



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE BIOMEDICINA**

**THIAGO GONZALES SAMARITANO VILLALPANDO SILVA**

**ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: UMA ANÁLISE LITERÁRIA DAS  
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS E MORFOLÓGICAS COMO FERRAMENTAS  
DIAGNÓSTICAS**

**NATAL  
2024**

THIAGO GONZALES SAMARITANO VILLALPANDO SILVA

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: UMA ANÁLISE LITERÁRIA DAS  
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS E MORFOLÓGICAS COMO FERRAMENTAS  
DIAGNÓSTICAS

Monografia apresentada ao curso de graduação em Biomedicina, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof(a). Ma. Christiane Medeiros Bezerra.

NATAL

2024\_



Esta obra está licenciada com uma licença *Creative Commons* Atribuição 4.0 Internacional. Permite que outros distribuam, remixem, adaptem e desenvolvam seu trabalho, mesmo comercialmente, desde que creditem a você pela criação original. Link dessa licença: [creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo

Nelson – Centro de Biociências – CB

Silva, Thiago Gonzales Samaritano Villalpando.

Anemia hemolítica autoimune: uma análise literária das alterações laboratoriais e morfológicas como ferramentas diagnósticas / Thiago Gonzales Samaritano Villalpando Silva. - 2024.

39 f.: il.

Monografia (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Curso de Biomedicina. Natal, RN, 2024.

Orientação: Profa. Ma. Christiane Medeiros Bezerra.

1. Anemia hemolítica autoimune - Monografia. 2. Autoanticorpos - Monografia. 3. Diagnóstico - Monografia. I. Bezerra, Christiane Medeiros. II. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 616.155.194

Elaborado por KATIA REJANE DA SILVA - CRB-15/351

THIAGO GONZALES SAMARITANO VILLALPANDO SILVA

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: UMA ANÁLISE LITERÁRIA DAS  
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS E MORFOLÓGICAS COMO FERRAMENTAS  
DIAGNÓSTICAS

Monografia apresentada ao curso de graduação em Biomedicina, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 27/11/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Ma. Christiane Medeiros Bezerra  
Orientadora

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof(a). Dra. Deysiane Oliveira Brandao  
Membro interno

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof(a). Ma. Mariane dos Santos Duarte Spinelli  
Membro externo

Hemocentro Dalton Cunha

Dedico esse trabalho ao meu melhor amigo de 4 patas. Obrigado por me acompanhar em toda essa caminhada, em todas as mudanças e momentos difíceis. Que lá do céu você esteja se divertindo demais como merece enquanto eu levo minhas lembranças contigo aqui. Pra sempre nós dois, meu amigo Burt.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais antes de tudo, por serem os dois seres humanos mais guerreiros que já vi em minha vida, proporcionando todo apoio necessário que eu tive em minha jornada, mesmo em todas situações. Sem eles eu não seria capaz de estar onde estou, são os alicerces de minha vida e devo eternamente a gratidão e o amor de um filho, que admira incondicionalmente os dois.

Agradeço minha companheira Ingrid durante esses anos de curso, meu principal ponto de apoio e compreensão durante essa loucura que é a vida acadêmica, você é de uma importância imensurável em minha vida.

Agradeço minha irmã Nicole, que desde meus 3 anos de idade vem sendo minha melhor amiga, e meu maior contato para conselhos, conversas e pensamentos para seguir quem sou, creio que para sempre precisarei desse ponto de confiança seu.

Por fim agradeço todos os profissionais com quem convivi na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, LACEN e Hemonorte, minha bagagem acadêmica e profissional não poderia ser mais proveitosa do que foi, sinto que ao fim dessa jornada inicial, saio maior do que entrei e realizado com um curso que me represente.

## RESUMO

A anemia hemolítica autoimune (AHAI) é caracterizada pela presença de autoanticorpos ou frações de complemento que se ligam à superfície dos eritrócitos, ocasionando sua destruição e consiste em uma condição clínica incomum. Diante disso, essa revisão bibliográfica abordou aspectos gerais e classificação das AHAI e, com mais ênfase, os principais testes úteis para o diagnóstico e como as alterações laboratoriais e a morfologia eritrocitária podem auxiliar na elucidação diagnóstica dessa doença. No período de setembro de 2023 a outubro de 2024 foram selecionados artigos científicos em bases de dados como PubMed e Periódicos CAPES, por meio de palavras chave específicas, como anemia hemolítica autoimune, alterações laboratoriais, fisiopatologia, dentre outras, com o objetivo de compilar informações sobre o tema, possibilitando expor um atual panorama pouco explorado e de grande potencial no auxílio ao diagnóstico dessa enfermidade. As AHAI podem ser de tipo quente, frio ou mista, a depender da classe de anticorpo envolvida, e assim como em outras anemias hemolíticas, apresentam baixo nível de hemoglobina e níveis séricos elevados de lactato desidrogenase, bilirrubina não conjugada e baixos níveis de haptoglobina, além da contagem de reticulócitos indicar reticulocitose frequentemente. O diagnóstico da AHAI tem como principal exame o teste da antiglobulina direta que irá revelar anticorpos ou complemento nos eritrócitos do paciente. A análise da distensão sanguínea pode evidenciar alterações comuns a todos os tipos de AHAI, como policromasia, e em casos mais graves, eritroblastos e esquistócitos podem ser observados. De forma específica, microesferócitos podem ser vistos na AHAI quente enquanto que aglutinação de hemácias está presente na AHAI fria e tornam-se ferramentas úteis na elucidação diagnóstica, principalmente em situações onde o padrão ouro não é capaz de concluir a real condição clínica do paciente. Entre os achados laboratoriais e morfológicos observados ao longo do trabalho, conclui-se que essas podem auxiliar o diagnóstico dessa patologia, e cabe ao profissional biomédico estar atento aos resultados, sendo de extrema importância sua presença no ambiente laboratorial nessas circunstâncias.

Palavras-chave: Anemia hemolítica autoimune; autoanticorpos; diagnóstico.

## **ABSTRACT**

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is characterized by the presence of autoantibodies or complement fractions that bind to the surface of erythrocytes, causing their destruction and is an uncommon clinical condition. Therefore, this literature review addressed general aspects and classification of AHAs and, with more emphasis, the main tests useful for diagnosis and how laboratory changes and erythrocyte morphology can help in the diagnostic elucidation of this disease. From September 2023 to October 2024, scientific articles were selected from databases such as PubMed and CAPES Periodicals, using specific keywords, such as autoimmune hemolytic anemia, laboratory changes, pathophysiology, among others, with the aim of compiling information on the topic, making it possible to expose a current panorama that is little explored and has great potential in helping to diagnose this disease. AIHAs can be hot, cold or mixed, depending on the class of antibody involved, and, as in other hemolytic anemias, they present a low level of hemoglobin and high serum levels of lactate dehydrogenase, unconjugated bilirubin and low levels of haptoglobin, In addition, the reticulocyte count frequently indicates reticulocytosis. The main examination of AIHA diagnosis is the direct antiglobulin test, which will reveal antibodies or complement in the patient's erythrocytes. Blood distension analysis can highlight changes common to all types of AIHA, such as polychromasia, and in more severe cases, erythroblasts and schistocytes can be observed. Specifically, microspherocytes can be seen in hot AIHA while red blood cell agglutination is present in cold AIHA and become useful tools in diagnostic elucidation, especially in situations where the gold standard is not capable of concluding the patient's real clinical condition. Among the laboratory and morphological findings observed throughout the work, it is concluded that these can assist in the diagnosis of this pathology, and it is up to the biomedical professional to be attentive to the results, with their presence in the laboratory environment being extremely important in these circumstances.

