	Br
07	N.C.V.	48	F	Br	29	J.M.A.	59	F	P
08	K.R.	43	M	Br	30	M.Z.S.	34	F	Br
09	O.A.F.	15	F	Br	31	S.M.T.C.	34	F	Br
10	S.B.	73	F	Br	32	F.F.	48	M	Br
11	M.R.	65	F	Br	33	S.M.F.	52	F	Br
12	L.K.L.	45	F	Br	34	A.P.	57	F	P
13	M.C.B.Z.	69	F	Br	35	M.A.	37	F	Br
14	L.S.	61	M	Br	36	M.N.A.M.	35	F	Br
15	I.C.	37	F	Br	37	T.V.	41	M	Br
16	S.L.	57	F	Br	38	L.M.S.S.	63	M	Br
17	J.A.M.	24	F	Br	39	C.M.	36	F	P
18	S.M.	53	M	A	40	M.S.	38	F	Br
19	J.B.	31	F	Br	41	L.P.	32	F	Br
20	V.C.S.	69	F	Br	42	F.F.	33	M	Br
21	M.T.S.	33	F	Br	43	A.T.A.	36	F	Br
22	C.I.	45	M	Br	44	M.S.A.	74	M	Br

Continua

Continuação do Quadro 1

Amostra		Idade (anos)	Sexo	Cor	Amostra		Idade (anos)	Sexo	Cor
Nº	Nome				Nº	Nome			
45	M.T.T.	20	F	Br	68	S.M.F.	18	F	Br
46	M.J.R.V.	20	F	Br	69	R.M.A.N.	18	F	Br
47	M.G.	19	F	Br	70	R.M.S.	22	F	P
48	R.B.F.	20	F	B Br	71	Y.R.S.	19	F	A
49	M.S.O.	19	F	A	72	R.M.	19	M	Br
50	M.T.B.N.	20	F	Br	73	R.P.M.	23	M	Br
51	M.F.P.L.	20	F	Br	74	S.M.M.	21	F	Br
52	M.F.	20	F	Br	75	M.C.B.	18	F	Br
53	N.Y.Y.	19	F	A	76	M.W.	18	M	Br
54	C.E.C.	18	M	Br	77	P.C.M.	19	F	Br
55	M.I.C.C.	19	F	Br	78	S.N.M.	19	F	A
56	L.F.	18	M	Br	79	R.C.M.B.	21	F	Br
57	M.B.M.	18	M	Br	80	T.A.S.	23	F	Br
58	M.S.G.	18	M	Br	81	R.V.P.	19	F	Br
59	G.J.F.B.G.	19	M	Br	82	G.L.C.	18	M	Br
60	H.S.C.J.	23	M	Br	83	W.F.G.	22	M	Br
61	C.T.T.	19	M	A	84	Y.T.	20	M	A
62	M.S.L.	20	F	Br	85	Z.N.C.F.	18	M	Br
63	M.R.S.B.	19	F	Br	86	I.V.	23	M	Br
64	M.P.B	21	F	Br	87	F.B.M.	18	M	Br
65	J.A.F.	22	M	Br	88	D.V.	24	M	Br
66	R.C.	20	F	Br	89	A.A.R.	20	M	Br
67	S.S.M.	20	F	A	90	I.R.M.B.	19	M	Br

Continua

Continuação do Quadro 1

Amostra		Idade (anos)	Sexo	Cor
Nº	Nome			
91	A.S.N	21	M	A
92	Y.C.P.	18	F	Br
93	S.A.	19	F	Br
94	H.H.	23	F	A
95	E.R.S.J.	22	M	Br
96	F.B.J.	18	M	Br
97	A.M.S.	19	M	Br
98	E.E.C.	20	M	Br
99	C.S.T.	20	M	A
100	D.T.	21	M	A
101	F.M.A.P.	20	M	Br

M = Masculino

Br = Branca

F = Feminino

P = Parda

A = Amarela

tadores de anemia hemolítica de etiologia variada. Esses pacientes foram selecionados em ambulatorios de hematologia, mediante análise cuidadosa dos prontuários e confirmação do diagnóstico por exames clínicos e laboratoriais. Os dados de identificação desses pacientes estão contidos no quadro 2.

3.1.2.3 Grupo de Pacientes Cirróticos

Compreende 27 pacientes (24 homens e 3 mulheres) diagnosticados como cirróticos através de exames clínicos, laboratoriais, e quando possível, pela biópsia hepática. A idade dos pacientes variou entre 33 e 67 anos. Os dados de identificação, assim como observações em relação à presença ou não de ascite e icterícia estão contidos no quadro 3. Esses pacientes foram classificados pelo critério de Child, segundo CAMPBELL¹⁹, em 3 classes:

Classe A - Função hepática boa

Classe B - Função hepática moderadamente alterada

Classe C - Disfunção hepática avançada

3.1.2.4 Grupo de Pacientes com Hepatite Viral

Formado por 34 pacientes (21 homens e 13 mulheres) na faixa etária compreendida entre 14 a 64 anos, que apresentaram evidências clínicas e laboratoriais de hepatite. A etiologia viral foi confirmada pela detecção de antígenos virais no soro dos pacientes (Antígeno solúvel do vírus B da hepatite - HBsAg) ou de anticorpos específicos (Anti

QUADRO 2

Identificação e Diagnóstico dos Pacientes Portadores de
Anemias Hemolíticas

Nº	Nome	Idade	Sexo	Cor	Diagnóstico
01	J.R.G.T.	18	M	P	A.F.
02	L.P.O.	19	F	P	A.F.
03	A.M.C.	19	M	N	A.F.
04	E.L.C.	36	F	Br	A.H.A.I.
05	J.E.F.	19	M	P	β -Talassemia
06	L.S.C.	54	M	N	A.F.
07	A.A.F.A.	9	M	N	A.F.
08	P.F.S.S.	20	M	P	A.F.
09	K.T.	34	M	A	H.P.N.
10	M.C.C.	13	F	N	A.F.
11	J.R.F.S.	24	M	P	A.F.
12	M.G.O.	20	F	Br	A.H.A.I.
13	F.C.A.	16	F	P	HbC
14	P.T.	31	M	A	H.P.N.
15	O.B.	22	M	N	A.F.
16	A.E.R.	12	M	P	Hb.SC
17	M.P.E.R.	10	F	P	A.F.
18	J.F.N.	50	M	N	A.H.A.I.
19	K.R.L.A.	15	F	Br	A.F.
20	J.H.	36	M	A	H.P.N.

P= Parda

N= Negra

Br=Branca

A= Amarela

A.F. = Anemia falciforme

A.H.I.= Anemia hemolítica auto-imune

H.P.N.= Hemoglobinúria paroxística noturna

HbC = Hemoglobinopatia C

HbSC = Hemoglobinopatia S e C

QUADRO 3
Identificação, Dados Clínicos e Diagnóstico dos Pacientes
Cirróticos

Nº	Nome	Idade	Sexo	Patologia Associada	Eti- lista	Ascite	Icterícia	Classif. de Child
01	ASM	33	M	Esofagite Gastrite	Sim	+	++	A
02	HJV	63	M	Esofagite Gastrite Sub-aguda	Sim	—	—	B
03	SM	56	M	—	Não	+	++	B
04	DB	43	M	Esofagite	Não	+	—	B
05	CG	27	M	—	Sim	—	++	A
06	LBD	55	F	Gastrite	Sim	+	—	B
07	JB	50	M	Gastrite Discreta	Sim	+	++	A
08	FCS	53	M	Gastrite Difusa	Não	—	++	A
09	AVC	34	M	—	Não	-	-	A
10	ACF	36	M	—	Sim	+	-	A
11	MAS	47	F	Gastrite	Não	-	-	A
12	LET	46	M	—	Não	+	+++	C
13	AC	60	M	—	Não	+	++	B
14	NA	34	M	—	Não	-	-	A
15	MSG	43	M	—	Sim	-	++	B
16	JMA	67	M	E.Erosiva G.Difusa	Sim	+	-	C
17	ORS	58	M	Úlcera Gástrica	Sim	+	-	B
18	NJB	43	M	Gastrite Difusa	Sim	+	++	B
19	NRG	54	M	Gastrite	Sim	+	++	B
20	JA	51	M	Gastrite Crônica	Sim	+	-	B
21	BMS	59	M	Esofagite	Sim	++	++	B
22	MM	24	M	—	Não	++	+++	B
23	RFS	40	M	—	Não	-	-	A
24	HTC	60	F	G.Difusa Bulboduode- nite	Não	++	++	B
25	ME	63	M	—	Não	++	+++	C
26	JJC	38	M	—	Não	+	+	A
27	RC	46	M	—	Não	+	—	B

corpo anti-antígeno de centro - Anti-HBc e anti-antígeno de superfície do vírus B da hepatite - Anti-HBs, ou anticorpo anti-vírus A da hepatite - Anti-A). Os dados de identificação dos pacientes e o tipo de hepatite viral estão contidos no quadro 4.

3.1.3 Determinação Cinética da Haptoglobina

3.1.3.1 Padrão de "pool" de soros

Soros sem sinais evidentes de hemólise, anictéricos e isentos de turvação foram misturados constituindo um "pool". Após homogeneização, esse "pool" foi filtrado à vácuo, com filtro "Millipore" com poros de 8 μ m, distribuindo em alíquotas e armazenado a -20°C .

3.1.3.2 Solução de Cianometahemoglobina

Preparou-se uma solução de hemoglobina pela adição de 1/5 do volume de água em relação ao volume de eritrócitos lavados. Após congelamento dessa solução por 24 horas, adicionou-se 1/2 volume de clorofórmio para eliminação do estroma. Essa mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos. A cada 10 ml da solução de hemoglobina (sobrenadante) adicionaram-se 10 mg de cianeto de potássio e 2 mg de nitrato de sódio, para obtenção da cianometahemoglobina. Essa solução foi dialisada por 24 horas contra solução fisiológica. Determinou-se a concentração dessa última solução atra-

QUADRO 4

Identificação, Diagnóstico e Marcadores Imunológicos dos
Portadores de Hepatite Viral

Nº	Nome	Idade	Sexo	Cor	Diagnóstico	Marcadores Imunológicos
01	Y.S.	36	F	Br	H.A.	1
02	S.S.Z.	34	F	Br	H.A.	1
03	D.F.P.	50	M	Br	H.A.	1
04	B.B.	32	M	Br	H.A.	2;4
05	V.L.	64	M	Br	H.A.	2;3
06	A.L.B.	28	M	Br	H.A.	1
07	J.M.C.	31	M	Br	H.A.	1;3
08	L.C.D.O.	19	M	Br	H.A.	4
09	I.M.C.	42	F	Br	H.A.	1
10	C.C.	17	F	Br	H.A.	4
11	J.T.O.	34	M	Br	H.A.	1;3
12	G.L.	62	F	Br	H.A.	2
13	RMQ	14	F	Br	H.A.	4
14	P.M.	20	F	Br	H.A.	1;4
15	ESS	30	F	Br	H.A.	2;4
16	M.O.S.	25	F	Br	H.A.	1;2;3;4
17	C.R.M.	28	F	Br	H.A.	2;4
18	J.M.C.	29	M	Br	H.A.	2;3;4
19	R.M.	32	M	Br	H.A.	1
20	V.M.L.	36	M	Br	H.A.	1;3
21	M.Q.M.	15	M	Br	H.A.	4

Continua

Continuação do Quadro 4

Nº	Nome	Idade	Sexo	Cor	Diagnóstico	Marcadores Imunológicos
22	R.C.F.	28	M	Br	H.A.	1;3;4
23	J.A.N.	42	M	Br	H.A.	1
24	F.S.M.	29	M	A	H.A.	4
25	R.E.P.	39	M	Br	H.C.A.	1;3
26	S.K.	51	F	Br	H.C.P.	2;3
27	M.N.Z.	45	M	Br	H.C.A.	1;3
28	FOMP.	15	F	Br	H.C.P.	1;2;3
29	O.T.	24	M	Br	H.C.P.	2;3
30	WJPB.	53	M	Br	H.C.P.	4
31	N.G.O.	56	M	Br	H.C.A.	1;3;4
32	F.J.Z.	12	F	Br	H.C.P.	1;3;4
33	C.V.D.	14	F	Br	H.C.A.	4
34	H.W.B.	42	M	Br	H.C.A.	1

Marcadores Imunológicos:

1= HBsAg positivo

H.A.= Hepatite aguda

2= Anti-HBs positivo

H.C.A.= Hepatite crônica ativa

3= Anti-HBc positivo

H.C.P.= Hepatite Crônica Persistente

4= Anti-A positivo

do coeficiente de extinção molar da cianometahemoglobina, igual a 1,45 em 540 nm, obtendo-se a concentração final de 103 gramas de cianometahemoglobina por litro de solução. Para a realização das determinações das amostras essa solução estoque foi diluída 1:2000, resultando uma solução de trabalho com concentração de 52 mg por litro. A solução estoque foi conservada a 4°C durante o período de realização do trabalho experimental, sem apresentar alterações.

3.1.3.3 Solução de Guaiacol

Uma solução de guaiacol na concentração de 16,8 mmol/litro em tampão acetato 0,105 mol/litro foi preparada adicionando-se 1,016 g de guaiacol da marca "Riedel" a 400 ml de água destilada e 3 ml de ácido acético glacial. O pH da solução foi ajustado para 4,0 com hidróxido de sódio 1 mol/litro, completando-se o volume final para 500 ml com água destilada. Essa solução foi armazenada a 4°C.

3.1.3.4 Solução de peróxido de hidrogênio

Foi preparada, na hora do uso, uma solução contendo 190 mmol/litro, adicionando-se 2,2 ml de peróxido de hidrogênio (100 volumes) em 100 ml de água destilada.

3.1.4 Imunodifusão Radial

Foram empregadas placas "M-Partigen^R" do Instituto Behring, lote nº 051140, contendo gel de ágar e

anticorpo monoespecífico (anti-haptoglobina), obtido de coelhos. Como padrão utilizou-se o soro padrão B de proteínas, do lote nº 12743, de origem humana, fornecido pelo Instituto Behring.

3.1.5 Aparelhagem Utilizada

3.1.5.1 Espectrofotômetro

Para a determinação cinética da haptoglobina, usou-se um espectrofotômetro "Bausch & Lomb" modelo "Spectronic 88" acoplado a dispositivo para leitura digital. Utilizou-se um espectrofotômetro "Carl-Zeiss", modelo PMQ II, com termostato UKT₃ "Buhler", para as determinações enzimáticas. Um fotômetro "E. Leitz", modelo 340-800, acoplado a registrador foi empregado para verificação do período de linearidade na determinação cinética da haptoglobina.

3.1.5.2 Aparelhagem para Eletroforese

Fez-se uso de uma fonte capaz de fornecer 400 a 500 volts da marca "Permatron" e uma cuba de acrílico com capacidade para suportes de até 30 cm. A conexão entre o tampão da cuba e o bloco de gel de amido foi feita com papel de filtro Whatman 3MM. Um suporte desmontável, em acrílico, foi utilizado para permitir a secção horizontal do bloco de gel de amido para posterior coloração e identificação das frações de haptoglobina.

3.1.5.3 Contagem Total de Eritrócitos

A determinação do número total de eritrócitos das amostras de sangue foi feita utilizando-se um contador de células automático "Coulter Counter", modelo D₂ (Coulter Electronics, Inc. Hialcah, Fla.).

3.1.5.4 Radioimunoensaio

Para o radioimunoensaio dos marcadores imunológicos da hepatite viral utilizamos um contador de radiação gama modelo "Logic 211" marca Abbot.

3.2 M É T O D O S

3.2.1 Determinação Cinética da Haptoglobina

Foi utilizado o método de Standing & PRICE¹⁵⁴, modificado por COOPER et al.²⁸, que se baseia na medida da atividade peroxidásica da haptoglobina quando complexada à cianometahemoglobina. A reação, utilizando guaiacol como substrato redutor e peróxido de hidrogênio, como oxidante, pode ser esquematizada como mostrado na página 37.

A velocidade de formação dos produtos de oxidação do guaiacol é diretamente proporcional à quantidade do complexo haptoglobina-hemoglobina formado. Se a concentração de cianometahemoglobina for mantida constante e em excesso, então a velocidade de formação dos produtos (generi-

OBS. Todo material reagente, quando não especificado, foi da marca Merck.

camente denominados de tetraidroguaiacol) será proporcional à concentração de haptoglobina da amostra.