**Keywords:** Autoimmune hemolytic anemia; autoantibodies; diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Produção e catabolismo normal de glóbulos vermelhos (A) e estado acelerado (B). Tempo de meia vida de 5 a 10 dias apenas ilustrativo.....	21
<b>Figura 2 –</b>	Aparências de esfregaços sanguíneos em pacientes com AHAI (ambos usando coloração de <i>May Grunwald Giemsa</i> ) .....	24
<b>Figura 3 –</b>	Patogênese da anemia hemolítica autoimune mediada por anticorpos quentes e por anticorpos frios. ....	26
<b>Figura 4 –</b>	Esquema representativo do teste da antiglobulina direta .....	28
<b>Figura 5 –</b>	Reações negativas e positivas no teste direto de antiglobulina utilizando diferentes métodos.....	29
<b>Figura 6 –</b>	Representação esquemática do teste do eluato realizado na AHAI .....	30
<b>Figura 7 –</b>	Distensão sanguínea de pacientes com AHAI .....	32
<b>Figura 8 –</b>	Distensão de sangue periférico em paciente com AHAI quente .....	33
<b>Figura 9 –</b>	Esferócitos duplos vistos em sangue periférico de paciente com AHAI quente.....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Resumo dos achados sorológicos clássicos nas AHAs.....	23
<b>Tabela 2 –</b>	Testes úteis para o diagnóstico das AHAs.....	31

## LISTA DE SIGLAS

AHAI	Anemia hemolítica autoimune
AHG	Globulina anti-humana poliespecífica
ALPS	Síndrome linfoproliferativa autoimune
CAD	Doença da aglutinina fria primária
CAS	Síndrome de aglutinina fria
HAV	Vírus da hepatite A
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Ig	Imunoglobulina
LDH	Lactato Desidrogenase
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LLC	Leucemia linfocítica crônica
MAC	Complexo de ataque à membrana
O <sub>2</sub>	Oxigênio
TAD	Teste da antiglobulina direta
TAI	Teste da antiglobulina indireta
VCM	Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	20
3.1	Tipo de Estudo.....	20
3.2	Obtenção dos Dados.....	20
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
4.1	Classificação e fisiopatologia da anemia hemolítica autoimune.....	23
4.2	Suspeita clínica e principais exames diagnósticos da AHAI.....	26
4.3	Achados morfológicos e demais alterações úteis na distinção entre as formas de AHAI.....	31
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema imune é um importantíssimo mecanismo de defesa para o organismo humano, consistindo num conjunto de órgãos, tecidos, células e moléculas responsáveis pela proteção. Dentre essas moléculas, destacam-se as imunoglobulinas (Ig), principais agentes no que tange a defesa contra organismos estranhos. Entretanto, em condições anormais, essas imunoglobulinas podem atuar contra as células e componentes do próprio indivíduo, denominando-se assim de autoanticorpos (BRODIN, DAVIS, 2017).

Dentre essas condições anormais, destaca-se a quebra da tolerância imunológica. A tolerância imunológica consiste na ausência de reatividade imunológica (linfócitos e anticorpos) específica a um antígeno, sendo sua forma mais importante frente a antígenos próprios. Entretanto, quando há um distúrbio nesse mecanismo, há a indução de uma resposta auto-imune (ALI *et al*, 2023).

Os autoanticorpos são responsáveis por inúmeras doenças, entre elas as denominadas anemias hemolíticas autoimunes (AHAI), condição clínica incomum, caracterizada pela formação de autoanticorpos que se ligam à superfície dos eritrócitos, ocasionando sua destruição (hemólise) via sistema complemento ou sistema reticuloendotelial (BASS, TUSCANO, TUSCANO, 2014). Essa anemia possui nuances quanto a sua origem e aspectos clínicos e laboratoriais, podendo ser classificada em AHAI quente - caracterizada por evidência de hemólise de glóbulos vermelhos e um teste antiglobulina direto positivo para IgG e algumas vezes complemento (KUTER, 2022) ou AHAI fria, condição rara entre as anemias hemolíticas, com produção de autoanticorpos IgM contra os próprios eritrócitos, resultando na ativação do complemento e predominantemente hemólise intravascular (DESPOTOVIC; KIM, 2022).

Este grupo de doenças é relativamente raro, afetando aproximadamente 1–3 indivíduos para cada 100.000 anualmente. A AHAI é limitada principalmente a adultos, embora crianças com doença de imunodeficiência primária ou síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS) sejam comumente afetadas. As crianças muitas vezes desenvolvem uma condição mais autolimitada no curso da doença, sendo frequentemente precedida por doença viral. Os adultos tendem a desenvolver um processo de doença mais grave e implacável que frequentemente requer tratamento e pode, ocasionalmente, ser fatal (BASS; TUSCANO; TUSCANO, 2014).

Apesar de pouco frequentes, quando comparadas a outras anemias vivenciadas na rotina laboratorial, as AHAIs podem estar relacionadas de forma secundária a infecções, particularmente ao *Parvovirus B19*, em até 20% dos casos, infecções por vírus hepatotrópicos, incluindo HCV, HBV e HAV e, mais raramente, HIV. Além disso, a AHAI pode se desenvolver em até 3% dos pacientes com mononucleose infecciosa, dentro de 1–2 semanas após o início. Em relação às bactérias, a síndrome da aglutinina fria pode seguir a infecção por *Mycoplasma pneumoniae*, bem como tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), e geralmente se recupera após tratamento antituberculose (FATTIZZO; BARCELLINI, 2022).

Diante disso, essa revisão pretende abordar aspectos gerais da AHAI, com ênfase nas suas formas principais (AHAI quente, fria e mista) e evidenciar a importância do profissional biomédico na realização dos exames laboratoriais que podem ser úteis no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Elaborar uma revisão da literatura por meio de bases de dados científicas acerca da anemia hemolítica autoimune.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Conceituar e classificar anemia hemolítica autoimune;
2. Apresentar os aspectos da fisiopatologia da AHAI;
3. Principais exames utilizados para o diagnóstico da AHAI.
4. Abranger as principais alterações morfológicas em lâmina e alterações laboratoriais que auxiliem o profissional no diagnóstico da AHAI e distinção entre AHAI quente e fria.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Tipo de estudo**

Esse estudo consistiu numa revisão de literatura acerca das anemias hemolíticas autoimunes, com ênfase nas alterações laboratoriais e morfológicas identificadas nos pacientes, com o objetivo de reunir o máximo de informações sobre o tema, possibilitando, assim, expor um atual panorama pouco explorado e de grande potencial no auxílio ao diagnóstico dessa enfermidade.

#### **3.2. Obtenção dos dados**

Os artigos selecionados foram majoritariamente obtidos nas bases de dados PubMed e Portal de Periódicos da CAPES, por meio do uso de uma combinação de palavras chave, dentre as quais destacaram-se: anemia hemolítica autoimune, alterações laboratoriais, fisiopatologia, classificação, estratégias.

A realização dessa busca e coleta de dados teve início em setembro de 2023, com duração de 1 ano desde então, com a compilação das informações sendo dividida em: introdução, classificação e fisiopatologia da AHAI, diagnósticos e alterações laboratoriais e morfológicas observadas.

Dentre os critérios de inclusão e exclusão, foram compilados artigos dos últimos 15 anos, sendo excluídos projetos mais antigos. A inclusão se baseava no conteúdo abordado, onde artigos com foco e trechos consideráveis abordando a fisiopatologia, classificação ou alterações laboratoriais e morfológicas importantes foram adicionados à base para a montagem dessa revisão. Artigos com foco em faixas etárias específicas, AHAI secundárias a neoplasias ou doenças infecciosas ou formas de tratamento e que não abordaram de forma proveitosa nenhum dos critérios de inclusão, foram excluídos da base de estudos para a escrita deste trabalho.

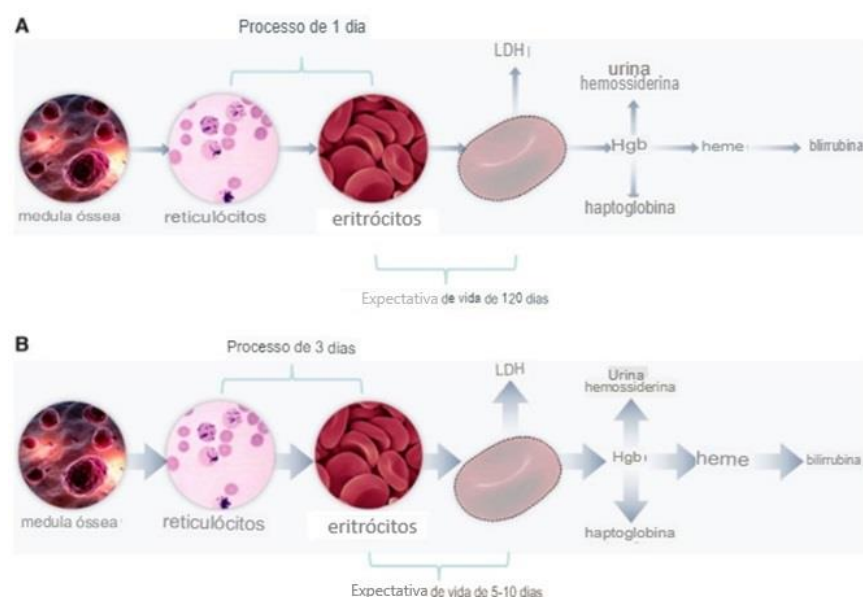
#### 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As hemácias são células caracterizadas por discos anucleados que contém em seu interior a proteína denominada hemoglobina, sendo desenvolvidas num processo denominado eritropoese que ocorre na medula óssea dos indivíduos e realiza sua função de transportar o oxigênio ( $O_2$ ) proveniente dos pulmões aos tecidos periféricos, por aproximadamente 100 a 120 dias até serem retiradas da circulação pelos macrófagos (Figura 1) (JELKMANN, 2012).

Em condições anormais, em que a concentração de hemoglobina ou de eritrócitos estiverem debilitadas, o organismo apresenta um quadro patológico denominado de anemia. Esse quadro pode ser desencadeado por inúmeros motivos, desde uma disfunção medular que implique na diminuição de produção das hemácias, ou até por um excesso de destruição dessas células, que recebe o nome de anemia hemolítica (JELKMANN, 2012).

Antes de confirmar a presença de anemia hemolítica e estabelecer a sua causa, é necessário ter em mente uma sequência de testes que comprovem a hemólise, já que nesse caso, além dos glóbulos vermelhos apresentarem menor tempo de circulação (<100 dias), outros exames laboratoriais poderão apresentar alterações em seus resultados.

**Figura 1:** Produção e catabolismo normal de glóbulos vermelhos (A) e estado acelerado (B).



FONTE: Adaptada de KUTER, 2022.

Entre os exames laboratoriais e correlações úteis para investigação de hemólise, destacam-se o aumento na contagem de reticulócitos, aumento na concentração da enzima lactato desidrogenase (LDH) e presença de hemoglobina, essa por sua vez pode ser detectada na urina e soro, além de ser filtrada pelo fígado e posteriormente catabolizada pelas células do túbulo renal, que retém o ferro e implica em uma urina positiva no teste de hemossiderina. Além disso, nota-se também um aumento na concentração de bilirrubina e redução na concentração de haptoglobina, especialmente nos casos de hemólises intravasculares. Ao avaliar esses exames, percebem-se as alterações que as anemias hemolíticas podem causar no organismo e possíveis interferências em testes laboratoriais (KUTER, 2022).

Confirmada a hemólise, existe uma série de doenças que se enquadram no conjunto das anemias hemolíticas, tanto no âmbito hereditário quanto adquirido e que precisam ser investigadas, com exames mais específicos para um correto diagnóstico. Dentre estas, quando há uma sensibilização do organismo resultando na produção de anticorpos contra os antígenos dos próprios eritrócitos, gerando assim sua destruição, tem-se um tipo de anemia hemolítica denominada de anemia hemolítica autoimune (AHAI). Esta, por sua vez, possui subdivisões com relação ao tipo de anticorpo envolvido na hemólise do paciente (HILL; HILL, 2018).

Os diferentes tipos de AHAI também diferem quanto ao modo com que ocorre a hemólise, podendo esta ser intra ou extravascular. A hemólise intravascular consiste na destruição dos eritrócitos diretamente nos vasos sanguíneos, sendo comum na AHAI fria, onde os anticorpos IgM de superfície formam complexos imunes, ativando a cascata do complemento. Na hemólise extravascular, por sua vez, a destruição ocorre fora dos vasos sanguíneos, no interior de macrófagos, especialmente em órgãos do sistema retículo-endotelial. Esse tipo de hemólise é predominante nas AHAI quentes e mistas, em que os anticorpos IgG se ligam à superfície das hemácias e promovem sua destruição dentro dos macrófagos do fígado e baço, principalmente (BERENTSEN; RANDEN; TJØNNFJORD, 2015).

#### 4.1 Classificação e fisiopatologia da anemia hemolítica autoimune

A AHAI é sorologicamente definida como quente ou fria com base na classe de imunoglobulina, seja IgG ou IgM, causadora de hemólise. Os autoanticorpos quentes são IgG e detectados principalmente *in vitro* a 37°C e no teste da antiglobulina indireta (TAI), enquanto os autoanticorpos frios são IgM e se ligam preferencialmente aos glóbulos vermelhos em temperaturas mais frias em testes clínicos (Tabela 1) (JOHNSON; PUCA, 2022).