CMHb-Hp = Complexo Cianometahemoglobina-Haptoglobina

3.2.1.1 Curva de Calibração

O "pool" de soros descrito no item 3.1.3.1 foi utilizado para construir a curva de calibração. Foram feitas nove diluições com quantidades crescentes de "pool" (0,1, 0,2, 0,3... 0,9 ml) em solução salina 0,85%. O décimo padrão é o "pool" não diluído. Posteriormente, adicionou-se uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição e do soro não diluído a 9 tubos, contendo 1,5 ml da solução trabalho de cianometahemoglobina (52 mg/l), para formação do complexo haptoglobina-cianometahemoglobina. Cada um dos padrões da curva

foi manipulado da mesma forma que as amostras. Uma nova curva de calibração foi construída sempre que uma nova solução de guaiacol foi preparada.

3.2.1.2 Determinação da Atividade Peroxidásica das Amostras

Diluiu-se a amostra de soro 1:5 com solução salina 0,85% e adicionou-se 0,1 ml dessa amostra diluída a 1,5 ml da solução de cianometahemoglobina. Uma alíquota de 0,1 ml dessa mistura foi adicionada a 1 ml da solução de guaiacol na cubeta de leitura do aparelho "Spectronic 88". Em seguida, pipetou-se na cubeta 0,1 ml da solução de peróxido de hidrogênio contendo 198 mmol/l, disparando-se o cronômetro simultaneamente. Ajustou-se a escala de absorbância para 0,200, em 480 nm, e após 1 minuto fez-se a leitura inicial. Leituras posteriores, a cada 30 segundos, foram realizadas por um período de 150 segundos. A influência da atividade peroxidásica da cianometahemoglobina foi eliminada através da subtração do valor da absorbância de um "branco" ($\Delta A/30\text{seg}$) preparado pela adição de 0,1 ml de solução salina em lugar da alíquota de amostra. As reações ocorreram à temperatura ambiente, que oscilou de 25°C a 28°C.

3.2.1.3 Cálculos

Obteve-se uma curva inicial de calibração (Gráfico A), contendo em abcissas, o volume de "pool" de

soro existente em cada diluição e em ordenadas, a medida da velocidade de reação expressa em $\Delta A/30$ segundos (diferença de absorbância obtida a cada 30 segundos).

CURVA DE CALIBRAÇÃO

O ponto de inflexão "S" indica a quantidade de soro que satura toda a cianometahemoglobina presente no sistema de reação, uma vez que a adição de maior quantidade de soro não altera a velocidade de reação. Como a haptoglobina se combina com a hemoglobina estequiometricamente na proporção 1:1, a quantidade de soro correspondente ao ponto "S" representa a capacidade máxima de ligação da cianometahemoglobina (CLCMHb), que pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{CLCMHb} = 103 \times \frac{1}{2000} \times \frac{1,5}{1000} \times \frac{1000}{0,1} = 0,77 \text{ g/l}$$

onde:

103 = concentração original da solução de cianometa-hemoglobina em g/l

1/2000 = fator de diluição para a solução de cianometa-hemoglobina

1.5/1000 = fator para obter-se a quantidade de cianometa-hemoglobina em 1,5 ml de solução

1000/0,1 = fator para converter a capacidade de ligação da cianometa-hemoglobina de g/100 μ l para g/l

A expressão "capacidade de ligação da hemoglobina" foi introduzida por NYMAN¹¹⁰, representando a quantidade máxima de hemoglobina, em miligramas, que pode complexar a haptoglobina presente em 100 ml de soro. MORETTE & WALKS⁷⁴ estabeleceram que 1 mg de hemoglobina se fixa a 1,3 mg de haptoglobina, em uma reação equimolar. Para transformar o valor expresso como capacidade de ligação da hemoglobina por litro, em gramas de haptoglobina por litro, basta multiplicar-se por 0,013. Em virtude dos métodos que fornecem a concentração de haptoglobina, através da medida da atividade peroxidásica do complexo hemoglobina-haptoglobina, utilizam a terminologia que expressa a concentração da haptoglobina em termos de "capacidade de ligação de hemoglobina", conservou-se esse tipo de denominação em nosso trabalho.

Portanto, pela fórmula citada acima, 0,77g de cianometa-hemoglobina são necessários para complexar a haptoglobina existente em 1 litro de soro. Dessa forma, repre-

senta-se a concentração de haptoglobina como capacidade de ligação da cianometahemoglobina em g/l.

Para o cálculo da concentração da haptoglobina das amostras de soro, torna-se necessária a construção de um segundo gráfico, contendo no eixo das ordenadas a velocidade de reação ($\Delta A/30$ segundos) e no eixo das abcissas, a concentração da haptoglobina expressa como capacidade de ligação da cianometahemoglobina (Gráfico B). Esse segundo gráfico é construído da seguinte forma: o ponto "S" corresponde a uma quantidade de soro igual a 0,76 ml (eixo das abcissas) e a uma velocidade de reação ($\Delta A/30$ segundos) igual a 0,066 (eixo das ordenadas). Pela fórmula citada acima calculou-se que o ponto "S" corresponde a uma concentração de 0,77 g/l. Portanto, no gráfico B, 0,77 g/l estaria em abscissa contra o valor 0,066 em ordenada. Para a construção do gráfico B, tomam-se os seguintes pontos.

G R Á F I C O A			G R Á F I C O B		
Ponto da reta no Gráf. A	ml de "pool" correspon- dente	$\Delta A/30$ seg. correspon- dente	Ponto da reta no Gráf. B	CLCMHb (g/l)	$\Delta A/30$ seg. correspon- dente
	Abcissa	Ordenada		Abcissa	Ordenada
"S"	0,76	0,066	CLCMHb	0,77	0,066
3/4 "S"	0,57	0,050	3/4CLCMHb	0,58	0,050
1/2 "S"	0,38	0,033	1/2CLCMHb	0,39	0,030
1/4 "S"	0,19	0,017	1/4CLCMHb	0,19	0,017
1/8 "S"	0,10	0,010	1/8CLCMHb	0,10	0,010

Este último gráfico foi utilizado para as determinações da atividade peroxidásica das amostras, expressa como capacidade de ligação da cianometahemoglobina em g/l.

3.2.2 Determinação do Fenótipo da Haptoglobina Nativa

Utilizou-se o método eletroforético de SMITHIES ¹⁴⁷ para separação e identificação dos tipos de haptoglobina no soro. A separação dos tres tipos de haptoglobina foi feita pelas diferenças em suas cargas e pesos moleculares, visto que o gel de amido utilizado como suporte funciona

como uma rede de malhas finas, impedindo que as moléculas maiores migrem livremente, retendo-as em suas malhas. A corrida eletroforética foi realizada durante um período de 4 horas a cerca de 10°C, com voltagem fornecida pela fonte igual a 400 volts e amperagem ao redor de 13 mA, sendo que a medida da voltagem no próprio gel foi de 120 volts (cerca de 5 V/cm). Após o término da eletroforese, cortou-se o bloco de gel ao meio longitudinalmente, inserindo-se um fio de aço entre as partes da bandeja e separou-se a parte superior do bloco de gel. Em seguida, fez-se a coloração das frações com uma solução de orto-tolidina e peróxido de hidrogênio, que revelou as frações de haptoglobina coradas em azul.

3.2.3 Dosagem de Bilirrubina

A dosagem de bilirrubina total e frações foi realizada pelo método de MALLOY & EVELYN⁹², que utiliza a combinação da bilirrubina com o ácido p-sulfanílico diazotado com a formação de azobilirrubina de coloração vermelho-violácea, a qual é medida colorimetricamente. Essa reação é denominada reação de Van der Bergh. A bilirrubina direta (conjugada) reage na ausência de álcool, enquanto a bilirrubina total, que compreende a bilirrubina direta mais a forma indireta (não conjugada), necessita da adição de metanol para que ocorra a reação de Van der Bergh. Os valores normais para esse método são:

Bilirrubina totalatē 1,0 mg/100 ml
 Bilirrubina diretaate 0,4 mg/100 ml
 Bilirrubina indiretaatē 0,6 mg/100 ml

3.2.4 Contagem de Reticulócitos

Utilizou-se o método de BRECHER¹⁵ no qual o RNA (ácido ribonucleico) de hemácias imaturas é precipitado e corado com o corante supravital "novo azul de metileno" sendo que as células com precipitados corados (retículo) são contadas. Os resultados são expressos em porcentagem de células vermelhas observadas. Os valores normais considerados são de 0,5 a 1,5%.

3.2.5 Dosagem de Hemoglobina

Utilizou-se o método de Van Kampen & ZIJLS TRA¹⁶², no qual o Fe^{2+} do grupo heme da oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto para formar metahemoglobina, que se combina com íons cianeto para produzir cianometahemoglobina, composto estável medido fotometricamente em 540 nm. Os valores normais considerados foram de:

Idade (anos)	g/l
5 a 8	10,3 a 15,2
9 a 12	10,6 a 15,2
Mulher adulta	12,0 a 16,0
Homem adulto	14,0 a 17,0

AST

homens até 18 U/l

mulheres até 15 U/l

LD

(120 a 240) U/l

A atividade sérica da colinesterase (CHE, EC 3.1.1.7) foi medida pelo método de ELLMAN ³⁸ et al., segundo a reação:

Mediu-se o tempo necessário para haver uma variação de absorbância igual a 0,100, em 405 nm, considerando-se como valores normais de (1900 a 3800) U/l.

A determinação da atividade sérica da gama-glutamyltransferase (GGT, EC 2.3.2.2) foi feita pelo método de SZASZ ¹⁵⁶. A GGT transfere o grupo glutamyl do substrato gama-glutamyl-p-nitroanilida para a glicilglicina liberando p-nitroanilina de coloração amarela. A atividade da GGT é proporcional à p-nitroanilina liberada, cuja extinção é medida em 405 nm. Os valores normais considerados foram de até 28 U/l.

3.2.7 Determinação da Atividade Peroxidásica do Complexo Hemoglobina-Haptoglobina pelo Método Não Cinético

Utilizou-se o método de OWEN et al.¹¹⁴ como referência para comparação dos valores de haptoglobina obtidos pelo método cinético. Nesta técnica o soro contendo a haptoglobina é adicionado a uma solução de hemoglobina, formando o complexo hemoglobina-haptoglobina que atua sobre os substratos-guaiacol e peróxido de hidrogênio. Após exatamente 8 minutos o produto de reação, tetraidroguaiacol, é medido em 470 nm e a concentração de haptoglobina é determinada através de uma curva de calibração construída a partir de um "pool" de soros. Os valores normais deste método são de 50 mg/100 ml a 200 mg/100 ml, expressos como capacidade de ligação da metahemoglobina.

3.2.8 Determinação do Tempo de Protrombina

A determinação do tempo de protrombina foi realizada pelo método de QUICK¹²⁹. O princípio do teste é o seguinte: quando o cálcio e um extrato de tecido como o cerebral são adicionados ao plasma, o fator VII do plasma reage com o fator tecidual formando um produto que converte o fator X a sua forma ativada, o fator Xa; este reage com o fator V, cálcio e fosfolipídio do extrato de tecido formando protrombina extrínseca que converte a protrombina em trombina. A trombina converte o fibrinogênio em fibrina. Os valores normais, expressos em porcentagem são 80% a 100%.

3.2.9 Marcadores Imunológicos da Hepatite

A verificação da presença, no soro dos pacientes com hepatite, do antígeno de superfície (HBsAG), dos anticorpos anti-antígeno de centro (anti-HBc) e anti-antígeno de superfície do vírus B da hepatite (Anti-HBs), assim como do anticorpo anti-vírus A da hepatite foi feita pela técnica de radioimunoensaio ^{22,65,66}.

3.2.10 Determinação do Hematócrito

Foi utilizado o método de microhematócrito, preconizado por DACIE³², que utiliza a centrifugação do sangue em tubos capilares por 5 minutos a 28000 g. O volume ocupado pelos eritrócitos sedimentados é expresso como porcentagem do volume total de sangue. Os valores normais são de:

Idade	%
5 a 12 anos	32,5 a 42,5
Homem adulto	40,0 a 54,0
Mulher adulta	37,0 a 47,0

3.2.11 Método Estatístico-

O teste de significância para as diferenças das médias dos níveis séricos de haptoglobina nos grupos estudados foi calculada pela seguinte fórmula (teste "t" de Student):

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{n_1+n_2}{n_1 \times n_2}\right) \left(\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2}\right)}}$$

onde

n_1+n_2-2 = Grau de liberdade

$\bar{x}_1$ = Média dos valores no grupo 1

$\bar{x}_2$ = Média dos valores no grupo 2

n_1 e n_2 = Número de dados dos grupos 1 e 2, respectivamente

s_1^2 = Variância do grupo 1

s_2^2 = Variância do grupo 2

A correlação entre os resultados foi calculada pelo índice de correlação de SPEARMAN¹⁵³ (r_s) que corresponde à:

$$r_s = 1 - \frac{\sum d^2}{N^3 - N}$$

$$t = r_s \sqrt{\frac{N-2}{1 - r_s^2}}$$

onde:

$N-2$ = Grau de liberdade

d = Diferença da ordem

N = Número de dados

4. RESULTADOS

No presente trabalho fez-se, inicialmente, uma avaliação do método cinético¹⁵⁴ utilizado para a determinação dos níveis séricos de haptoglobina, visto que o mesmo foi adaptado às nossas condições de trabalho. Posteriormente, utilizou-se essa metodologia para estudar-se o valor da haptoglobina, no grupo controle, assim como em comparação com outros parâmetros, em pacientes portadores de anemias hemolíticas de etiologia variada, cirróticos e pacientes com hepatite viral.

O perfil da reação cinética está representado na figura 1, onde se pode observar a velocidade de reação em função do tempo e o período de linearidade da reação, utilizando-se uma amostra de soro sem diluir e nas diluições de 1:2 e 1:10.

Na figura 2, está representado o perfil da reação cinética para cada uma das diluições do "pool" de soros, utilizadas para a curva de calibração.

Com base nesses dados, utilizou-se o período de 60 segundos a 150 segundos para realização das leituras de absorbância, que foram efetuadas a cada 30 segundos. O período inicial da reação, igual a um minuto, foi considerado como fase de "lag" necessária para o equilíbrio inicial da reação. Os dados das leituras de absorbância referentes à figura 2 estão contidas na tabela 1.

Fig. 1 - PERFIL DA REAÇÃO CINÉTICA

FIG. 2

Perfil da reação para cada uma das diluições do "pool" do soro utilizadas para a realização da curva padrão

TABELA 1

Leituras de Absorbância das Diluições de "Pool" de Soros
Utilizados para a Curva de Calibração. Aparelho Utilizado:
"Spectronic 88"; Temperatura 28°C, comprimento de onda =
480 nm. As leituras representam a média de duplicatas

Diluição \ Tempo	Tempo						
	0"	30"	60"	90"	120"	150"	160"
1:10	0,058	0,065	0,076	0,090	0,106	0,122	0,140
2:10	0,065	0,075	0,090	0,111	0,135	0,157	0,179
3:10	0,063	0,075	0,096	0,122	0,149	0,178	0,206
4:10	0,071	0,087	0,117	0,154	0,194	0,231	0,265
5:10	0,071	0,90	0,124	0,166	0,211	0,253	0,290
6:10	0,074	0,94	0,135	0,188	0,238	0,286	0,329
7:10	0,083	0,111	0,163	0,225	0,286	0,341	0,389
8:10	0,085	0,113	0,164	0,222	0,282	0,340	0,387
9:10	0,105	0,140	0,199	0,260	0,321	0,375	0,421
Soro não diluído	0,087	0,121	0,179	0,245	0,309	0,365	0,413

O ponto de inflexão da curva de calibração ("S"), onde a haptoglobina está saturada com a cianometahemoglobina, correspondeu a uma capacidade de ligação da cianometahemoglobina igual a 0,77 g/l (Gráfico B do Ítem 3.2.1.3). Como as amostras de soro são normalmente diluídas 1:5, temos o valor de 3,85 ($= 0,77 \times 5$) g/l, como limite superior de concentração, ou seja, amostras com concentrações superiores a esse limite deverão sofrer diluições maiores que 1:5 para caírem na faixa de linearidade do método. Amostras de soro com concentração abaixo de 0,50 g/l não deverão ser diluídas, visto que serão determinadas em uma faixa da curva de calibração, inferior ao primeiro padrão utilizado, que foi extrapolada para o ponto zero. A faixa útil de leitura da curva utilizada é de 0,1 g/l a 0,77 g/l.

Estudou-se o efeito da concentração do peróxido de hidrogênio, guaiacol e da cianometahemoglobina sobre a velocidade da reação peroxidásica do complexo cianometahemoglobina-haptoglobina. Esses dados estão demonstrados na figura 3, onde se encontra em abcissas a concentração da solução utilizada e, em ordenadas, a velocidade de reação expressa em $\Delta A/30$ segundos.