**Tabela 1:** Resumo dos achados sorológicos clássicos nas AHAI.

Tipo de AHAI	Classe do anticorpo	Especificidade do anticorpo	Fase de teste ideal da reatividade do anticorpo	Resultado do TAD	Resultado da Eluição
Quente	IgG	Amplamente reativo	TAI	2-4+ IgG e C3, ou apenas IgG	Positivo/Reativo com todos ou maioria dos painéis de hemácias
Fria	IgM	I/i	TA, 37°C <sup>a</sup>	2-3+ Apenas C3	Geralmente não realizado
Mista	IgG e IgM	Amplamente reativo	TA, 37°C, TAI	3-4+ IgG e C3	Positivo/Reativo com todos ou maioria dos painéis de hemácias

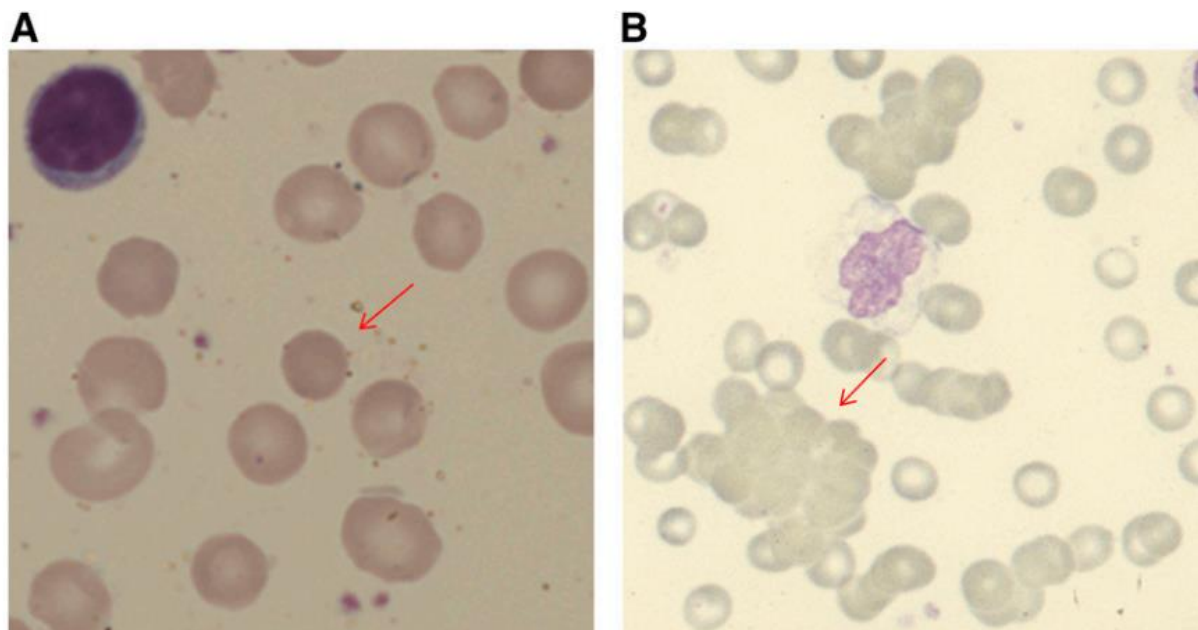
<sup>a</sup>Resultados após 15-30 minutos de incubação a 37°C.

2-4+, força da aglutinação; TAD, Teste da antiglobulina direta; TA, Temperatura ambiente; TAI, teste da antiglobulina indireta

FONTE: Adaptado de JOHNSON; PUCA, 2022.

Todos os 3 tipos de AHAI podem levar a um quadro sintomatológico e de alterações laboratoriais característico, a variar em intensidade de caso para caso, que incluem anemia normo/macrocítica, aumento na contagem de reticulócitos, aumento da bilirrubina não conjugada, redução da haptoglobina e distensão sanguínea com policromasia ou características mais específicas, como esferócitos ou aglutinação (Figura 2). Infelizmente, esses testes não são específicos de uma hemólise proveniente de uma AHAI (HILL; HILL 2018), necessitando de exames laboratoriais mais específicos para confirmação.

**Figura 2:** Distensões sanguíneas em pacientes com AHAI (ambos usando coloração de *May Grunwald Giemsa*).



**FONTE:** HILL, A.; HILL, Q. A., 2018.

**(A) Esferócito em paciente com AHAI quente (ampliação original, x100). (B) Aglutinação de hemácias em paciente com doença de aglutinina fria (x40).**

#### 4.1.1 AHAI quente

Estima-se que 1 em cada 80.000 pessoas sejam afetadas pela AHAI quente, constituindo cerca de 75% de todos os casos de AHAI, sendo o subtipo que mais afeta crianças de 2 a 12 anos. Sua forma idiopática consiste na maior incidência, enquanto que sua forma secundária está associada a várias condições incluindo mononucleose infecciosa, lúpus eritematoso sistêmico (LES), hepatite autoimune, vírus da imunodeficiência humana e outras doenças linfoproliferativas ou autoimunes (BASS; TUSCANO; TUSCANO, 2014).

Mais de 95% dos pacientes com AHAI quente possuem um anticorpo IgG que se liga a antígenos de hemácias independentemente da temperatura (reatividade máxima com eritrócitos a 37 °C). Raramente, os anticorpos podem ser IgA e ainda menos comumente, IgM (KUTER, 2022). Esses anticorpos são policlonais mesmo em distúrbios clonais, como leucemia linfocítica crônica (LLC). Sobre a eficácia da fixação do sistema complemento, IgG1 e IgG3 fixam de forma mais eficiente que os demais. A AHAI quente

exibe uma tolerância imunológica esgotada das hemácias, comumente devido à ligação de anticorpos aos antígenos do grupo Rh, fazendo com que os receptores Fc-gama mediem a remoção de hemácias extravascularmente dentro do baço (BASS; TUSCANO; TUSCANO, 2014).

#### 4.1.2 AHAI fria

A AHAI fria é causada por autoanticorpos IgM, cujas cadeias leves  $\kappa$  se ligam aos antígenos eritrocitários I (ou i) em temperaturas abaixo de 37 °C. Glóbulos vermelhos ligados ao IgM aglutinam e ativam o sistema complemento e o C3b em sua superfície desencadeia a fagocitose através do sistema reticuloendotelial hepático, enquanto que o complemento terminal é ativado na vasculatura, levando à hemólise intravascular (DESPOTOVIC; KIM, 2022).

AIHA fria é comumente primária, mas pode ser secundária a outro transtorno. Em adultos, a doença da aglutinina fria primária (CAD) é uma doença clonal causada por proliferação de células B de baixo grau na ausência de uma malignidade evidente. As células B em proliferação produzem IgM, o que leva à hemólise através da ativação do complemento. CAD é mais comum do que a síndrome de aglutinina fria (CAS), que é definida como anemia hemolítica fria decorrente de outro distúrbio como doença autoimune, infecção ou malignidade (DESPOTOVIC; KIM, 2022; BERENTSEN, 2018).

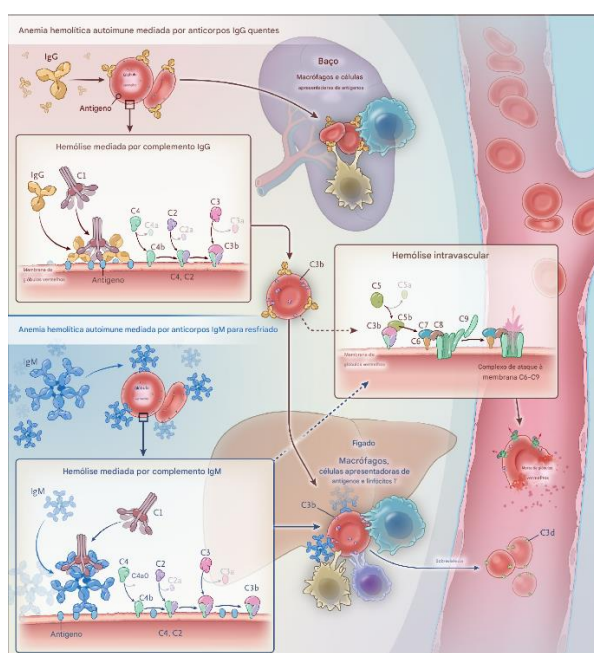
A CAS é menos prevalente que a AHAI fria, compreendendo cerca de 15% de todos os casos de AHAI, ocorrendo principalmente em pessoas de meia-idade ou idosos. A CAS ocorre de maneira dependente de complemento onde a lise proveniente dos autoanticorpos é mediada principalmente por proteínas C3, levando à hemólise intravascular após o desprendimento de anticorpos à 37°C. A fagocitose das hemácias direcionada é mediada principalmente pelas células de Kupffer presentes no fígado, enquanto que o complexo de ataque à membrana (MAC) é um mecanismo alternativo se o título de IgM for relativamente baixo. A presença de estresse pelo frio aumenta a atividade de autoanticorpos, facilitando a lise de hemácias, particularmente nas extremidades. Uma característica notável da CAS é uma alta variabilidade na hemólise, dependendo principalmente da concentração de autoanticorpos ativos, e não da concentração mais abundante de proteína C3 ligada à membrana (BASS; TUSCANO; TUSCANO, 2014).

A AHAI fria é rara em crianças em comparação com adultos. A maioria dos casos se desenvolvem secundários à infecção, sendo o *Mycoplasma pneumoniae* a causa mais comum. Vírus de Epstein Barr, influenza, citomegalovírus e varicela também estão implicados. A situação em que a causa consiste por linfoproliferação clonal de células B de baixo grau não é relatada em crianças (DESPOTOVIC; KIM, 2022).

#### 4.1.3 AHAI mista

A AHAI mista ou AHAI combinada fria e quente é caracterizada pela simultânea presença de um autoanticorpo IgG quente e um anticorpo IgM reativo ao frio com título baixo, mas uma ampla faixa de temperatura na circulação sanguínea, reagindo até 37°C. A síndrome é marcada por hemólise significativa, resultante de lesões intravasculares e hemólise extravascular (Figura 3), podendo ser grave, mas mostra uma resposta favorável à terapia com esteroides. No entanto, a AHAI mista segue frequentemente uma trajetória crônica com períodos intermitentes de deterioração. A condição é responsável por 5–8% de todas as AHAI; destes, 50% dos casos são idiopáticos, enquanto 25-42% dos casos estão associados a doenças sistêmicas, como por exemplo LES (LORIAMINI; CSERTI-GAZDEWICH; BRANCH, 2024).

**Figura 3:** Patogênese da anemia hemolítica autoimune mediada por anticorpos quentes e por anticorpos frios.



**FONTE:** Adaptado de BERENTSEN; BARCELLINI, 2021

## 4.2 Suspeita clínica e principais exames diagnósticos da AHAI

As manifestações clínicas das AHAI variam dependendo do tipo. Os sintomas podem incluir dispneia, fadiga, cefaleia, fraqueza muscular, palidez e/ou icterícia (LORIAMINI; CSERTI-GAZDEWICH; BRANCH, 2024), não havendo assim um sintoma particular para essa condição, requerendo exames específicos que auxiliem o diagnóstico.

O primeiro e mais importante critério para o diagnóstico de AHAI é o reconhecimento de hemólise e anemia. O aparecimento de icterícia e a urina anormalmente escura geralmente são sugestivos de hemólise, mas está presente apenas em aproximadamente 60% dos pacientes. Ao diagnosticar AHAI é importante primeiro descartar outras causas de hemólise como microangiopatia e condições hereditárias, como esferocitose ou deficiência de G6PD ou anemia falciforme (BASS; TUSCANO; TUSCANO, 2014).

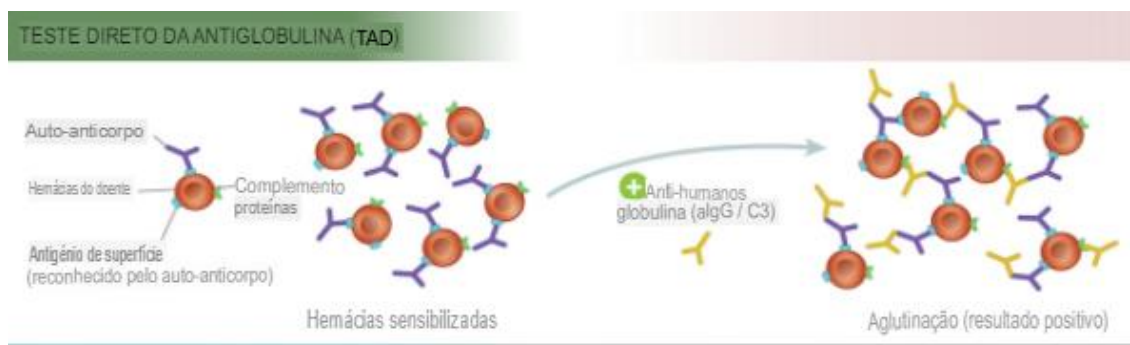
Assim como em outras anemias hemolíticas, a AHAI é diagnosticada com base na baixa concentração de hemoglobina e níveis séricos elevados de LDH, bilirrubina não conjugada e baixos níveis de haptoglobina, além da importante evidência, em se tratando de uma anemia imune, do teste da antiglobulina direta (TAD) positivo. Este revela a presença de anticorpos ou fração de complemento recobrando a superfície eritrocitária (BERENTSEN; BARCELLINI, 2021; BASS; TUSCANO; TUSCANO, 2014).

Além desses, a contagem de reticulócitos, um importante exame laboratorial para investigação diagnóstica de quadros hemolíticos, frequentemente se encontra elevada, revelando uma reticulocitose absoluta, porém, a contagem de reticulócitos pode ser normal ou baixa, provavelmente devido à atividade de autoanticorpos contra os precursores dos eritrócitos ou à coexistência com algum outro distúrbio de medula óssea (BERENTSEN; BARCELLINI, 2021).

### 4.2.1 Teste da antiglobulina direta

O TAD, também conhecido como teste de Coombs direto, é uma ferramenta diagnóstica extremamente importante para AHAI e é inicialmente realizado testando a suspensão de hemácias lavadas do paciente com globulina anti-humana poliespecífica (AHG), que contém anti-IgG e anti-C3d, também conhecido como soro de Coombs (Figura 4) (BINSFELD; DEVEY; GOTHOT, 2024).