Na tabela 2 encontram-se os dados referentes ao efeito da variação da temperatura sobre a atividade peroxidásica do complexo cianometahemoglobina-haptoglobina. Esses dados foram obtidos determinando-se a concentração de haptoglobina a 37°C e à temperatura ambiente a qual variou de 25°C a 28°C na época deste estudo. O coeficiente da variação

FIG. 3

Efeito da concentração do gualacol, peróxido de hidrogênio e cianometahemoglobina na velocidade da reação peroxidásica do complexo cianometahemoglobina-haptoglobina. "Spectronic" 88; temperatura = 28°C. CMHb = cianometahemoglobina

TABELA 2

Influência da Temperatura Utilizada na Determinação dos
Níveis Séricos de Haptoglobina pelo Método Cinético.
PMQII-Zeiss; comprimento de onda = 480 nm

Amostra	Concentração a 37°C (CLCMHb em g/l)	Concentração à t.a. (25°C a 28°C) (CLCMHb em g/l)
01	1,15	1,25
02	0,85	0,90
03	1,15	1,10
04	1,08	1,10
05	0,90	0,90
06	0,68	0,65
07	0,90	0,80
08	0,35	0,35
09	1,11	1,10
10	0,65	0,65
11	1,28	1,11
12	0,43	0,32
13	0,85	0,59
14	1,11	0,83
15	1,15	1,10
16	1,10	0,95
17	1,19	1,05
18	1,28	1,19

inter-ensaio obtido através de 18 determinações, em duplicata, de uma mesma amostra de soro com concentração média de 1,28 g/l foi de 2,1%. O coeficiente de variação inter-ensaio, resultante de 27 determinações de uma amostra de soro com concentração média de 1,11 g/l realizadas em duplicata e em dias diferentes, foi de 9,2%.

Os dados obtidos, estudando-se o efeito da diluição do soro na concentração final da haptoglobina, estão contidos na tabela 3a. A porcentagem de recuperação, obtida pela adição de alíquotas de soro com concentração conhecida à amostra analisada, foi de 93,7% (Tabela 3b).

A interferência da hemólise do soro foi estudada, adicionando-se quantidades adequadas de uma solução de hemoglobina com concentração conhecida às alíquotas do material biológico. Os dados estão expressos na tabela 4.

Verificou-se também a interferência da bilirrubina, adicionando-se volumes adequados de uma solução padrão de bilirrubina ("Wiener") às alíquotas de um soro anictérico. Esses dados estão contidos na tabela 5.

O método cinético foi comparado ao método clássico de OWEN, BETTER e HOBAN¹¹⁴, em 10 amostras de soro de indivíduos normais (Tabela 6). Com os mesmos soros determinou-se o nível de haptoglobina pelo método de imunodifusão radial. Utilizando-se uma amostragem maior (n = 70), estudou-se a correlação entre os métodos cinético e a imunodifusão radial. Os dados estão expressos na tabela 7. Nesta tabe

TABELA 3a
Efeito da Diluição do Soro na Concentração Final
de Haptoglobina

Diluição	Valor encontrado *	Concentração * do soro diluído	Porcentagem em relação ao valor real
Soro sem diluir	0,73	—	100,0
1:2	0,74	0,37	101,0
1:4	0,72	0,18	98,6
1:8	0,72	0,09	98,6
1:16	1,12	0,05	153,0

* Capacidade de ligação da Cianometahemoglobina em g/l

TABELA 3b
Porcentagem de Recuperação, obtida pela Adição de Aliquotas de
Soro com Concentração Conhecida à Amostra Analisada

A m o s t r a	Valor* encontrado	Valor* esperado	% de recuperação
Soro sem diluir	0,80	-	-
0,1ml (0,80*)+1ml(1,20*)	1,10	1,16	95
0,1ml (0,80*)+1ml(1,60*)	1,42	1,53	93
0,1ml (0,80*)+1ml(1,80*)	1,59	1,71	93
$\bar{x} = 93,7\%$			

* Capacidade de ligação da Cianometahemoglobina em g/l

TABELA 4

Interferência da Hemólise na Determinação dos Níveis
Séricos de Haptoglobina

mg de hemoglobina por 100 ml de soro	Haptoglobina*
0	1,02
50	1,05
100	1,00
200	1,05
400	1,30

TABELA 5

Interferência da Bilirrubina na Determinação dos Níveis
Séricos de Haptoglobina

mg de bilirrubina por 100 ml de soro	Haptoglobina*
0	1,00
5	1,03
10	1,00
20	1,00
40	1,00

* Capacidade de ligação da cianometahemoglobina em g/l

TABELA 6

Valores de Haptoglobina Obtidos em Soro de Indivíduos Normais
pelos Métodos de Owen et al.¹¹⁴, Cinético e Imunodifusão
Radial (I.D.R.)

Amostra	Método de Owen <u>et al.</u> (CLMHb em mg/100 ml)	Método Cinético (CLCMHb em mg/100 ml)	Imunodifusão Radial (mg/100 ml)
01	230	115	343
02	235	108	271
03	225	115	298
04	163	111	146
05	200	151	257
06	193	158	135
07	215	158	194
08	275	203	358
09	245	175	299
10	267	195	413

CLMetHb em mg/100 ml = Concentração de haptoglobina expressa
como capacidade de ligação da metahemoglobina em
mg/100 ml.

CLCMetHb = Capacidade de ligação da cianometahemoglobina em
mg/100 ml.

Met.Owen x Met.Cinético: $r_s = 0,54$; ($t=1,81$) N.S.

Met.Cinético x I.D.R. : $r_s = 0,46$; ($t=1,47$) N.S.

I.D.R. x Met. Owen : $r_s = 0,90$; ($t=5,84$) Significante
para $p \leq 0,001$

$t_{95\%} = 2,306$

N.S. = Não significante

TABELA 7

Valores de Haptoglobina Determinados em Soros Normais e de Casos Patológicos pelos Métodos Cinético* e de Imunodifusão Radial (I.D.R.)

Amostra	Método Cinético	I.D.R. (g/l)	Amostra	Método Cinético	I.D.R. (g/l)
01	0,50	<0,20	20	0,33	0,20
02	0,20	<0,20	21	0,35	1,72
03	0,95	<0,20	22	0,90	4,58
04	0,25	<0,20	23	0,45	0,84
05	1,20	1,74	24	1,10	3,06
06	0,20	<0,20	25	1,58	4,68
07	0,25	<0,20	26	0,80	2,33
08	0,35	<0,20	27	0,90	2,87
09	0,50	<0,20	28	0,20	<0,20
10	0,64	<0,20	29	0,45	1,34
11	0,33	1,82	30	0,90	2,73
12	1,03	0,97	31	0,56	3,06
13	1,11	<0,20	32	0,25	0,26
14	0,40	<0,20	33	0,28	1,33
15	0,50	<0,20	34	0,60	1,64
16	0,58	2,16	35	0,13	2,18
17	0,50	1,57	36	0,28	0,20
18	0,38	0,90	37	1,15	3,43
19	0,90	2,52	38	1,08	2,71

Continua

Continuação da Tabela 7

Amostra	Método Cinético	I.D.R. (g/l)	Amostra	Método Cinético	I.D.R. (g/l)
39	1,15	2,98	55	0,50	1,38
40	1,11	1,46	56	0,80	2,35
41	1,51	2,57	57	0,85	1,98
42	1,58	1,35	58	0,80	1,72
43	1,58	1,94	59	0,33	0,78
44	2,03	3,58	60	0,40	0,98
45	1,75	2,99	61	0,60	0,71
46	1,95	4,13	62	1,13	2,18
47	0,33	<0,20	63	0,75	1,12
48	0,43	<0,20	64	2,38	4,52
49	0,43	0,47	65	1,65	2,37
50	0,80	1,87	66	0,45	0,68
51	0,95	1,86	67	0,95	1,24
52	0,50	1,19	68	1,28	1,34
53	0,73	1,64	69	0,90	1,01
54	0,80	2,33	70	1,50	1,57

* A concentração de haptoglobina determinada pelo método cinético é expressa como capacidade de ligação da cianometahemoglobina em g/l.

- Valores normais para I.D.R.:

Hp1-1 (1,00-2,00) gramas de haptoglobina/litro de soro

Hp2-1 (1,60-3,00) gramas de haptoglobina/litro de soro

Hp2-2 (1,20-2,60) gramas de haptoglobina/litro de soro

Método Cinético x I.D.R.: $r_s = 0,66$ ($t = 7,24$) Significante para $p \leq 0,001$

TABELA 8

Valores de Haptoglobina (Hp)* e Fenótipo Haptoglobínico
do Grupo Normal

Amostra	Hp	Fenótipo	Amostra	Hp	Fenótipo
01	1,08	1-1	29	1,15	2-1
02	0,58	2-1	30	0,90	2-1
03	1,15	2-1	31	1,08	2-1
04	0,58	1-1	32	1,10	2-1
05	1,11	2-1	33	1,08	2-1
06	0,95	2-1	34	0,95	2-2
07	1,43	2-2	35	1,35	2-1
08	1,99	2-1	36	1,20	2-1
09	1,43	2-1	37	1,08	2-2
10	1,03	2-2	38	1,78	1-1
11	1,51	2-1	39	1,60	2-1
12	0,80	2-1	40	1,08	2-1
13	1,75	2-1	41	0,85	2-1
14	1,25	2-2	42	1,15	2-2
15	1,58	2-1	43	1,28	2-1
16	1,58	1-1	44	1,08	2-1
17	1,25	2-1	45	1,05	2-2
18	2,03	2-1	46	2,05	2-2
19	1,58	2-1	47	1,65	2-1
20	1,95	2-2	48	1,65	2-2
21	1,25	1-1	49	1,05	2-2
22	1,35	2-2	50	1,20	2-2
23	0,64	2-1	51	2,05	2-2
24	1,20	1-1	52	1,90	2-1
25	1,55	2-2	53	0,90	2-1
26	0,78	2-1	54	0,60	2-2
27	1,35	2-1	55	1,13	2-1
28	1,10	2-1	56	1,45	2-1

Continua

Continuação da Tabela 8

Amostra	Hp	Fenótipo	Amostra	Hp	Fenótipo
57	1,28	2-2	79	1,20	2-2
58	0,95	2-1	80	0,68	2-2
59	2,53	1-1	81	1,50	2-1
60	1,20	2-1	82	1,58	1-1
61	1,83	2-1	83	1,60	2-1
62	1,05	2-1	84	0,90	2-1
63	1,13	2-2	85	1,20	2-1
64	1,13	2-2	86	0,68	2-2
65	0,95	2-1	87	0,95	2-1
66	1,35	2-2	88	1,75	2-2
67	0,90	2-1	89	1,45	2-1
68	1,45	2-1	90	0,83	2-2
69	1,45	2-2	91	1,75	2-1
70	1,00	2-1	92	1,35	1-1
71	0,65	2-1	93	1,60	2-1
72	1,75	2-1	94	0,83	2-1
73	1,90	2-1	95	1,65	2-1
74	1,05	2-1	96	0,83	2-1
75	1,65	2-2	97	1,50	2-1
76	1,05	2-1	98	0,90	2-2
77	1,50	2-1	99	1,45	1-1
78	0,88	2-1	100	0,70	2-2
			101	0,83	2-1

* Expressos como capacidade de ligação da cianometahemoglobina em g/l.

As amostras de 1 a 15 correspondem aos soros de pacientes portadores de anemias hemolíticas; de 16 a 36, referem-se aos pacientes cirróticos; de 37 a 46 e de 61 a 70, correspondem aos normais e as amostras de 47 a 60 incluem os pacientes portadores de hepatite viral. Não foi possível aplicar o método de OWEN et al. ¹¹⁴ nesta amostragem.

Os valores normais para os níveis séricos de haptoglobina determinados pelo método cinético foram estabelecidos em 101 indivíduos, de ambos os sexos, que constituíram o grupo controle. Os dados de concentração de haptoglobina e os fenótipos haptoglobínicos referentes a esse grupo estão expressos na tabela 8. Os valores normais para os níveis séricos de haptoglobina obtidos, considerando-se dois desvios padrão, foram de (0,42 a 2,06) g/l. Os níveis médios de haptoglobina segundo as faixas etárias foram os seguintes:

Faixa Etária (anos)	Haptoglobina (g/l como capacidade de ligação da cianometahemoglobina)
5 - 10	1,07
11 - 20	1,32
21 - 30	1,13
31 - 40	1,19
41 - 50	1,33
51 - 60	1,31
Mais que 60	1,32

Não se constatou alteração estatisticamente significativa nos níveis de haptoglobina em relação à idade dos indivíduos.

Os níveis médios de haptoglobina para os sexos feminino e masculino foram, respectivamente, 1,22 g/l e 1,26 g/l, não havendo diferença estatisticamente significativa entre ambos.

No grupo de pacientes portadores de anemia hemolítica, estudaram-se os níveis séricos de haptoglobina, bilirrubina, atividade sérica de lactato desidrogenase, concentração de hemoglobina no sangue total, hematócrito, número total de glóbulos vermelhos, porcentagem de reticulócitos e o fenótipo haptoglobínico. Os dados referentes a esse grupo estão demonstrados na tabela 9.

Os seguintes parâmetros foram avaliados no grupo de pacientes cirróticos: níveis séricos de haptoglobina, atividades séricas da alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, colinesterase, gama-glutamil transferase, tempo de protrombina e fenótipo haptoglobínico. Os dados referentes a esse grupo estão expressos na tabela 10.

As determinações efetuadas no grupo de pacientes portadores de hepatite viral foram as seguintes: níveis séricos de haptoglobina, bilirrubinas, atividades séricas da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamiltransferase e fenótipo haptoglobínico. Esses dados estão expressos na tabela 11.

A distribuição dos tipos de haptoglobina(fenótipos Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2) nos grupos controle, de anemias hemolíticas, hepatite e de cirróticos, em termos absoluto e

TABELA 9

Valores de Haptoglobina (Hp)*, Lactato Desidrogenase (LD), Bilirrubinas (total-T, Direta-D e Indireta-I), Hematócrito (Ht), Hemoglobina (Hb), Contagem de reticulócitos (Rt) e Eritrócitos e Fenótipo Haptoglobínico dos Pacientes Portadores de Anemias Hemolíticas

Amostra	Hp	LD(U/l)	T	Bilirrubinas(mg%)	I	Ht(%)	Hb(g%)	Rt(%)	Eritrócitos (x10 ⁶ /mm ³)	Fenótipo
01	0,40	480	7,3	1,0	6,3	30	9,1	11,0	2,80	2-2
02	0,33	639	3,8	0,7	3,1	28	8,6	3,0	2,90	2-2
03	0,35	305	4,1	0,7	3,4	30	9,3	13,0	3,40	1-1
04	1,03	180	0,9	0,3	0,6	38	12,2	0,5	4,00	1-1
05	0,64	950**	1,9	0,9	1,0	25	7,2	4,7	3,36	1-1
06	1,11	200	0,6	0,3	0,3	41	13,2	0,7	4,40	2-2
07	0,40	180	3,5	0,7	2,8	27	7,8	2,5	2,80	2-2
08	1,20	240	3,4	1,4	2,0	25	7,7	2,0	3,10	2-1
09	0,95	-	1,3	0,6	0,7	23	13,7	2,0	4,90	2-1
10	0,20	715	3,4	0,9	2,5	23	7,9	7,5	2,70	2-1
11	0,25	349	3,5	1,1	2,4	27	9,9	11,6	3,00	1-1
12	0,20	249	2,3	0,9	1,4	18	4,9	16,3	2,10	1-1
13	0,25	141	3,2	0,7	2,5	28	8,1	8,0	3,10	2-2
14	0,40	-	3,4	0,7	2,7	19	4,0	17,0	2,20	2-1
15	0,41	1027**	5,7	1,3	4,4	28	10,1	14,0	3,30	2-2
16	0,35	299	0,9	0,2	0,7	35	11,2	3,9	3,80	2-1
17	0,25	239	1,1	0,4	0,7	27	8,8	5,8	3,00	2-1
18	0,25	185	0,9	0,4	0,5	40	14,4	3,8	4,40	2-1
19	0,20	1082**	5,2	1,4	3,8	26	9,0	12,0	3,00	2-1
20	0,55	190	1,9	0,5	1,4	40	14,3	3,5	4,50	2-1

*Capacidade de ligação da cianometahemoglobina ** Soro hemolisado

TABELA 10

Valores de Haptoglobina (Hp)*, Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Gama-glutamyl-Trans_ferase (GGT), Colinesterase (CHE), Tempo de Protrombina (TP) e Fenótipo Haptoglobínico dos Pacientes Cirróticos