**Figura 4:** Esquema representativo do teste da antiglobulina direta



**FONTE:** Adaptada de BINSFELD; DEVEY; GOTHOT, 2024.

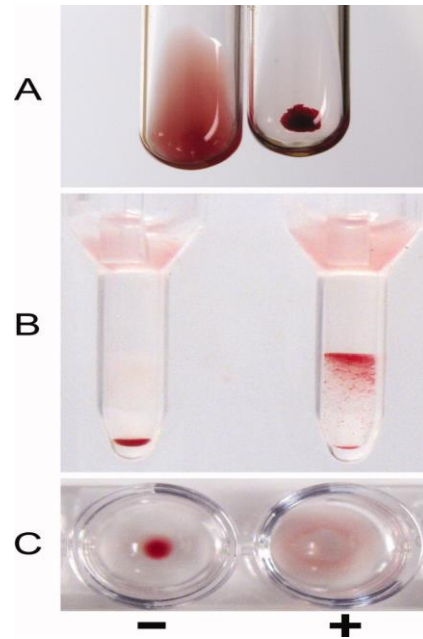
Legenda: O TAD revela a sensibilização *in vivo* dos glóbulos vermelhos do paciente pelos autoanticorpos e/ou proteínas do complemento (C3c/d).

O uso de um tubo de ensaio convencional continua sendo o método principal para o TAD, exigindo observação manual para aglutinação das hemácias do paciente após a adição de AHG, sendo confiável e frequentemente usado como teste de confirmação (para detectar C3d, um método de tubo de ensaio usando anti-C3d é ideal) (Figura 5). Com o papel crescente da automação em laboratórios hospitalares, o TAD pode também ser realizado utilizando aglutinação em testes de coluna (conhecidos como gel ou esferas) ou métodos de fase sólida (JOHNSON; PUCA, 2022).

Quando o TAD é positivo com AHG poliespecífico, testes com reagentes monoespecíficos são necessários para diferenciar se IgG, C3d ou ambos estão revestindo as hemácias do paciente e para ajudar a classificar o tipo de anemia hemolítica (JOHNSON; PUCA, 2022)., conforme evidenciado anteriormente na Tabela 1.

Em pacientes com AHAI quente, é mais comum tanto IgG quanto C3d revestirem as células do paciente. Embora o TAD por si só não seja diagnóstico de anemia hemolítica, reações mais fortes (2-4+) denotam níveis mais elevados de concentração de anticorpos na superfície dos glóbulos vermelhos e estão mais provavelmente associados com hemólise. Por outro lado, um TAD negativo não descarta a AHAI e pode ser observada em 5% a 10% dos pacientes com anemia hemolítica imune (JOHNSON; PUCA, 2022).

**Figura 5:** Reações negativas e positivas no teste direto de antiglobulina utilizando diferentes métodos



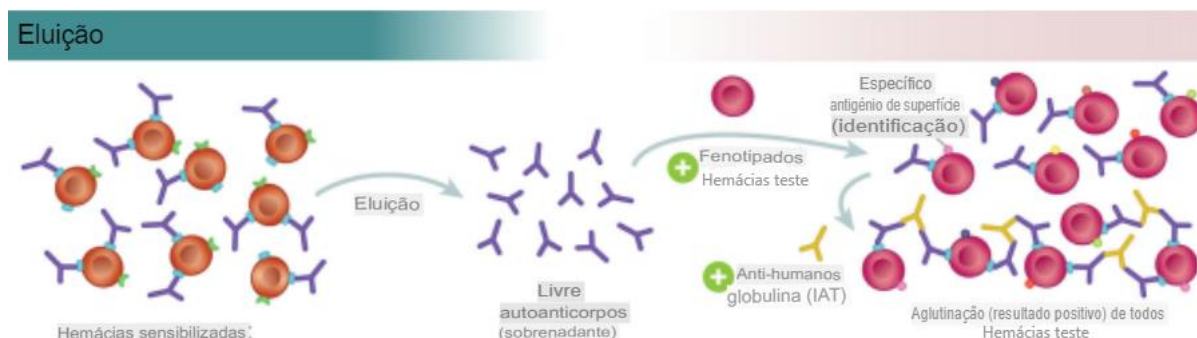
**FONTE:** ZANTEK, N. D. *et al*, 2012.

Legenda: A aglutinação é detectada visualmente como aglomerados de glóbulos vermelhos pelo método convencional de tubo de ensaio (A), pela falha na filtragem através de uma matriz de gel no método de microcoluna de gel (B), ou pela aderência de glóbulos vermelhos na superfície de um poço em métodos de fase sólida (C).

#### 4.2.2 Teste do Eluato

Para identificação dos anticorpos aderidos às hemácias, o teste do eluato é bastante útil e consiste na eluição do anticorpo ligado aos eritrócitos, seguido pela análise da interação do anticorpo presente no eluato contra reagentes contendo eritrócitos fenotipados para grupos sanguíneos conhecidos (Figura 6) (ROSSUM, H. H. van *et al*, 2015).

**Figura 6:** Representação esquemática do teste do eluato realizado na AHAI



**FONTE:** Adaptada de BINSFELD; DEVEY; GOTHOT, 2024.

A eluição dos anticorpos de eritrócitos sensibilizados pode ser realizada utilizando diferentes abordagens, incluindo éter ou ácido, ou por congelamento. Além da identificação da especificidade do anticorpo, as técnicas de eluição também podem ser utilizadas para triagem de eritrócitos sensibilizados. Em geral, as técnicas de eluição são mais sensíveis na detecção de anticorpos anti-eritrócitos em comparação com o TAD, no entanto, estas técnicas muitas vezes só estão disponíveis em laboratórios especializados, requerem maiores volumes de sangue e são trabalhosas (ROSSUM, H. H. van *et al*, 2015).

A falsa positividade do teste de Coombs acrescenta para a lista de dificuldade nos diagnósticos, juntamente com a ocorrência de síndrome dos linfócitos passageiros após transplantes de órgãos sólidos. Diagnóstico de AHAI TAD-negativos e avaliação de fatores de risco relacionados à doença para possível recaída e mortalidade, apesar da melhora na abordagem diagnóstica, ainda são uma necessidade não atendida (BARCELLINI, 2020).

A Tabela 2 destaca um compilado dos principais exames laboratoriais úteis no diagnóstico das AHAI (BERENTSEN; BARCELLINI, 2021).

**Tabela 2:** Testes úteis para o diagnóstico das AHAIs.

Ensaio ou análise	Espécime	Objetivo	Observações
Hemoglobina	Sangue	Detectar anemia	—
LDH, não conjugado bilirrubina, haptoglobina	Soro ou plasma	Detectar hemólise	Níveis elevados de LDH e bilirrubina, haptoglobina baixa ou indetectável níveis, ou ambos indicam hemólise
Reticulócitos absolutos Contagem	Sangue	Verificar o aumento dos eritrócitos volume de negócios	Contagens acima do suporte normal hemólise, mas a contagem pode ser normal ou baixo
Hemoglobina livre	Urina, soro ou plasma	Detectar hemoglobinúria ou livre hemoglobina no sangue	Mostra hemólise intravascular
Poliespecífico (simples) TAD	Sangue	Detectar imunoglobulina, complemento, ou ambos na superfície eritrocitária	Teste positivo suporta autoimune patogênese; teste negativo (TAD -AIHA negativo) em 3-10% dos doentes afectados
Monoespecífico (alargado) TAD	Sangue	Identificar a classe das imunoglobulinas ou tipo de complemento proteína no eritrócito superfície	Necessário para a classificação e para diagnóstico de mediações puramente IGA AIHA; teste positivo para C3d indica envolvimento da IgM
Título de aglutinina a frio	Soro ou plasma	Avaliação semiquantitativa de aglutininas frias	O espécime deve ser mantido a 37-38 da amostragem até à separação do soro ou plasma de coágulo ou células
Ensaio de Donath-Landsteiner	Sangue	Detectar autoanticorpos bifásicos no frio paroxístico hemoglobinúria	Indicado principalmente para hemolítico agudo anemia em crianças
Classe das imunoglobulinas quantificação	Soro ou plasma	Ocorrem níveis anormais em variável comum imunodeficiência e, muitas vezes, em monoclonal gamopatias	Se houver aglutinina fria, amostra deve ser mantido em 37-38 amostragem até à separação de soro ou plasma de coágulo ou células

FONTE: Adaptado de BERENTSEN; BARCELLINI, 2021

Em situações mais específicas, testes como a eletroforese de proteínas séricas, imunofixação, biopsia de medula óssea e citometria de fluxo também se enquadram entre os testes possivelmente utilizados (BERENTSEN; BARCELLINI, 2021).

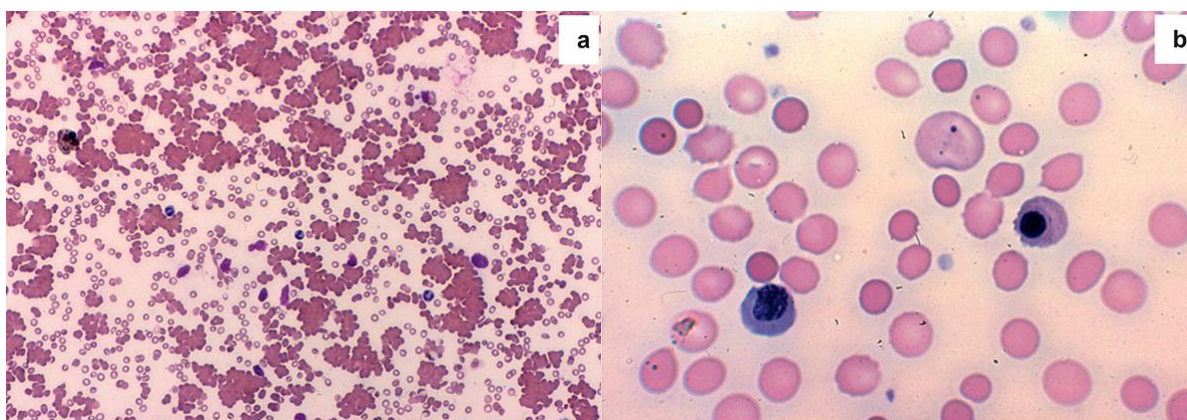
#### 4.3 Achados morfológicos e demais alterações úteis na distinção entre as formas de AHAI.

A distensão sanguínea dos pacientes pode apresentar características comuns a todos os tipos de AHAI, como por exemplo a policromasia, refletindo um aumento da produção e saída de reticulócitos da medula óssea, além da presença de esferócitos que também podem ser vistos, sendo esse um achado que pode sugerir a presença de um

processo hemolítico imune ou de esferocitose hereditária, a depender da sua quantidade vista em lâmina (situações de esferocitose hereditária possuem uma quantidade consideravelmente maior de esferócitos vistos em lâmina), necessitando assim de um diagnóstico diferencial. Em casos mais graves, eritroblastos, esquistócitos e eritrofagocitose por monócitos incluem o conjunto de alterações morfológicas possivelmente observadas (PACKMAN, 2015).

Além das alterações eritrocitárias acima mencionadas, discreta leucocitose e neutrofilia são típicas, além de auto aglutinação de hemácias que podem ser vistas na distensão sanguínea e no sangue anticoagulado resfriado de pacientes com AHAI de anticorpos frios (Figura 7) (PACKMAN, 2015).

**Figura 7:** Distensão sanguínea de pacientes com AHAI. (A) Doença por aglutinina fria de baixa potência, lâmina confeccionada em temperatura ambiente. Observe a aglutinação de hemácias. (B) AHAI quente. Observe frequentemente eritrócitos pequenos e redondos sem palidez central (esferócitos), eritrócitos grandes e azulados (policromasia), corpo de Howell-Jolly e eritrócitos nucleados (eritroblastos).



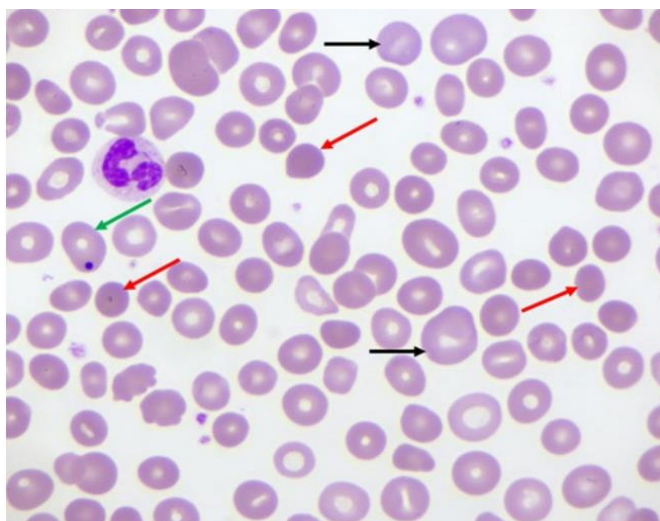
**FONTE:** PACKMAN, 2015.

#### 4.3.1 AHAI quente

Como visto em resumo, até então, a AHAI quente é caracterizada pelo seguinte conjunto de alterações laboratoriais: evidências de hemólise e um anticorpo IgG que se liga a antígenos proteicos na superfície das hemácias em temperatura corporal (anticorpo quente), demonstrada por um teste de Coombs positivo para IgG em 95% dos casos. Entretanto existe um importante achado morfológico que impacta nos achados laboratoriais, sendo esse a presença de microesferócitos (KUTER, 2022).

Uma vez ligado a um anticorpo, o eritrócito pode sofrer múltiplos destinos. A maioria estará ligada aos macrófagos esplênicos, resultando na fagocitose de todo o eritrócito ou, mais provavelmente, remoção de uma porção significativa dos esferócitos presentes (também chamados de microesferócitos) (Figura 8). Ao contrário dos eritrócitos normais, os esferócitos não são deformáveis e, ao entrarem no baço, sofrem destruição. Isto pode explicar parte do aumento de LDH e diminuição de haptoglobina observada na hemólise extravascular (KUTER, 2022).

**Figura 8:** Distensão de sangue periférico em paciente com AHAI quente. Aumento do número de esferócitos (setas vermelhas) e eritrócitos policromatófilos (setas pretas), bem como um eritrócito com corpo Howell-Jolly (seta verde) é indicado.