Amostra	Hp	AST (U/l)	ALT (U/l)	GGT (U/l)	CHE (U/l)	TP (%)	Fenótipo
01	0,45	31	12	169	541	82	2-2
02	1,58	44	55	39	1646	77	2-1
03	0,20	72	29	34	441	59	2-2
04	0,56	17	12	69	1380	82	2-1
05	0,25	67	35	215	1010	39	1-1
06	0,60	68	12	189	858	47	2-1
07	0,58	34	28	255	922	86	2-2
08	0,98	51	13	464	1353	65	2-1
09	0,35	63	68	421	1193	64	2-1
10	0,50	89	24	75	583	32	2-1
11	0,80	26	11	259	1371	-	2-2
12	0,33	18	7	21	1025	25	2-2
13	0,28	26	20	64	686	70	1-1
14	0,13	24	11	89	862	88	2-1
15	0,28	54	41	72	768	42	2-2
16	1,23	12	12	38	704	100	2-1
17	0,38	14	4	72	1135	79	1-1
18	1,10	31	15	162	991	48	2-1
19	0,90	60	21	89	454	73	2-1
20	0,45	8	5	27	698	65	2-2
21	0,80	13	58	28	591	71	2-1
22	0,20	26	25	121	741	82	2-1
23	0,35	39	27	81	469	36	2-1
24	1,00	22	11	51	914	-	2-1
25	0,33	40	24	62	1135	67	2-1
26	0,60	31	75	146	1380	93	2-1
27	0,40	33	13	71	980	-	2-2

* Capacidade de ligação da cianometahemoglobina em g/l

TABELA 11

Valores de Haptoglobina (Hp)*, Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Gama-Glutamil-transferase (GGT), Bilirrubinas (Total-T, Direta-D, Indireta - I), e Fenótipo Haptoglobínico dos Pacientes Portadores de Hepatite Viral

Amostra	Hp	AST (U/l)	ALT (U/l)	GGT (U/l)	Bilirrubinas (mg%)			Fenótipo
					T	D	I	
01	0,18	92	109	68	4,8	3,1	1,7	2-1
02	0,73	78	169	11	-	-	-	2-1
03	0,33	141	243	102	-	-	-	2-1
04	0,80	128	179	69	2,7	1,7	1,0	2-1
05	0,80	74	86	75	-	-	-	2-2
06	0,50	141	410	172	3,8	3,6	0,2	2-1
07	0,50	350	385	51	3,3	2,5	0,8	2-2
08	0,80	30	153	43	2,8	2,3	0,5	2-1
09	0,41	264	218	-	-	-	-	2-1
10	0,33	232	384	83	-	-	-	1-1
11	0,33	379	469	81	13,0	9,2	3,8	2-2
12	0,55	102	161	112	-	-	-	2-2
13	0,41	35	140	17	2,3	1,9	0,4	2-1
14	0,90	65	164	132	6,6	4,6	2,0	2-1
15	0,85	38	75	16	0,6	0,4	0,2	2-1
16	0,85	757	759	249	11,4	9,2	2,2	2-1
17	0,85	46	166	160	1,6	1,2	0,4	2-1
18	0,50	132	233	32	-	-	-	2-1
19	0,50	161	258	89	5,3	4,3	1,0	2-1
20	0,10	44	73	57	-	-	-	2-2
21	0,80	-	170	77	13,8	9,0	4,8	2-2
22	0,03	293	679	8	57,2	37,6	19,2	2-2
23	0,40	136	173	53	1,4	0,9	0,5	1-1
24	0,55	35	57	91	1,7	1,1	0,6	2-2
25	0,28	110	280	-	-	-	-	2-1

Continua

Continuação da Tabela 11

Amostra	HP	AST	ALT	GGT	Bilirrubinas			Fenótipo
		(U/l)	(U/l)	(U/l)	T	D	I	
26	0,80	168	171	176	0,4	0,3	0,1	2-1
27	0,21	196	318	40	1,2	0,8	0,4	2-1
28	0,50	52	82	23	-	-	-	2-1
29	0,85	49	139	41	0,9	0,8	0,1	2-2
30	1,15	41	38	139	1,9	1,2	0,7	2-1
31	0,28	198	218	213	4,5	3,6	0,9	2-1
32	0,43	15	18	-	-	-	-	2-2
33	0,80	264	422	67	1,3	0,8	0,5	2-1
34	0,20	10	19	15	1,6	1,0	0,6	1-1

* Capacidade de ligação da cianometahemoglobina em g/l

porcentual, estão contidos na tabela 12. Ainda nesta tabela está expressa a distribuição porcentual dos tipos de haptoglobina nos indivíduos de cor branca, em pardos e naqueles de cor amarela. Nessa distribuição os indivíduos de cor negra, por serem em pequeno número, foram incluídos na cor parda.

Os níveis médios de haptoglobina sérica (média $\pm$ 1 desvio padrão) para cada fenótipo haptoglobínico no grupo controle e nos grupos estudo estão expressos na tabela 13.

TABELA 12

Distribuição dos Tipos de Haptoglobina nos Grupos Estudados e em Relação à Cor

Grupo \ Tipo	Absoluto			Porcentual		
	1-1	2-1	2-2	1-1	2-1	2-2
Controle	10	62	29	10	61	29
Anemias hemolíticas	5	9	6	25	45	30
Hepatite viral	2	9	6	12	53	35
Cirroze	3	16	8	11	59	30
Branco	-	-	-	12	58	30
Pardos	-	-	-	7	80	13
Amarelos	-	-	-	15	50	35

TABELA 13

Nível Médio de Haptoglobina Para Cada Fenótipo, Expresso Como Capacidade de Ligação da Cianometahemoglobina em g/l (Média $\pm$ 1 Desvio Padrão), nos Grupos Estudados

Grupo \ Tipo				
	1-1	2-1	2-2	TOTAL
Controle	1,24 $\pm$ 0,70	1,25 $\pm$ 0,40	1,24 $\pm$ 0,36	1,24 $\pm$ 0,41
Anemias hemolíticas	0,49 $\pm$ 0,34	0,49 $\pm$ 0,36	0,52 $\pm$ 0,31	0,50 $\pm$ 0,33
Hepatite viral	0,30 $\pm$ 0,14	0,56 $\pm$ 0,31	0,46 $\pm$ 0,34	0,49 $\pm$ 0,30
Cirrose	0,30 $\pm$ 0,07	0,70 $\pm$ 0,41	0,44 $\pm$ 0,19	0,59 $\pm$ 0,36

A comparação dos níveis médios de haptoglobina entre os grupos de anemias hemolíticas, cirrose e hepatite viral, encontra-se na tabela 14.

A correlação entre os parâmetros estudados em cada grupo foi analisada pelo índice de correlação de SPEARMAN (r_s)¹⁵³. Na tabela 15 estão contidos os índices de correlação para os resultados obtidos no grupo de anemias hemolíticas. Encontra-se na tabela 16 a correlação dos resultados (r_s) para o grupo de hepatite viral e na tabela 17, os índices de correlação dos resultados para o grupo de cirróticos. Estão assinalados nas citadas tabelas os índices de correlação estatisticamente significantes.

TABELA 14

Significância para as Diferenças das Médias dos Níveis de
Haptoglobina nos Grupos Estudados

	Valor de "t"	Nível de Significância
Controle X Anemia Hemolítica	7,59	p < 0,001
Controle X Hepatite	7,20	p < 0,001
Controle X Cirrose	7,61	p < 0,001
Anemia Hemolítica X Hepatite	0,10	N.S.
Anemia Hemolítica X Cirrose	0,15	N.S.
Cirrose x Hepatite	0,45	N.S.

TABELA 15

Correlação entre os Resultados Obtidos no Grupo de Anemias
Hemolíticas (Índice de Correlação de Spearman)

	Hp	LD	B.T.	Ht	Hb	Rt	ER.
Hp		-0,39	-0,23	0,38	0,33	-0,52*	0,52*
LD	-0,39	1	0,46*	-0,52*	-0,28	0,51*	-0,36
B.T.	-0,23	0,46*	1	-0,26	-0,35	0,56*	-0,54*
Ht	0,38	-0,52*	-0,26	1	0,74**	-0,38	0,61*
Hb	0,33	-0,28	-0,35	0,74**	1	-0,39	0,80**
Rt	-0,52*	0,51*	0,56*	-0,38	-0,39	1	-0,25
ER.	0,52*	-0,36	-0,54*	0,61*	0,80**	-0,25	1

* - Significante para p < 0,05

** - Significante para p < 0,001

TABELA 16

Correlação Entre os Resultados Obtidos no Grupo de Cirróticos
(Índice de Correlação de Spearman)

	Hp	AST	ALT	GGT	CHE	T.P.
Hp	1	-0,14	-0,008	0,05	0,21	0,11
AST	-0,14	1	0,54 *	0,48 *	0,14	-0,27
ALT	-0,08	0,54 *	1	0,40 *	0,00	-0,27
j-GT	0,05	0,48 *	0,40 *	1	0,30	-0,05
CHE	0,21	0,14	0,00	0,30	1	0,05
T.P.	0,11	-0,27	-0,27	-0,05	0,05	1

TABELA 17

Correlação Entre os Resultados Obtidos no Grupo de Hepatite
Viral (Índice de Correlação de Spearman)

	Hp	AST	ALT	GGT	B.T.
Hp	1	-0,28	-0,14	0,20	-0,14
AST	-0,28	1	0,91 **	0,30	0,53 *
ALT	-0,14	0,91 **	1	0,18	0,34 *
j-GT	0,20	0,30	0,18	1	0,16
B.T.	-0,14	0,53 *	0,34 *	0,16	1

5. DISCUSSÃO

5.1 Determinação Cinética da Haptoglobina

O objetivo do presente trabalho foi o de adaptar a metodologia cinética para determinação de haptoglobina às nossas condições de trabalho e aplicá-la no estudo de pacientes com anemia hemolítica, cirrose e hepatite viral.

Os métodos disponíveis para avaliação da haptoglobina sérica baseiam-se em sua propriedade de reagir estequiometricamente com a hemoglobina, ou fundamentam-se em propriedades imunoquímicas¹²¹.

Quando se utilizam métodos imunoquímicos, determina-se a massa de proteína (haptoglobina) existente no material biológico sem, no entanto, avaliar-se a capacidade funcional da haptoglobina que seria, fundamentalmente, a de ligar-se à hemoglobina e impedir sua perda pelos rins^{48, 87, 113}.

A determinação da concentração de haptoglobina expressa como capacidade de ligação da hemoglobina, ou de seus derivados, revela a quantidade de haptoglobina sérica capaz de exercer sua função fisiológica.

É uma noção consagrada na literatura científica que a hemoglobina de diferentes espécies animais aumenta a velocidade de oxidação de determinados substratos hidrogenados como os peróxidos de hidrogênio e de etila⁹⁸. No

entanto, não existe proporcionalidade entre a velocidade de reação e a concentração de hemoglobina. O complexo hemoglobina-haptoglobina comporta-se diferentemente da hemoglobina livre, apresentando propriedades catalíticas de uma peroxidase verdadeira⁹⁸.

A metodologia cinética tem sido aplicada por alguns autores^{25,28,154}, utilizando técnicas automatizadas. Em nosso meio existem dificuldades para utilização desses métodos, pois requerem aparelhos sofisticados e de alto custo. Considerando-se sua rapidez e adequação à rotina laboratorial, procurou-se adaptar o método cinético à técnica manual.

Em virtude das dificuldades de extração e purificação da haptoglobina do soro humano, OWEN et al.¹¹⁴ introduziram uma técnica para utilização de "pool" de soros como padrão, o que facilitou a determinação da haptoglobina sérica, por não ser mais necessária a obtenção de um padrão puro.

Neste trabalho, utilizou-se como padrão um "pool" de soros humanos, pelo fato da maior facilidade de obtenção deste material, assim como por ter-se mostrado adequado para a quantificação exata da haptoglobina sérica.

O período de linearidade da velocidade de reação (diferença de absorbância por 30 segundos – $A/30$ segundos) em função do tempo, foi de 60 a 150 segundos após o início da reação (Figuras 1 e 2); no primeiro minuto de reação

não houve linearidade, tendo sido considerado como fase "lag", necessária para o equilíbrio inicial do sistema.

A falta de linearidade no início da reação já foi constatada por outros pesquisadores^{28,98}.

COOPER et al.²⁸ encontraram o valor de 5,5 segundos como tempo máximo para a fase "lag", independente da faixa de concentração da amostra. No método de STANDING & PRICE¹⁵⁴, o período correspondente à fase "lag" foi maior para níveis baixos de haptoglobina, o que acarreta menor exatidão na determinação dos resultados, visto que os autores utilizam apenas o primeiro minuto da reação para efetuar as leituras de absorbância.

Analisando-se a curva traçada na Figura 1, observa-se que não houve variação da linearidade da reação, ou da fase "lag", entre a amostra não diluída e as diluições de 1:5 e 1:10. Da mesma forma, na figura 2 verifica-se que o período de leitura utilizado no presente estudo (de 60 segundos a 150 segundos) é adequado para a faixa de concentração compreendida na curva de calibração.

É de extrema importância efetuar-se uma nova curva de calibração sempre que forem preparados novos reagentes, visto que as coordenadas do ponto "S" (Gráfico A do item 3.2.1.3) poderão mudar. O coeficiente de variação para a quantidade de "pool" de soro correspondente ao ponto "S", considerando-se 14 curvas efetuadas, foi de 9,7%.

Em virtude do nível sérico de haptoglobina ser expresso em função da concentração de hemoglobina, torna-se necessária a utilização de uma solução de hemoglobina com concentração exatamente conhecida. Utilizou-se, aqui, uma solução de cianometahemoglobina com concentração cuidadosamente determinada, por ser este derivado mais estável que a oxihemoglobina durante o armazenamento.

Na figura 3, está expressa a variação da velocidade de reação em função da concentração dos substratos e da cianometahemoglobina. Observa-se que a velocidade máxima foi atingida com quantidades de cianometahemoglobina superiores àquela utilizada no ensaio (50 mg/l). No entanto, concentrações superiores a 50 mg/l apresentam valores de absorvância muito elevados para o branco de reação, o que pode causar erro na determinação de amostras com níveis baixos de haptoglobina. No caso do peróxido de hidrogênio e do guaiacol, foram usadas as concentrações que coincidiram com a velocidade máxima de reação. Concentrações acima de 200 mM/l para o peróxido de hidrogênio resultam em decréscimo na velocidade de reação. Esse efeito foi considerado por COOPER et al.²⁸ como sendo devido à inativação do complexo hemoglobina-haptoglobina causada pelo peróxido de hidrogênio.

A inibição causada pelo guaiacol, quando presente em concentrações elevadas, foi explicada por alguns autores⁹⁸, os quais propuseram um modelo no qual a "enzima" (ou seja, o complexo hemoglobina-haptoglobina) ligaria duas moléculas de guaiacol, sendo que a afinidade seria muito

maior pela primeira molécula em relação à segunda e que a fixação desta última promoveria inibição por competição com o substrato oxidante.

Trabalhos anteriores^{28, 59, 154}, aplicando a metodologia cinética, utilizaram temperatura de reação igual a 37°C. No presente estudo os ensaios foram realizados à temperatura ambiente pelo fato de que a maioria dos laboratórios clínicos de pequeno e médio porte, em nosso meio, não estão equipados com espectrofotômetros acoplados à termostato; um dos nossos objetivos foi padronizar uma técnica de dosagem de haptoglobina que se prestasse à rotina laboratorial.

Com o intuito de verificar o efeito da temperatura sobre a atividade peroxidásica do complexo hemoglobina-haptoglobina, dosaram-se 18 amostras de soro a 37°C e à temperatura ambiente, a qual variou entre 25°C e 28°C. Os valores obtidos a 37°C foram, em média, 10% mais elevados (Tabela 2). Tomando-se 27°C como temperatura ambiente média utilizada, tem-se que, para uma variação de 10°C, houve aumento médio de 10% na concentração de haptoglobina medida.

A precisão do método cinético foi avaliada pela determinação do coeficiente de variação intra-ensaio, obtendo-se um valor de 2,1% para um soro com concentração de 1,28 g/l, expresso como capacidade de ligação da cianometahemoglobina, e do coeficiente de variação inter-ensaio, que foi igual a 9,2% para uma amostra com concentração média de 1,11 g/l.

O limite aceitável de erro (L.A.E.) do método cinético nas condições aqui utilizadas, calculado pela fórmula de TONKS¹⁵⁹, foi de 39%. O valor corrigido para o L.A.E. foi de 20%. Em geral, aceita-se que o valor correspondente a 2 vezes o coeficiente de variação (C.V.) não deve ultrapassar o L.A.E. Como no método utilizado o valor correspondente a duas vezes o C.V. é igual a 18,4%, conclui-se que o mesmo está dentro dos limites aceitáveis de erro de Tonks, sendo preciso segundo esse critério.

A reprodutibilidade do método pode ser considerada boa em vista do valor do coeficiente de variação intra-ensaio, o qual foi semelhante a valores citados na literatura^{28,88}.

O efeito da diluição do soro foi avaliado (Tabela 3a), encontrando-se valores de 98,6% a 101%, nas diluições utilizadas, em relação ao material biológico não diluído (valor considerado real). Quando a concentração do soro diluído foi inferior a 0,09 g/l, obtiveram-se resultados falsamente elevados, indicando ser este valor o limite de sensibilidade do método. Como o material biológico é normalmente diluído 1:5 para a execução do ensaio, conclui-se que amostras com concentração menor que 0,45 g/l não deverão ser diluídas para que sejam medidas com exatidão.

Os interferentes estudados na avaliação do método foram a bilirrubina e hemoglobina (Tabelas 4 e 5). O efeito da hemólise no material biológico não foi significativo para níveis de hemoglobina até 200 mg/100 ml, o que

corresponde a uma hemólise grosseira e visível. Não houve qualquer interferência no nível de haptoglobina para valores de bilirrubina na faixa de 5 mg/100 ml a 40 mg/100 ml.

Para melhor avaliação da exatidão do método, compararam-se os resultados obtidos pelo método cinético com aqueles fornecidos pelo método de referência de OWEN et al.¹¹⁴, que mede a atividade peroxidásica do complexo hemoglobina-haptoglobina e com a imunodifusão radial. Utilizando-se uma pequena amostragem (n= 10) composta por soros normais, não se constatou correlação entre os métodos cinético e de OWEN et al.¹¹⁴, porém houve boa correlação entre este último e a imunodifusão radial ($r_s = 0,90$; $p < 0,001$). No entanto, quando se empregou uma amostragem maior (n= 70), obteve-se alta correlação ($r_s = 0,66$; $p < 0,001$) entre o método cinético e a imunodifusão radial (Tabela 7).

Os valores normais ($\bar{x} \pm 2s$) obtidos pelo método cinético são comparáveis àqueles citados na literatura:

TABELA 18. Valores Normais para a Haptoglobina Sérica, Encontrados por Diversos Autores

<u>Autor</u>	<u>Método</u>	<u>Haptoglobina</u> (capacidade de ligação da cianometahemoglobi- na em g/l)
Presente trabalho	Cinético	0,42 a 2,06
	Peroxidase-guaiacol	
SMITH & OWEN ¹⁴⁵	Peroxidase-guaiacol	0,04 a 2,20
ALLISON ⁴	Eletroforese em gel de amido	0,68 a 1,85
HALLIDAY ⁵⁹	Peroxidase-Guaiacol	0,28 a 1,85

Continua

Continuação da Tabela 18

<u>Autor</u>		<u>Haptoglobina</u> (capacidade de ligação da cianometahemoglobi na em g/l)
NYMAN ¹¹⁰	Peroxidase-iodeto	0,20 a 2,50
ELSON ³⁹	Absorção na banda Soret	0,23 a 1,41
LENTE <u>et al.</u> ⁸⁸	Nefelométrico	0,40 a 2,40

Com base nos dados experimentais obtidos e na comparação com aqueles existentes na literatura, pode-se admitir a validade de utilização do método cinético avaliado neste trabalho.

Em relação à imunodifusão radial, o método cinético apresentou-se mais sensível, visto que amostras com baixa concentração de haptoglobina, mesmo quando não diluídas, estavam abaixo da sensibilidade do primeiro método, sendo, entretanto, determinadas pelo último (Tabela 7).

Outra desvantagem do método de imunodifusão radial consiste na necessidade da determinação do tipo de haptoglobina em todas as amostras, o que implica em maior trabalho e consumo de tempo. Isto decorre do fato que os anti-soros utilizados não são fenótipo específicos, assim como pela diferença entre os pesos moleculares e coeficientes de difusão dos três fenótipos de haptoglobina. Em virtude disso, o valor numérico resultante da medida dos halos de precipitação deve ser multiplicado por um fator de correção determinado experimentalmente para cada fenótipo¹⁶².

Alguns autores ^{44,59,154} têm citado que a variação no peso molecular dos diferentes tipos de haptoglobina afeta a quantidade de hemoglobina ligada por unidade de peso da haptoglobina.

ENGLER et al. ⁴⁴ encontraram, pelo método de saturação com a hemoglobina, que para os polímeros da Hp2-2 e Hp2-1, a atividade peroxidásica relativa a uma mesma quantidade de hemoglobina foi idêntica em 86% dos casos analisados, sendo que para a Hp1-1 a atividade peroxidásica calculada da mesma maneira foi 16% mais elevada.

Neste trabalho, não se observou variação da atividade peroxidásica do complexo cianometahemoglobina-haptoglobina em relação ao fenótipo apresentado pela amostra, tanto no grupo controle como para os grupos estudo (Tabela 13). Este fato permite afirmar que a metodologia cinética aqui utilizada não requer a realização da tipagem fenotípica para a determinação da concentração de haptoglobina.

Os níveis séricos de haptoglobina não variaram em função do sexo dos indivíduos do grupo controle, o que está de acordo com o estudo de SMITHIES ¹⁴⁶. Considerando-se este fato, pode-se pensar que a influência dos estrógenos e andrógenos nos níveis de haptoglobina, citada na literatura ¹²¹, deve ser insignificante na população normal.

Na faixa etária compreendida pelo grupo controle (6 a 74 anos), não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de haptoglobina sérica em re

lação à idade dos indivíduos o que está de acordo com dados da literatura⁵⁹.

5.2 Fenótipos da Haptoglobina

Estudos populacionais realizados em vários países demonstram maior incidência para o fenótipo Hp2-1:

TABELA 19

Indidência dos Fenótipos de Haptoglobina em Vários Países

<u>Local</u>	<u>Hp2-1</u> (%)	<u>Hp2-2</u> (%)	<u>Hp1-1</u> (%)	<u>Autor</u>
Canadá	48,8	27,9	23,2	SMITHIES ¹⁴⁶
Estados Unidos	50,3	27,0	23,2	GIBLETT <u>et al.</u> ⁵⁵
Austrália	53,3	32,4	13,2	SMITH & OWEN ¹⁴⁵
Suécia	46,9	31,1	21,0	NYMAN ¹¹⁰
Inglaterra	55,5	31,7	10,1	ALLISON ⁴
Inglaterra	47,9	39,5	12,6	HALLIDAY ⁵⁹
Estados Unidos	44,2	43,2	12,5	QUEEN & PEACOCK ¹²⁸
Brasil	49,0 16,0	35,0 49,0	16,0 35,0	HOXTER <u>et al.</u> ⁶⁹

No Brasil, HOXTER et al.⁶⁹ realizaram um levantamento dos fenótipos haptoglobínicos em amostragem da população da cidade de São Paulo, constatando, igualmente, maior predominância do tipo Hp2-1. No grupo controle utilizado neste trabalho, verificou-se, também, maior frequência

deste tipo, significando que esses dados são concordantes com aqueles anteriormente citados na literatura.

Quando se calculou o percentual de incidência dos fenótipos em relação à cor, constatou-se predominância do tipo Hp2-1, tanto para indivíduos brancos, quanto para amarelos e pardos.

GIBLET⁵⁴, estudando 92 famílias de raça negra nos Estados Unidos da América do Norte, verificaram maior incidência do fenótipo Hp2-1 e anaptoglobinemias em 2,8% dessa população.

A análise dos tipos de haptoglobina em três grupos étnicos (caucasiano, negro e oriental) realizada por GIBLET⁵⁵ demonstrou maior percentual para o fenótipo Hp2-1 em todos os grupos; no entanto, os negros apresentaram maior frequência do gene Hp¹ (maior percentual do tipo Hp1-1) em relação aos outros grupos e 3,4% de anaptoglobinemias.

ALLISON et al.⁵ encontraram alta incidência (32,3%) de anaptoglobinemias em negros nigerianos e predominância do fenótipo Hp1-1. Este fato parece ser mais uma peculiaridade da população desta região do que uma característica da raça negra, visto que os estudos anteriormente citados^{54,55} não encontraram a mesma porcentagem em indivíduos negros. Provavelmente a população analisada por ALLISON et al.⁵ possuía doenças associadas à hemólise intravascular, tais como a malária. Dessa forma o aumento do consumo de haptoglobina resultaria em uma sensível diminuição de seus níveis séricos o que poderia simular um estado de anaptoglobinemias por

causas genéticas. Por outro lado, os autores não determinaram o nível sérico de haptoglobina nestes pacientes, verificando apenas o fenótipo haptoglobínico pela eletroforese em gel de amido. Sendo esta técnica pouco sensível, pacientes com níveis séricos de haptoglobina muito diminuídos (abaixo da sensibilidade do método), podem ter sido classificados, erroneamente, como possuindo o fenótipo Hp0-0 (anaptoglobinemias).

No presente trabalho, os indivíduos de raça negra foram em pequeno número (n= 6), tendo sido incluídos no grupo de pardos cujo número total foi igual a vinte. O fato de não ter ocorrido anaptoglobinemias nesse grupo, assim como a menor porcentagem de indivíduos com o fenótipo Hpl-1, em relação aos estudos anteriores, pode ser devido ao número reduzido de elementos dessa amostragem, ou a uma característica real deste grupo estudado. Para conclusões definitivas a esse respeito seria necessário um estudo com maior casuística.

A ocorrência de polimorfismo no loco da haptoglobina deu origem a vários estudos^{4,75,168} com o objetivo de verificar a possível associação entre os fenótipos de haptoglobina e várias doenças. Essa linha de investigação presume que a existência de correlação entre o tipo de haptoglobina e algumas patologias poderia significar uma relação entre as características intrínsecas transmitidas pelo gene alelo Hp (ou algum outro gene ligado a ele) e os mecanismos patogênicos das doenças.

Várias foram as doenças nas quais se estudaram essas correlações, tais como: leucemia, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, síndrome de Down, hemofilia, reumatismo, esquizofrenia e tuberculose. A diferença mais significativa foi observada na leucemia, onde ocorreu uma prevalência três vezes maior para o fenótipo Hp1-1, em relação ao tipo Hp2-2 e Hp2-1 + Hp2-2 ¹⁶⁹. Em relação a outras neoplasias, TSAMANTANIS et al. constataram maior frequência do tipo Hp1-1 em pacientes portadoras de carcinoma de mama.

Para o grupo de anemias hemolíticas, aqui estudado, não seria válido analisar a incidência dos fenótipos, pois o mesmo foi composto por patologias de etiologia diversa, que tiveram como característica comum a ocorrência de hemólise intravascular, sendo necessário maior número de cada uma delas para qualquer estudo nesse sentido. No entanto, se for considerada apenas a característica da hemólise intravascular na casuística estudada, não houve diferença quanto à distribuição dos fenótipos em relação ao grupo controle (Tabela 12).

No grupo de hepatopatias analisado neste estudo, a incidência dos tipos de haptoglobina foi semelhante ao grupo controle, ou seja, maior incidência para o heterozigoto Hp2-1 (Tabela 12). Esses dados são concordantes com observações de outros autores ^{75,169}.

PROKOP et al. ¹²⁶ constataram que entre portadores sãos de anticorpos contra o antígeno de superfície

do vírus B da hepatite (anti-HBsAg), havia maior incidência do fenótipo Hp2-2. Entretanto, HENKE et al.⁶², utilizando a técnica de radioimunoensaio para a detecção de anticorpos anti-HBsAg em portadores sãos, não comprovaram os dados de PROKOP et al.¹²⁶, atribuindo essa disparidade dos resultados ao fato deste último autor ter utilizado a técnica de contra-imunoelektroforese, muito menos sensível.

No grupo de hepatite viral constatou-se, como no grupo controle, maior incidência para o fenótipo Hp2-1 para os pacientes com hepatite viral aguda e hepatite crônica ativa, independente da presença de anticorpos anti-HBsAg.

5.3 Valor da Haptoglobina nas Anemias Hemolíticas

Na presença de processos hemolíticos, seja intra ou extravasculares, os níveis séricos de haptoglobina encontram-se diminuídos^{17,46,94,131,142}.

REERING-BRONGERS et al.¹³¹ verificaram, em pacientes com hemólise intravascular, nos quais a vida média dos eritrócitos marcados com ⁵¹Cr estava significativamente diminuída (menor que 20 dias), que os níveis séricos de haptoglobina encontravam-se diminuídos na quase totalidade dos casos.

Segundo SHINTON et al.¹⁴², o estudo da sobrevivência das hemácias, utilizando técnicas com isótopos radioativos, seria o método mais exato para avaliação da provável

etiologia hemolítica das anemias. No entanto, os autores concluem que essas técnicas consomem muito tempo, requerem vārias amostras e equipamentos especiais, além de exporem o pa-
ciente a uma certa dose de radiação.

No presente estudo, utilizou-se a dosagem de haptoglobina juntamente com outros parâmetros bioquímicos (atividade da lactato desidrogenase e nível sérico de bilirubina) e hematológicos (hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem de reticulócitos e do número total de eritrócitos), envolvendo técnicas simples, com o intuito de verificar a presença e intensidade da hemólise nos diversos tipos de anemias hemolíticas estudadas.

Durante a hemólise intravascular, a hemo-
globina, liberada pela lise dos eritrócitos, combina-se com a haptoglobina, sendo este complexo depurado com uma velocidade constante (15 mg de hemoglobina/100 ml de plasma) e totalmente eliminada da circulação num prazo de oito horas ¹²¹. Nos processos muito intensos a concentração sérica da haptoglobina aproxima-se do nível zero, pelo consumo total de haptoglobina existente no plasma, não retornando ao normal antes de dois a oito dias ¹²¹. Quando ocorre hemólise moderada, onde a capacidade de ligação da haptoglobina não foi excedida, seus níveis permanecem baixos, mas sem atingir o zero ¹²¹. Portanto, a diminuição dos níveis séricos de haptoglobina indicariam com grande sensibilidade a presença de um processo hemolítico agudo.

Justifica-se a utilização da medida de atividade da lactato desidrogenase (LD) como indicador de hemólise, pelo fato das hemácias conterem em seu interior atividade considerável dessa enzima (cerca de 37 UI/ml)⁴⁰. Na ocorrência de hemólise há liberação desse conteúdo enzimático para a circulação, aumentando os níveis de atividade da LD sérica.

Nas células do sistema reticuloendotelial, a degradação do grupo heme da hemoglobina resulta no composto tetrapirrólico biliverdina, que é rapidamente reduzido à bilirrubina. No fígado, a bilirrubina livre (indireta) é conjugada com ácido glicurônico, transformando-se no conjugado diglicuronídeo (bilirrubina direta). Nos processos hemolíticos ocorre hiperbilirrubinemia devido ao aumento de bilirrubina indireta.

Na vigência de estado hemolítico crônico, ocorre um estímulo eretropoiético persistente mediado pelo hormônio de origem renal denominada eritropoietina⁴⁵. Este hormônio atua sobre a velocidade de maturação, desnucleação e liberação de eritrócitos imaturos¹⁶ (reticulócitos). A contagem dessas células imaturas é um meio simples e direto de avaliar a velocidade de produção de eritrócitos, porém, devido à liberação prematura ou retardada da medula óssea e de diferentes velocidades de maturação os reticulócitos nem sempre revelam a capacidade eritróide absoluta.

Neste trabalho, o grupo de anemias hemolíticas foi constituído por 11 indivíduos com anemia falcifor-

(ou doença S-S, anemia hemolítica crônica, resultante da homozigose do gene do drepanócito, com presença de hemoglobina s); um paciente beta-talassemia A_2 (ou anemia de Cooley, doença caracterizada pela redução da velocidade da síntese da cadeia beta de hemoglobina, onde ocorre aumento das hemoglobinas A_2 e F); três com anemia hemolítica auto-imune adquirida (destruição de eritrócitos por mecanismos imunitários); três com hemoglobinúria paroxística noturna (anemia hemolítica provocada por defeitos na membrana dos eritrócitos, os quais aumentam a suscetibilidade dessas células à ação hemolítica do complemento sérico); um apresentando hemoglobinopatia C (doença de hemoglobina C homozigótica) e um portador de hemoglobinopatia S,C (estado heterozigótico, no qual existem dois alelos "beta" anormais, resultando hemoglobinas S e C).

O valor médio para a concentração sérica de haptoglobina neste grupo foi significativamente inferior à média do grupo controle (Tabela 14).

Pela análise da tabela 9, observa-se que os pacientes de números 5 e 8 apresentaram valor normal de haptoglobina sérica, mesmo havendo reticulocitose, diminuição do número total de eritrócitos e de hemoglobina total. No caso número 5, o paciente apresentava história clínica anterior de tuberculose, fato que pode ter contribuído para o aumento de haptoglobina. O paciente de número 8 possuía níveis elevados de proteína C reativa, refletindo a presença de algum estado inflamatório associado, o qual deve ter contribuído para resultar um valor normal de haptoglobina, mesmo

na vigência de hemólise.

Em 3 casos (5, 15 e ¹⁹~~18~~) a medida de atividade da lactato desidrogenase (LD) foi prejudicada pela presença de hemólise no soro analisado, o que causou elevação in débita do valor dessa enzima.

Por outro lado, os níveis séricos de ati vi da de da LD foram normais para alguns pacientes (7, 13, ~~18~~ e ²⁰~~18~~), mesmo quando os outros parâmetros indicavam a presença de processo hemolítico.

MYHRE & RASMUSSEN¹⁰³ constataram, em pacientes submetidos à cirurgias cardíacas para implante de válvu las, estreita relação entre a atividade da LD e o processo hemolítico. No entanto, no estudo de TOSHNER et al.¹⁶⁰, que avaliaram a presença de hemólise em pacientes submetidos à he mo diálise, pode-se constatar que alguns deles previamente transfundidos, apresentavam níveis baixos de haptoglobina, re ticulocitose e atividade normal de LD sérica.

No presente estudo, apenas uma paciente do grupo de anemias hemolíticas apresentou todos os resultados normais. Os dados laboratoriais foram concordantes com o estado clínico da paciente, que não acusava qualquer sinal de crise hemolítica no momento da coleta de sangue para as an ál i ses. Isto demonstra a validade dos parâmetros estudados em excluir a presença de uma crise hemolítica.

Níveis normais de bilirrubina ocorreram em dois pacientes (16 e 18), nos quais se demonstrou reticulocitose e diminuição dos níveis de haptoglobina.

Este fato havia sido anteriormente observado por SHINTON et al.¹⁴² em alguns pacientes portadores de anemias hemolíticas, que apresentavam níveis sensivelmente baixos de haptoglobina e hemoglobina e concentração normal de bilirrubina.

Em nosso trabalho, houve aumento da porcentagem de reticulócitos em quase todos os pacientes, exceto um (número 6) que apresentou somente diminuição discreta de hemoglobina e do número total de eritrócitos.

CULHED³¹ observou, em pacientes submetidos à cirurgia para substituição de válvula aórtica, e existência de hemólise subcrônica moderada indicada por hipohaptoglobinemia, na ausência de reticulocitose. Constatou, também, porcentagem de reticulócitos discreta e inespecificamente aumentada (2,2% e 2,4%), em pacientes sem alterações dos níveis séricos de bilirrubina e haptoglobina.

BELL et al.⁹ constataram hipohaptoglobinemia em 74% dos pacientes portadores de processo hemolítico, enquanto a reticulocitose foi observada em apenas 35% desses casos.

Considerando-se os dados obtidos no presente trabalho, pode-se admitir que a porcentagem de reticulócitos foi suficientemente sensível para indicar a presença de hemólise.

Pela análise da tabela 15, onde estão expressos os índices de correlação entre os parâmetros estuda-

dos no grupo de anemias hemolíticas, verifica-se que houve correlação inversa, estatisticamente significativa, entre os valores de haptoglobina e porcentagem de reticulócitos, assim como correlação positiva com o número total de eritrócitos. Apesar dos níveis de bilirrubina estarem aumentados em intensidade variável na maioria dos pacientes que apresentaram hipohaptoglobinemia, não se encontrou correlação estatisticamente significativa entre haptoglobina sérica e níveis de bilirrubina, o mesmo ocorrendo em relação à concentração de hemoglobina. Esses dados são concordantes com outros da literatura^{31,142}.

A falta de correlação significativa entre os níveis de haptoglobina e atividade da LD pode ser atribuída ao fato de que a atividade dessa enzima foi normal em casos de hipohaptoglobinemia bem evidenciada. Numa tentativa de explicar esse fato seria válido admitir que devido à vida-média relativamente curta da LD no plasma ($LD_1 = 113 \pm 70$ horas; $LD_5 = 10 \pm 2$ horas), seus níveis de atividade seriam normalizados antes que a síntese de haptoglobina e consequentemente sua concentração sérica, tivesse sido restabelecida (o que levaria até cerca de oito dias, após uma crise hemolítica aguda¹²¹).

Por outro lado, a atividade da LD correlacionou-se significativamente com a porcentagem de reticulócitos, hematócrito e níveis séricos de bilirrubina, indicando sua validade para detecção de hemólise.

Pelo conjunto de dados obtidos, pode-se admitir que a hipohaptoglobulinemia indica a presença do processo hemolítico e, se associado à reticulocitose e níveis aumentados de atividade da LD, fornece idéia bastante exata da presença e grau de hemólise. No entanto, na ocorrência de doença inflamatória, poderá ocorrer nível normal de haptoglobina, mesmo na vigência de hemólise moderada.

5.4 Valor da Haptoglobina na Cirrose

A cirrose é definida como "doença hepática crônica de tendência evolutiva, caracterizada por fibrose difusa, processos degenerativos e regenerativos do parênquima hepático e desorganização da estrutura lobular" ¹⁴³.

Os pacientes deste grupo foram classificados de acordo com o critério de Child, segundo CAMPBELL et al. ¹⁹, que consideram os seguintes parâmetros: nível de bilirrubina sérica, albumina, amônea, presença de ascite e alterações neurológicas, estado nutricional do paciente, idade e número de hemorragias. Esse critério tem sido utilizado para estabelecer um prognóstico quanto ao tempo de sobrevivência em pacientes a serem submetidos à cirurgia de "shunt" porto-cava. Aqui, essa classificação foi usada apenas como indicadora da reserva funcional hepática.

Entre as manifestações bioquímicas da insuficiência hepática existente na cirrose, estão incluídas a diminuição da síntese proteica e alterações das atividades

de várias enzimas¹⁴³.

Os níveis de atividade sérica da GGT (gamma-glutamyl transferase) tendem a ser variáveis na cirrose sendo que nos estágios finais da doença, onde a síntese de GGT é afetada, podem-se encontrar níveis séricos normais⁵⁶.

Segundo LUM & GAMBINO⁸⁹, os níveis séricos de atividade da GGT apresentam-se, geralmente, bem elevados (4,4 vezes o valor normal), enquanto as atividades da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão moderadamente aumentadas (1,6 vezes) e normal, respectivamente.

Nos pacientes estudados (Tabela 10), apenas três apresentaram níveis normais de GGT. Nos demais pacientes houve aumento variável (de 0,8 a 16,6 vezes o limite normal) da atividade da GGT, sendo que para o grupo de pacientes etilistas o aumento médio foi de 3,9 vezes o valor normal e para os não-etilistas, de 5,1. Isto, pode indicar que uma vez instalada a cirrose, o efeito do álcool como ⁵⁶indutor ~~de~~ microssomal, provocando aumento da atividade da GGT, parece ser anulado.

O paciente número 12 (Tabela 10) não apresentou alterações dos níveis séricos de atividade da AST, ALT e GGT, no entanto, a concentração de haptoglobina, a atividade da colinesterase e o tempo de protrombina apresentaram-se diminuídos, indicando a presença de insuficiência hepática.

O fígado é o principal local de formação da colinesterase não específica (pseudocolinesterase)⁸¹. Essa enzima é considerada por alguns autores^{81,85} como indicador do processo de síntese hepática. LAMOTTA et al.⁸⁵ encontraram maior porcentual para níveis de atividade diminuídos de colinesterase em comparação à concentração sérica de albumina, tanto em pacientes com cirrose compensada, quanto em cirróticos com doença severa acompanhada de icterícia, ascite e edema.

Verificou-se neste estudo que a colinesterase foi bastante sensível para detectar alterações hepáticas, apresentando níveis abaixo do normal em todos os pacientes, mesmo naqueles com função hepática satisfatória, segundo o critério de CHILD¹⁹.

Distúrbios dos fatores de coagulação são freqüentes na cirrose hepática, devidos, principalmente, à diminuição de sua síntese pelo fígado e à absorção inadequada de vitamina K. A primeira é consequente à insuficiência hepática e a segunda à deficiência de sais biliares no intestino e à má absorção intestinal¹⁴³.

O nível sanguíneo dos fatores componentes do grupo protrombínico (II, VII, IX e X) seria índice sensível de funcionalidade hepática¹⁴³. O tempo de protrombina (T.P.) mede a protrombina (fator II), os fatores V, VII e X e fibrinogênio; consequentemente, alterações do T.P. podem refletir insuficiência hepática.

Neste trabalho, 71% dos cirróticos apresentaram diminuição do T.P., sendo que os restantes 29% possuíam valores dentro da normalidade, mesmo diante de alterações dos outros parâmetros estudados.

Os níveis médios de haptoglobina foram significativamente menores para o grupo cirrótico, quando comparado ao controle (Tabela 14).

Vários autores^{2,64,76,86,97,101,93,120,144} constataram diminuição dos níveis séricos de haptoglobina em pacientes cirróticos.

WILLIAMS et al.¹⁷⁰ encontraram níveis diminuídos de haptoglobina em 30% dos pacientes cirróticos estudados, sendo que os restantes tiveram valores próximos ao limite inferior normal. A hipohaptoglobulinemia não foi atribuída à hemólise crônica, às vezes associada à doença hepática devido ao hypersplenismo, visto que os autores não observaram correlação com as medidas da taxa de sobrevivência dos eritrócitos. Os mesmos constataram que cirróticos descompensados possuíam valores baixos de haptoglobina sérica, enquanto os pacientes considerados compensados, apresentaram níveis mais elevados.

No presente estudo, a maioria dos pacientes que apresentaram níveis normais de haptoglobina foram classificados nas classes B ou C, segundo o critério CHILD¹⁹. Portanto, mesmo nos pacientes com função hepática insatisfatória constataram-se níveis normais de haptoglobina, na casuística estudada.

Pela análise individual dos resultados (Tabela 10), observa-se que muitos pacientes apresentaram valores normais para a haptoglobina, apesar das alterações na atividade das aminotransferases, GGT e colinesterase.

No entanto, no quadro 3, verifica-se que todos aqueles que apresentaram níveis normais de haptoglobina exceto dois (nº 10 e 26), eram portadores de processos de caráter inflamatório, tais como, esofagite e gastrite, ou associação de ambas. Sendo conhecido que a haptoglobina participa na inflamação como protetina de fase aguda, aumentando seus níveis séricos, seria admissível supor-se que possa haver nesses casos, uma estimulação da síntese hepática de haptoglobina, mesmo na vigência de insuficiência hepática.

KAGEYAMA et al. verificaram que pacientes cirróticos portadores de ascite possuíam níveis significamente mais baixos de haptoglobina, em relação àqueles sem ascite. No presente estudo, alguns pacientes nos quais se constatou ascite (Quadro 3) apresentaram níveis normais de haptoglobina (Tabela 10).

No presente trabalho não se constatou correlação significativa entre a haptoglobina e aminotransferases GGT, colinesterase e tempo de protrombina (Tabela 16). Houve correlação positiva apenas entre ALT e AST, assim como de ambas as enzimas com o nível de bilirrubina total. Houve correlação positiva apenas entre ALT e AST, assim como de ambas as enzimas com GGT.

Seria esperado que houvesse correlação direta entre haptoglobina, colinesterase e tempo de protrombina,

considerando-se que esses três parâmetros seriam índices de capacidade de síntese hepática. Não se encontrou na literatura específica trabalhos anteriores que comparem esses três parâmetros no estudo da avaliação da função hepática.

A normalidade em relação ao tempo de protrombina, em 29% dos pacientes demonstra pequena sensibilidade desse parâmetro como indicador da síntese hepática.

Níveis séricos de haptoglobina medidos isoladamente devem ser interpretados com cautela, visto que provavelmente, podem ser alterados pela presença concomitante de processos inflamatórios não associados à lesão hepática.

5.5 Valor da Haptoglobina na Hepatite Viral

A hepatite viral é uma doença sistêmica com lesões hepáticas características, causada por vírus hepatotrópicos ¹³⁹. Destes, já foram identificados dois tipos, denominados de A e B; outros ainda não identificados são designados "não-A" e "não-B".

Em geral a fase aguda da doença tem duração de 2 a 6 semanas, compreendendo três estágios: o inicial, designado de pré-ictérico com duração de 3 a 9 dias e aparecimento de sintomas gastrintestinais, febre, etc. O segundo estágio, ictérico, caracteriza-se pelo aparecimento de icterícia e aumento do fígado. No último estágio ocorre a convalescença com recuperação clínica completa e normalização dos tes

tes laboratoriais, normalmente quatro meses após o início da doença¹³⁹.

Segundo SILVA¹⁴³, as hepatites crônicas caracterizam-se pela persistência dos sinais de atividade da lesão hepática com hepatomegalia, às vezes esplenomegalia, não sendo obrigatória a presença de icterícia e de outras manifestações de insuficiência hepática, sendo que o diagnóstico é realizado através de dados laboratoriais. Como hepatite crônica ^{aguda} ^{ativa}, subentende-se doença com alterações laboratoriais evidentes, tais como: aminotransferases acima de 200 U/l, hipergamaglobulinemia, grande retenção de bromossulfaleína, icterícia e, às vezes, manifestações de auto-imunidade. A hepatite crônica de pequena atividade, com alterações laboratoriais discretas corresponde, anátomo-patologicamente, à hepatite crônica persistente.

Atualmente, é possível a detecção de alguns antígenos dos vírus A e B e anticorpos contra os mesmos na hepatite, que comprovam a etiologia viral da doença, assim como permitem acompanhar sua evolução, juntamente com as determinações bioquímicas. São denominados "marcadores imunológicos da hepatite" o antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg), anticorpo anti-antígeno de superfície (anti-Hbs), anticorpo anti-antígeno de centro do vírus B (anti-HBc) e anticorpo anti-vírus A da hepatite (anti-A).

O HBsAg é encontrado mais frequentemente durante o período de incubação e a fase inicial (2 a 3 semanas) da infecção aguda¹⁵⁵. A persistência de antigenemia por

mais de 3 meses é altamente sugestiva da forma crônica da hepatite¹⁵⁵. A presença de anti-HBs indica exposição prévia ao vírus B e ocorre, normalmente, após o desaparecimento de HBsAg do sangue e durante a convalescência da infecção por vírus B⁶⁷. Anti-HBc ocorre em quase todos os pacientes ativamente infectados (indica ocorrência de replicação viral) , sendo, às vezes, o único marcador da hepatite B, presente durante as fases aguda e convalescência precoce da doença²². Altos títulos de anticorpos anti-A demonstram a presença de hepatite por vírus A.

Na hepatite viral, a necrose celular aguda do fígado é refletida por níveis de atividade sérica extremamente elevados das aminotransferases, principalmente da ALT , enquanto a GGT apresenta aumento moderado⁸⁹.

Neste estudo, todos os pacientes do grupo de hepatite viral, exceto um (nº 30) apresentaram níveis de ALT superiores aos da AST e valores bastante variáveis para a GGT (Tabela 11).

Segundo SHERLOCK¹³⁹, na fase aguda da hepatite viral, as proteínas séricas estão inalteradas na maioria dos casos, podendo haver diminuição da albumina sérica e aumento das globulinas na forma prolongada e severa da doença.

MEHROTRA et al.⁹⁷ encontraram níveis médios normais de albumina sérica em pacientes com hepatite viral aguda e valores para a haptoglobina significativamente inferiores ao normal.

Hiramatsu et al.⁶⁴ empregaram um perfil sêrico proteico no estudo de pacientes com hepatite crônica ativa, encontrando níveis aumentados de imunoglobulinas, transferina, alfa-2-macroglobulina e níveis diminuídos de alfa-1-glicoproteína ácida e haptoglobina. Os autores constataram níveis de haptoglobina mais elevados em pacientes com hepatite crônica ativa em comparação aos cirróticos propondo que à medida que o processo avança para a cirrose⁹, os níveis de haptoglobina diminuem.

No presente estudo, considerando-se os níveis médios de haptoglobina, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de cirrose e hepatite viral, embora ambos apresentassem valores de haptoglobina significativamente diminuídos, em relação ao grupo controle (Tabela 14).

MURRAY-LYON et al.¹⁰², estudando pacientes com hepatite crônica ativa, observaram níveis aumentados de alfa-2-macroglobulina, ceruloplasmina, alfa-1-glicoproteína ácida, concentração sérica diminuída para a haptoglobina e valores normais para albumina sérica. O aumento das proteínas séricas foi atribuído às alterações inflamatórias marcantes do fígado na hepatite crônica ativa, porém a diminuição da haptoglobina não foi elucidada.

Resultados totalmente diversos foram obtidos por SKREDE et al.¹⁴⁴, que encontraram níveis médios de haptoglobina sérica mais elevados em pacientes com hepatite crônica ativa e hepatite crônica persistente, em comparação

àqueles portadores de hepatite viral aguda, sendo que para os dois primeiros grupos alguns valores situaram-se acima do limite superior normal.

Sendo a haptoglobina também considerada como proteína de fase aguda ^{22,43,45,72,83,87,133}, seria esperado que na fase aguda da hepatite viral, onde ocorre um processo inflamatório agudo de todo o fígado com infiltração leucocitária e histiocitária ¹³⁹, os níveis séricos de haptoglobina estivessem aumentados, como ocorre na hepatite tóxica aguda ¹⁴⁴.

Entretanto, no presente estudo, considerando-se os valores individuais de haptoglobina (Tabela 11), observa-se grande flutuação dentro do grupo de pacientes com hepatite viral aguda, com 37,5% deles abaixo do limite inferior normal.

Atribuindo-se a diminuição de síntese hepática à replicação viral no hepatócito, esperar-se-ia que esses pacientes com níveis diminuídos de haptoglobina apresentassem anticorpos anti-antígeno central do vírus B (anti-HBc) positivo ²². Porém, dentre os pacientes com hepatite viral aguda e anti-HBc positivo, 57% apresentaram valores normais de haptoglobina sérica. Na hepatite crônica ativa, a porcentagem foi idêntica.

Dos pacientes com hepatite crônica ativa, 80% apresentaram valores diminuídos de haptoglobina (Tabela 11), porém o número de pacientes (n = 5) foi muito pequeno para qualquer conclusão definitiva.

Todos os pacientes com hepatite crônica persistente tiveram níveis normais de haptoglobina sérica.

No presente estudo não houve, correlação entre haptoglobina e os outros parâmetros estudados no grupo de pacientes com hepatite viral (Tabela 17).

WILLIAMS et al.¹⁷⁰ constataram correlação inversa entre níveis de haptoglobina e bilirrubina sérica total, observando diminuição de haptoglobina nas primeiras três semanas após o aparecimento da icterícia e retorno progressivo ao normal, à medida que a bilirrubina sérica diminuía tendendo à normalidade.

PICCININO et al.¹²⁰ encontraram correlação entre níveis séricos de haptoglobina e atividade sérica das aminotransferases na hepatite viral aguda e prolongada.

Os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles encontrados por CIESLUK & KRAJ²³, que não verificaram qualquer correlação entre haptoglobina, aminotransferases e bilirrubina.

KALINOWSKA et al.⁷⁷ encontraram níveis bastante diminuídos de haptoglobina no pico da hepatite aguda, sendo que os valores mais baixos foram encontrados no coma hepático. Nos casos de hepatite com evolução prolongada, os níveis de haptoglobina permaneceram abaixo do limite inferior normal, mesmo após a normalização da bilirrubina e níveis de aminotransferases discretamente aumentados.

Considerando-se os resultados obtidos neste estudo, a haptoglobina sérica parece ser um índice para indicar o nível de comprometimento hepático na hepatite crônica. Na fase aguda da hepatite viral, a haptoglobina não foi índice sensível para demonstrar alterações da capacidade funcional hepática. Determinações seriadas de haptoglobina sérica poderiam ter valor prognóstico no acompanhamento das hepatites com evolução prolongada.

6. CONCLUSÕES

- 6.1 O método cinético utilizado para a determinação da haptoglobina sérica apresentou resultados exatos e precisos sendo sensível para a faixa de concentração estudada.
- 6.2 Os níveis séricos de haptoglobina, determinados pelo método cinético, não variaram significativamente em relação ao fenótipo haptoglobínico nos grupos estudados.
- 6.3 Quando comparado à imunodifusão radial, o método cinético apresentou as vantagens de maior rapidez e sensibilidade, não sendo necessária a determinação dos fenótipos da haptoglobina, nas amostras, para correção dos resultados.
- 6.4 O fenótipo Hp2-1 foi predominante em todos os grupos estudados, não havendo qualquer associação entre o tipo de haptoglobina e a presença de anemias hemolíticas, cirrose e hepatite viral no material analisado.
- 6.5 Os níveis médios de haptoglobina sérica foram significativamente inferiores nos grupos de anemias hemolíticas, cirrose e hepatite viral, em comparação ao grupo controle.

- 6.6 O estudo de correlação entre os parâmetros utilizados para a avaliação do grau de hemólise, demonstrou correlação estatisticamente significativa entre haptoglobina, porcentagem de reticulócitos e número total de eritrócitos.
- 6.7 Houve correlação estatisticamente significativa entre atividade da lactato desidrogenase, bilirrubina total, porcentagem de reticulócitos e hematócrito, no grupo de anemias hemolíticas.
- 6.8 Nos grupos de cirrose e hepatite viral não houve correlação estatisticamente significativa entre haptoglobina e outros parâmetros estudados.
- 6.9 Na ausência de manifestações inflamatórias, tais como gastrite e esofagite, pode-se utilizar os valores de haptoglobina, para indicar diminuição de síntese proteica hepática, em cirróticos.
- 6.10 O nível sérico de haptoglobina não foi sensível para indicar alterações da capacidade funcional hepática na hepatite viral aguda, parecendo ser mais útil para revelar o grau de comprometimento hepático na hepatite crônica ativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AGOSTINI, A. et al. - Acute Phase Proteins and Healing of Myocardial Infarction. J. mol. cell. Card., London, 4:519-24, 1972.
2. AGOSTINI, A. et al. - Determination of seven serum proteins in alcoholic cirrhosis. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 26:351-5, 1969.
3. AGOSTINI, A. et al. - Immunochemical quantitation of acute phase reactive proteins in myocardial infarction. Amer. Heart J., St. Louis, 80(3):313-8, 1970.
4. ALLISON, A.C. - The genetical and Clinical Significance of the Haptoglobins. Proc. roy. Soc. Med., London, 51:641-5, 1958.
5. ALLISON, A.C. et al. - Haptoglobin types in British Spanish Basque and Nigerian African Populations. Nature, London, 181:824-5, 1958.
6. BALLANTYNE, F.C. et al. - Response of plasma lipoproteins and acute phase proteins to myocardial infarction. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 99:85-92, 1979.
7. BARNETT, D.R. - Structural characterization and genetic variation of haptoglobin. Protides biol. Fluids, Oxford, 22:589-95, 1975.

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviações dos títulos dos periódicos estão de acordo com o WORLD MEDICAL PERIODICALS, 3.ed., New York, 1961.

8. BEARN, A.G. & FRANKLIN, E.C. - Some genetical Implications of Physical Studies of Human Haptoglobins. Science, Washington, 128:596-7, 1958.
9. BELL, R.E. et al. - Chronic Haemolysis Occurring in Patients Following Cardiac Surgery. Brit. Heart J., London, 29:327-32, 1967.
10. BERGSTRAND, C.G. et al. - Serum Haptoglobin in Infancy. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, 13:576-82, 1961.
11. BISERTE, G. et al. - Caractéristiques eletrophorétiques et immunologiques des globulins des liquides d'ascite d'origine néoplasique. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 6:833-45, 1961.
12. BLACK, J.A. & DIXON, G.H. - Amino-acid sequence of Alpha Chains of Human Haptoglobins. Nature, London, 218:736-41, 1968.
13. BLOOM, G.E. et al. - Ring D Chromosome: A second Case Associated with anomalous Haptoglobin Inheritance. Science, Washington, 156:236-44, 1967.
14. BOREL, J.P. et al. - Effect of some purified plasma proteins on collagen biosynthesis "in vitro". Future Trends Inflammation. Proc. int. Meet., Verona, 207:10, 1975. Apud Chem. Abstr., Columbus, 84:19690, 1976.
15. BRECHER, G. - New methylen blue as a reticulocytic stain. Amer. J. clin. Pathol., Baltimore, 19:895-6, 1949.

16. BRECHER, G. & STHOLMAN, F. Jr. - The macrocytic response to erythropoietic stimulation. Proc. Soc. exp. Biol., New York, 107:887, 1961.
17. BRUS, I. & LEWIS, S.M. - Haptoglobin content of serum in Hemolytic Anaemia. Brit. J. Hematol., London, 5:348-55, 1959.
18. CALHOUN, D.B. & ENGLANDER, W.S. - Measurement of the haptoglobin concentration in plasma and other fluids by a simple spectrometric procedure. Anal. Biochem., New York, 99:421-6, 1979.
19. CAMPBELL et al. - Survival Prediction in Portocaval Shunts: A computerized Statistical Analysis. Amer. J. Surg., 126: 748-51, 1973.
20. CHIANCONE, E. et al. - Studies on the reaction of haptoglobin with hemoglobin and hemoglobin chains. J. mol. Biol., London, 34:347-56, 1968.
21. CHILD, J.A. et al. - Acute phase reactant proteins in chronic leukaemia. Biomedicine, Paris, 27:188-90, 1977.
22. CHRISTIANSEN, P.A. - Hepatitis antigen-antibody tests and their clinical significance. J. Indiana med. Assoc., Indianapolis, 865, 1977.
23. CIĘSLUK, S. & KRAJ, M. - Serum haptoglobin levels in virus hepatitis. Acta Med. Pol., Warsaw, 13:319-24, 1972.

24. COLLIER, J. et al. - Australia antigen and human anti-AU.
1. Detection by radioimmunoassay. Fed. Proc., Washing-
ton, 30:354, 1971.
25. COLSON-GUASTALLA, H. et al. - Studies on free or haptoglobulin-bound hemoglobin and derivatives (semihemoglobins and porphyrinated semihemoglobins). Some aspects of their peroxidatic activity. Biochemie, Paris, 57:1035-44, 1975.
26. CONNELL, G.E. & SMITHIES, O. - Human haptoglobins: Estimation and Purification. Biochem. J., London, 72:115-21, 1959.
27. CONNWAY, T.P. & MULLER-EBERHARD, U. - Competitive ligand-binding radioassays for serum proteins. Metab. Clin. Exp., New York, 22(8):1097-1110, 1973.
28. COOPER, J.D.H. et al. - Observations on the Kinetic Method for the estimation of serum haptoglobin as cyanmethaemoglobin binding capacity. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 72:371-8, 1976.
29. CROCKSON, R.A. et al. - Time sequence of acute phase reactive proteins following surgical trauma. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 14:435-41, 1966.
30. CUARTERO, A.R. - Haptoglobins: interés de su estudio en Medicina. Rev. clín. esp., Madrid, 135(2):103-11, 1974.

31. CULHED, I. - Serum haptoglobin in cases with Starr-Edwards Ball-valve prosthesis. Acta Med. Scand., Stockholm, 181(3):321-5, 1967.
32. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. - Hematologia Prática, ed. Torray, Barcelona, 2.ed, p.45, 1973.
33. DASH, S. & DAS, K.C. - Serum haptoglobin concentrations in "pure" iron-deficiency anemia. Clin. Chem., Winston-Salem, 24(5):839-40, 1978.
34. DEUTSCHEN Gesellschaft für Klinische Chemie - Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Z. Klin. Chem. u Klin Biochem., Berlin, 10:182-92, 1972.
35. DEVRED, C. & BILSKI-PASQUIER, G. - Son intérêt diagnostique dans les anémies "inflammatoires". Nouv. Presse Méd., Paris, 29(4):2113, 1975.
36. DOBRYSYCKA, W. et al. - Metabolism of plasma proteins in injury states. Clin. Sci., London, 36:231-40, 1969.
37. DRAGVIK, M. - Haptoglobin determinations in the study of hemolytic anemia. Can. J. med. Technol., 32(1):21-30, 1970.
38. ELLMAN, G.S. et al. - A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., Oxford, 7:88, 1961.

39. ELSON, E.C. - Quantitative Determination of serum haptoglobin. J. Clin. Pathol., London, 62(5):655-63, 1974.
40. EMERSON, P.M. et al. - The origin of the elevated serum Lactate Dehydrogenase in Megaloblastic Anaemia. Brit. J. Haematol., London, 13:656-64, 1967.
41. ENGLER, R. et al. - Hémolyse intravasculaire. Nouv. Presse Méd., Paris, 20(4):1493-96, 1975.
42. ENGLER, R. et al. - Catabolisme du complexe haptoglobine-hémoglobine. Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 49(3):263-72, 1967.
43. ENGLER, R. et al. - Activités peroxydasiques des combinaisons hémoglobiniqes des trois phénotypes de l'haptoglobine. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 47:149-52, 1973.
44. ENGLER, R. et al. - Inhibition of haptoglobin binding with hemoglobin in the rat at the onset of an inflammatory reaction. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 26:491-5, 1969.
45. ERSLEV, A.J. - The effect of hemolysates on red cell production and erythropoietin release. J. Lab. clin. Med., St. Louis, 78:1, 1971.
46. FINK, D.J. et al. - Serum haptoglobin - A valuable diagnostic aid in suspected hemolytic transfusion reactions. J. am. med. Assoc., Chicago, 199(9):109-12, 1967.

47. FOGH, J. - Hemopoietic stem cells as a function of erythropoiesis. Radia. Res., New York, 45:563, 1971.
48. FRANKLIN, E.C. et al. - Haptoglobin hemoglobin metabolism in rabbits studied with I¹³¹ and Fe⁵⁹ labelled complexes. Proc. Soc. exp. Biol., New York, 105:167-70, 1960.
49. FULLER, G.M. et al. - Subunit composition of haptoglobin 2-2 polymers. Biochemistry, Washington, 12:253-6, 1973.
50. GALLEY, M.M.P. et al. - Modifications des protéines sériques chez les personnes âgées. Bordeaux med., Bordeaux, 10(13):867-76, 1977.
51. GARBY, L. & OBARA, J. - Organ uptake and plasma transportation Kinetics of nemoglobin in rats. Blut, Berlin, 6:143-6, 1960.
52. GELLI, G. & FABORNI, A. - Il glucidogramma indagato per mezzo di metodiche elettroforetiche ed immunoelettroforetiche nelle fasi acute della malattia reumatica. Con particolare riguardo alla aptoglobina. Minerva pediatrica, Turin, 16:34-9, 1964.
53. GIBLETT, E.R. - Variant haptoglobin phenotypes. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., Cold Spring Harbor, 29:321-6, 1964.

54. GIBLETT, E.R. - The inheritance of serum types in American Negroes: Evidence for a third allele Hp^{2m} . Am. J. hum. Genet., Chicago, 12:160-9, 1960.
55. GIBLETT, E.R. et al. - Two rare haptoglobin phenotypes, 1-B and 2-B, containing a previously undescribed alpha polypeptide chain. Am.J. hum. Genet., Chicago, 18(5):448-53, 1966.
56. GOLDBERG, D.M. & MARTIN, J.V. - Role of gamma-glutamyl transpeptidase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease. Digestion, Basel, 12:232-46, 1975.
57. GORDON, A.H. & LIMAOS, E.A. - Human blood and rabbit peritoneal leucocytes as sources of endogenous mediators. Brit. J. exp. Pathol., London, 60(4):441-6, 1979.
58. GRÖNWALL, C. - On the serum activity of lactic acid dehydrogenase and phosphohexose isomerase in pernicious and hemolytic anemias. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, 13:29-36, 1961.
59. HALLIDAY, R.B. - Haptoglobin and total seromuroid concentration. Med. Lab. Sci., London, 33(1):23-56, 1976.
60. HEILMANN, von E. - Haptoglobin und seine Klinische Bedeutung. Fortschr. Med., Munich, 97(9):379, 1979.
61. HEMMINGSEN, L. & SKAARUP, P. - Urinary excretion of ten plasma proteins in patients with extrarenal epithelial

- lial carcinoma. Acta chir. scand., Stockholm, 143: 177-83, 1977.
62. HENKE, J. et al. - Haptoglobin und Group-specific Component-Merkmale bei nicht erkrankten Antikörperträgern gegen Hepatitis B Surface Antigen. Blut, Berlin, 36: 109-10, 1978.
63. HINTON, H. et al. - Haptoglobin-mediated transfer of haemoglobin from serum into bile. FEBS Lett., Amsterdam, 112(2):247-50, 1980.
64. HIRAMATSU, S. et al. - The serum protein profile in chronic hepatitis cirrhosis and liver cancer. Acta hepatogastroenterol., Stuttgart, 23:177-82, 1976.
65. HOCHWALD, G.M. et al. - Sites of formation of immune globulins and of a component of C'₃. J. exp. Med., New York, 114:459-70, 1961.
66. HOLLINGER, F.B. et al. - Detection of Hepatitis A Viral Antigen by Radioimmunoassay. J. Immunol., Baltimore, 115:1464, 1975.
67. HOOFNAGLE, J.H. et al. - Antibody to hepatitis B virus Core in man. Lancet, London, ii:869-73, 1973.
68. HOOPER, D.C. et al. - A haptoglobin radioassay based on binding to solid-phase hemoglobin. Anal. Biochem., New York, 93:355-60, 1979.

69. HOXTER, G. et al. - Incidência dos tipos de haptoglobinas na cidade de São Paulo, Brasil. Rev. bras. Med., Rio de Janeiro, 9:287-90, 1965.
70. JAVID, J. - The nature of the difference between haptoglobin polymers in the phenotypes Hp2-1 and Hp2-2. Proc. nat. Acad. Sci., Washington, 52:663-7, 1964.
71. JAVID, J. & PETTIS, P.K. - The modification of hemoglobin-antihemoglobin reaction by haptoglobin. J. Lab. clin. Med., St. Louis, 86(5):777-84, 1975.
72. JAYLE, M.F. - Méthode de dosage de l'haptoglobine sérique. Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 33:876, 1951.
73. JAYLE, M.F. & GILLARD, P. - Precipitation saline d'une protéine définie dans un mélange hétérogène. Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 29:149-53, 1947.
74. JAYLE, M.F. & BOUSSIER, G. - Obtention a l'état homogène d'une mucoprotéine sérique, l'haptoglobine. Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 36(8):959-69, 1954.
75. JÖRGENSEN, G. & HOPFER, U. - Die Verteilung der Haptoglobinhänotypen und Haptoglobinallele bei einigen Krankheiten (Diabetes mellitus, Leberparenchymschaden, Psoriasis vulgaris). Humangenetik, Berlin, 3:277-81, 1967.
76. KAGEYAMA, T. et al. - Serum globulin subfraction variants in liver cirrhosis and hepatoma. Bull. Osaka med. Sch., Osaka, 21(2):132-9, 1975.

77. KALINOWSKA, B. - Wartość rokownicza oznaczania haptoglobiny w wirusowym zapaleniu wątroby. Przezl. epidemiol., Warszawa, 33(3):365-76, 1979.
78. KAMPSCHMIDT, R.F. et al. - Multiple biological activities of a partially purified leukocytic endogenous mediator. Amer. J. Physiol., Washington, 224(3): 530-3, 1973.
79. KASHIWAGI, N. et al. - Changes in serum haptoglobin and group specific component after orthotopic liver homotransplantation in humans. Proc. Soc. exp. Biol. New York, 128(1):247-50, 1968.
80. KAWAMURA, K. et al. - The reactive unit of hemoglobin in hemoglobin-haptoglobin complex formation. Biochim. biophys. Acta, Amsterdam, 285:15-21, 1972.
81. KAUFMAN, K. & WISCONSIN, W. - Serum cholinesterase activity in the normal individual and in people with liver disease. Ann. inter. Med., 41:533-45, 1954.
82. KEENE, W.R. & JANDL, J.H. - The sites of hemoglobin catabolism. Blood, New York, 26(6):705-9, 1965.
83. KRAUSS, S. & SARCIONE, E.J. - Synthesis of serum haptoglobin by the isolated perfused rat liver. Biochim. biophys. Acta, Amsterdam, 90:301-8, 1964.
84. KRAUSS, S. & SARCIONE, E.J. - Role of the liver in the catabolism of serum haptoglobin. Proc. Soc. exp. Biol., New York, 122:1019-22, 1966.

85. LA MOTTA, R.V. et al. - Studies of cholinesterase activity. Gastroenterology, Baltimore, 33:50-7, 1957.
86. LAMY, J. et al. - Hyperhaptoglobinémie des alcooliques chroniques. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 46:257-60, 1973.
87. LAURELL, C.B. & NYMAN, M. - Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. Blood, New York, 12 (6):493-506, 1957.
88. LENTE, van F. et al. - Evaluation of a nephelometric assay for haptoglobin and its clinical usefulness. Clin. Chem., Winston-Salem, 25(12):2007-10, 1979.
89. LUM, G. & GAMBINO, R.S. - Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas or bone. Clin. Chem., Winston-Salem, 18(4):358-62, 1972.
90. MALCHY, B. & DIXON, G.H. - Studies on the interchain disulfides of human haptoglobins. Can. J. Biochem., Ottawa, 51:249-64, 1973.
91. Malchy, B. et al. - The half molecule of haptoglobins: studies on the product obtained by the selective cleavage of a haptoglobin disulfide. Can. J. Biochem., Ottawa, 51:265-73, 1973.
92. MALLOY, H.T. & EVELYN, K.A. - The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol. Chem., Baltimore, 119:481, 1937.

93. MARASINI, B. et al. - Serum proteins of hepatic and extra hepatic origin in alcoholic cirrhosis. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 40:503-4, 1972.
94. MARCHAND, A. et al. - The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease. J. am. med. Assoc., Chicago, 243(19):1009-11, 1980.
95. MARCROFT, J. & NEWLANDS, I.M. - Evaluation of a specific protein analyser. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 46:399-405, 1973.
96. MAUNG, M. et al. - Studies on the nature of the seromucoid and haptoglobin responses to experimental inflammation. J. Biochem., Tokio, 46(5):477-81, 1968.
97. MEHROTRA, M.P. & TANDAN, S. - Serum haptoglobins - as a test of discriminating value in cases of jaundice. Indian J. med. Res., New Delhi, 58(10):1392-6, 1970.
98. MORETTI, J. & WAKS, M. - Mise en évidence et dosage des haptoglobins sériques. Nouv. Rev. franc. Hemat., Paris, 2(3):433-47, 1962.
99. MOURAY, H. et al. - Échanges entre les espaces intra et extra-vasculaires de l'haptoglobine chez le lapin. Bull. Soc. Chim. biol., Paris, 50(4):739-50, 1968.
100. MOURAY, H. et al. - Le rôle du foie dans le métabolisme de l'haptoglobine. C.R. Acad. Sci., Paris, 258(13):5095-8, 1964.

101. MURRAY, R.K. et al. - The role of haptoglobin in the clearance and distribution of extracorpuscular hemoglobin. Blood, New York, 17:45-63, 1961.
102. MURRAY-LYON, L.M. et al. - Quantitative immunoelectrophoresis of serum proteins in cryptogenic cirrhosis, alcoholic cirrhosis and active chronic hepatitis. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 39:215-20, 1972.
103. MYHRE, E. & RASMUSSEN, K. - Serum lactic dehydrogenase activity and intravenous haemolysis. Lancet, London, 1:355, 1970.
104. NAGEL, R.L. & GIBSON, Q.H. - Kinetics and mechanism of complex formation between hemoglobin and haptoglobin. J. biol. Chem., Baltimore, 242(15):3428-3434, 1967.
105. NAKAJIMA, H. et al. - Studies on heme α -methenyl oxygenase. J. biol. Chem., Baltimore, 238(11):3784-96, 1963.
106. NANCE, W.E. & SMITHIES, O. - New haptoglobin alleles: a prediction confirmed. Nature, London, 198:869-70, 1963.
107. NANCE, W.E. et al. - Haptoglobin and catalase loci in man: possible genetic linkage. Science, London, 160:1230-1, 1968.
108. NEUHAUS, O.W. & LIU, A. - Biochemical significance of serum glycoproteins. III. Hepatic production of α_1 and α_2 globulins responding to injury. Proc. Soc. exp. Biol., New York, 117:244-8, 1964.

109. NISHIOKA, M. et al. - Polyacrylamide gel electrophoresis of sera from patients with primary liver carcinoma. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 31:439-46, 1971.
110. NYMAN, M. - Serum haptoglobin. Methodological and clinical studies. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, Suppl. 11(39):1-169, 1959.
111. OHARA, H. et al. - Regulation of the seromucoid and haptoglobin level in serum by the reticuloendothelial system. J. reticuloendothel. Soc., Winston-Salem, 11:301-12, 1972.
112. OHARA, H. et al. - Turnover rate of serum haptoglobin in malignant neoplastic diseases. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 19:41-7, 1968.
113. OHSHIRO, T. et al. - Prevention of hemoglobinuria by administration of haptoglobin. Res. exp. Med., Berlin, 177:1-12, 1980.
114. OWEN, J.A. et al. - A simple method for the determination of serum haptoglobins. J. clin. Pathol., London, 13:163-4, 1960.
115. PALMER, W.G. - The serum haptoglobin response to inflammation in neonatal mice and its relationship to phagocytes. J. reticuloendothel. Soc., Winston-Salem, 19(5):301-9, 1976.
116. PALMER, W.G. & SCHUELER, S. - Association between macrophage activity and serum haptoglobin levels. Biomedicine, Paris, 25:88-90, 1976.

117. PAPPALARDO, A. et al. - Valore e significato del dosaggio immunologico di alcune sialoglicoproteine seriche nelle malattie reumatiche a carattere inframamatorio. Mi-nerva med., Turin, 70:2667-72, 1979.
118. PASTEWKA, J.V. et al. - An improved haptoglobin subtyping procedure using polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., New York, 51:152-62, 1973.
119. PETZL, M.L. & PRIMO-PARMO, S.L. - Eletroforese de hemoglobina, haptoglobina, anidrase carbônica II e esterase em gel de amido de milho comercial. Ciência e Cultura, São Paulo, 31(8):896-7, 1979.
120. PICCININO, F. et al. - Determinazione dei livelli sierici di aptoglobina in corso di varie epatopatie. Mi-nerva Med., Turim, 57(101):4331-5, 1966.
121. PINTERA, J. - The biochemical, genetic and clinicopathological aspects of haptoglobin. Ser. Haematol., Conpenhagen, 4:1-183, 1971.
122. PIZZOLATO, M.A. - Two dimensional immunoelectrophoresis on cellulose acetate: improved method for routine protein estimation. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 45:207-14, 1973.
123. POLONOWSKI, M. & JAYLE, M.F. - Peroxydases animals. Leur spécificité et leur rôle biologique. Bull.Soc. Chim. biol., Paris, 21:66-91, 1938.

124. POLONOWSKI, M. & JAYLE, M.F. - Sur la préparation d'une nouvelle fraction des protéines plasmatiques, l'haptoglobine. C.R. Acad. Sci., Paris, 211(21):517-9, 1940.
125. POWANDA, M. et al. - Phagocytosis and the metabolic sequelae of infection. J. reticuloendothel. Soc., Winston-Salem, 27(1):67-82, 1980.
126. PROKOP, O. et al. - Hp und Hepatitis Bs-Antikörperträger. Blut, Berlin, 36:109, 1978.
127. PRUMIER, J.H. et al. - Site of formation of the group-specific component and certain other serum proteins. Proc.Soc.exp.Biol., New York, 115:1005-7, 1964.
128. QUEEN, K.G. & PEACOCK, A.C. - Haptoglobin type determination using non-carcinogenic reagents. Results on 192 normal subjects in Maryland. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 13:45-51, 1966.
129. QUICK, A.J. - Determination of prothrombin. Proc. Soc. exp. Biol., New York, 42:788-9, 1929.
130. RAMAKERS, J.M. & KREUTZER, H.J.M. - Turbidimetric determination of haptoglobin. J. clin. Chem. clin. Biochem., Berlin, 14:407-10, 1976.
131. REERINK-BRONGERS, E.E. et al. - Haptoglobin and increased haemolysis. Vox Sang., Basel, 7:619-31, 1962.
132. REICHLIN, M. et al. - Immunological biochemical and comparative studies of the hemoglobin-haptoglobin reaction. J. Chem. Phys., New York, 71(7-8):999-1006, 1974.

133. ROBSON, E.B. et al. - Probable assignment of the alpha locus of haptoglobin to chromosome 16 in man. Nature, London, 223:1163-5, 1969.
134. ROMERO, R.L. et al. - Alfa₂ Lipo, haptoglobina y siderofilina en la aterosclerosis. Rev. clin. esp., Madrid, 95(6):363-9, 1964.
135. ROTH, E. et al. - Controle de Qualidade e Certificação de Laboratórios. Rev. bras. Patol. clin., Rio de Janeiro, 11(2):45-75, 1975.
136. ROUGEMONT, A. et al. - Taux d'haptoglobine, paludisme et anémie chez l'adulte africain. Bull. Soc. Pathol. Exot. Ses Fil., Paris, 67(4):370-7, 1974.
137. SASS, M.D. & SPEAR, P.W. - Estimation of haptoglobin using haemoglobin labelled with radioactive Iron-59. Nature, London, 20:285-6, 1962.
138. SCHULTZE, H.E. & HEREMANS, J.F. - Molecular biology of human proteins, vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1966, 420 p.
139. SHERLOCK, S. - Diseases of the liver and biliary system. 4.ed., Oxford, Blackwell, 1968. 530 p.
140. SHIM, B.S. - Increase in serum haptoglobin stimulated by prostaglandins. Nature, London, 259:326-7, 1976.
141. SHIM, B.S. & BEARN, A.G. - Immunological and biochemical studies on serum haptoglobin. J. exp. Med., New York, 120:611-25, 1964.

142. SHINTON, N.K. et al. - Diagnostic value of serum haptoglobin. J. clin. Pathol., London, 18:114-8, 1965.
143. SILVA, L.C. - Cirrose Hepática. São Paulo, Sarvier, 1969. 301 p.
144. SKREDE, S. et al. - Serum proteins in diseases of the liver. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, 35(5):399-406, 1975.
145. SMITH, H. & OWEN, J.A. - The determination of haptoglobins in normal human serum. Biochem. J., London, 78:723-8, 1961.
146. SMITHIES, O. - Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J., London, 61:629-41, 1955.
147. SMITHIES, O. & WALKER, N.F. - Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance. Nature, London, 178:694-5, 1956.
148. SMITHIES, O. et al. - Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. Nature, London, 196:232-6, 1962.
149. SMITHIES, O. et al. - Inheritance of haptoglobin subtypes. Am. J. hum. Genet., Chicago, 14:14-21, 1962.
150. SMITHIES, O. et al. - Gene action in the human haptoglobins. J. mol. Biol., London, 21:213-24, 1966.

151. SNELLMAN, O & SYLVÉN, B. - Haptoglobin acting as a natural inhibition of cathepsin B activity. Nature, London, 216:1033, 1967.
152. SNYDER, S. et al. - Serum glycoproteins in coronary artery disease. Circulation, New York, 56(3):359-62, 1977.
153. SPEARMAN, C. - The proof and measurement of association between two things. Am. J. Psychol., Urbana, 15:72-101, 1904.
154. STANDING S. & PRICE, C.P. - A Kinetic method for the determination of haptoglobin ad haemoglobin binding capacity. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 66:393-403, 1976.
155. SUTNICK, A.I. - Australia Antigen. Progress report. Med. Clin. N. Am., Philadelphia, 57:1029-43, 1973.
156. SZASZ, G. - A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. Clin. Chem., Winston-Salen, 15:124, 1969.
157. TEISBERG, P. & GJONE, E. - Probable linkage of LCAT locus in man to the alfa haptoglobin locus on chromosome 16. Nature, London, 249:550-1, 1974.
158. TERPSTRA, F.A. & SMITH, D.B. - The reaction between hemoglobin alfa-subunit and haptoglobin. Can. J. Biochem., Ottawa, 54:1011-5, 1976.

159. TONKS, D.B. - Quality Control in Clinical Laboratories.
2.ed., Ontrio, Warner-Chilcott, 1972.
160. TOSHNER, D. et al. - Serum haptoglobin and lactic dehydrogenase during haemodialysis. Nephron, Basel, 9: 235-41, 1972.
161. TSAMANTANIS, C. et al. - Haptoglobin types in breast carcinoma. Human Hered., Basel, 30:44-5, 1980.
162. VALETTE, I. et al. - Is immunochemical determination of haptoglobin phenotype dependent? Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 99:1-6, 1979.
163. VAN KAMPEN, E.J. & ZIJLSTRA, W.G. - Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 6:538-44, 1961.
164. VELDE, E.R. et al. - Acute-phase reactants and complement components as indicators of recurrence in human cervical cancer. Europ. J. Cancer, Oxford, 13:893-9, 1979.
165. WADA, T. et al. - Autorradiographic study on the site of uptake of the haptoglobin-hemoglobin complex. J. reticuloendothel. Soc., Winston-Salen, 8: 183-93, 1970.
166. WADA, T. et al. - Studies on haptoglobin synthesis in reticuloendothelial tissues. J. reticuloendothel. Soc., Winston-Salen, 8:195-201, 1970.
167. WARD, A.M. et al. - Acute-phase reactant protein profiles: an aid to monitoring large bowel cancer by CEA and serum enzymes. Br.J.Cancer, London, 35:170-8, 1977.

168. WEIMER, H.E. et al. - The influence of tumor growth on the synthesis of alfa₂-AP (acute phase) globulin of rat serum. Can. J. Biochem., Ottawa, 45:1937-41, 1967.
169. WENDT, G.G. et al. - Serumgruppen und Krankheit. Human-genetik, Berlin, 6:281-99, 1968.
170. WILLIAMS, R. et al. - Serum haptoglobin in liver disease. Gut, London, 2:297-303, 1961.