**FONTE:** KUTER, 2022.

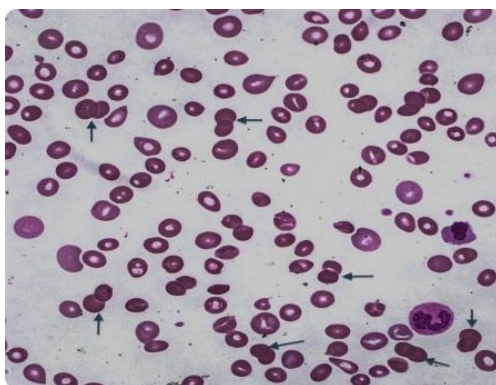
Ocasionalmente, pacientes com AHAI quente apresentam anemia hemolítica esferocítica, mas um TAD negativo. Existem 3 principais causas do TAD negativo: sensibilização por IgG ou complemento abaixo do limiar de detecção de reagentes antiglobulinas; IgG de baixa afinidade causando perda de anticorpo ligado à célula durante a etapa de lavagem antes da reação direta de antiglobulina; sensibilização com anticorpos IgA ou IgM que muitos reagentes TAD comerciais não podem detectar porque contêm apenas anti-IgG e anti-C3. Apenas métodos mais sensíveis para quantificar IgG ligada a hemácias permitem a identificação de pacientes com a chamada AHAI 'Coombs negativa' (PACKMAN, 2015).

Alguns pacientes com AHAI quente apresentam anemia leve e aumento do volume corpuscular médio (VCM) e são encaminhados à hematologia para avaliação de

possível síndrome mielodisplásica. O aumento do VCM está relacionado ao aumento no número de reticulócitos (que geralmente são maiores do que os eritrócitos maduros) e não é devido a um distúrbio primário da medula óssea (KUTER, 2022).

Esferócitos duplos foram raramente relatados na anemia hemolítica autoimune. A causa para a formação de *duplets* não é clara, mas pode-se postular que está relacionado a uma mudança nas propriedades reológicas do glóbulo vermelho após a ligação do anticorpo e/ ou uma alteração na concentração de proteínas plasmáticas (por exemplo, aumento do fibrinogênio). Em distensões sanguíneas normais, esferócitos duplos compreendem <1% dos eritrócitos, e em situações ocasionais, os esferócitos duplos podem ser a característica proeminente na AHAI quente (Figura 9) (RADHAKRISHNAN; DOWNIE, 2024; MANTRIPRAGADA; QUESENBERRY, 2014).

**Figura 9:** Esferócitos duplos vistos em sangue periférico de paciente com AHAI quente



**FONTE:** MANTRIPRAGADA; QUESENBERRY, 2014

#### 4.3.2 AHAI fria

Pacientes com CAD e CAS geralmente apresentam anemia hemolítica crônica e leve, produzindo palidez e fadiga. A doença de base é frequentemente estável, sendo qualquer progressão insidiosa, no entanto, um ambiente frio pode agravar a condição. Como o sangue é mais suscetível aos efeitos da temperatura ambiente nas extremidades, os pacientes também apresentam acrocianose durante as exacerbações. Alguns pacientes apresentam o fenômeno de Raynaud e raramente a aglutinação de hemácias torna-se significativa o suficiente para produzir oclusões vasculares com necrose resultante. Essas complicações adicionais podem ser potencializadas pela crioglobulinemia concomitante (BERENTSEN, 2018).

Na CAD, a distensão de sangue periférico deve sempre ser examinada embora a especificidade seja limitada. Aglutinação de eritrócitos é o achado mais típico (visto anteriormente nas Figuras 2 e 7), frequentemente combinado com características que sugerem hematopoiese compensatória, como anisocitose e policromasia, além de regularmente apresentar um VCM falsamente elevado e falsa redução na contagem de eritrócitos, tornando os valores estimados de hematócrito não confiáveis. Raramente, pode ocorrer aglutinação de granulócitos e monócitos, provavelmente também devido à presença do antígeno I na superfície dos leucócitos, podendo levar a resultados não genuínos na contagem global e/ou diferencial. Ademais, exames para detectar desordens linfoproliferativas clonais não são necessários para diagnóstico, pois isso pode ser uma questão de sensibilidade, mas deve ser feito porque os resultados podem ser confirmatórios e ter implicações terapêuticas (BERENTSEN, 2018).

O histórico do paciente e o exame físico requerem atenção aos sinais de malignidade ou etiologia infecciosa, incluindo avaliação para linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A evidência de acrocianose é importante tanto para o diagnóstico quanto para orientar as escolhas de tratamento e os pacientes podem relatar sintomas piores em períodos mais frios ou exacerbações durante doenças. Testes laboratoriais como LDH, haptoglobina, bilirrubina, uroanálise, assim como exames para identificação de possível infecção, como por exemplo Mycoplasma, HIV, HBV, HCV também são recomendados para o auxílio no diagnóstico da AHAI fria (DESPOTOVIC; KIM, 2022).

#### **4.3.3 AHAI mista**

A AHAI mista mediada por anticorpos quentes e mediada por anticorpos frios é definida pela presença de autoanticorpos IgG quentes combinados com aglutininas frias de alto título. A forma mista de AHAI é frequentemente caracterizada por níveis mais baixos de hemoglobina e um pior prognóstico do que a AHAI quente, e duas ou mais linhas de terapia são frequentemente necessárias (BERENTSEN; BARCELLINI, 2021).

Os sintomas são frequentemente consistentes tanto com a AHAI quente como com a AHAI fria, possuindo autoanticorpos reagentes de maneira ideal tanto a 37 °C quanto em faixa de 0–10 °C. Comumente, a aglutinação de hemácias na distensão sanguínea é encontrada junto com um TAD positivo para IgG e C3d (BASS, TUSCANO, TUSCANO, 2014).

Alterações significativas dos valores laboratoriais podem ser observadas, e geralmente são atribuídas à hemólise grave causada por múltiplos autoanticorpos revestindo os glóbulos vermelhos e os autoanticorpos livres de alto título reagindo em ampla amplitude térmica. Dentre essas alterações, nota-se uma queda nos níveis de hemoglobina e hematócrito e aumento na contagem de reticulócitos, níveis séricos bilirrubina e LDH, além de queda nos valores de haptoglobina. Esse conjunto de alterações em ambos os 3 tipos de AHAI demonstra uma correlação característica com a hemólise autoimune *in vivo* (DAS; CHAKRABARTY; ZAMAN, 2018).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A AHAI consiste em uma doença com diferentes causas, nuances no diagnóstico e que requer o cuidado e atenção dos profissionais de laboratório e médicos para o seu correto esclarecimento. Possui 3 formas de autoanticorpo distintas principais (quente, fria e mista) e cada uma delas apresenta características laboratoriais, morfológicas e sorológicas próprias.

O diagnóstico diferencial e confirmatório segue sendo por meio dos testes citados acima no trabalho, como o teste do eluato ou o teste da antiglobulina direta. Entretanto, nota-se uma grande importância nos dados obtidos acerca das alterações laboratoriais e morfológicas, que são de grande auxílio na clínica para elucidação de um diagnóstico, principalmente em situações de TAD negativo (5% a 10% da população acometida de AHAI).

Conclui-se, então, que embora as alterações laboratoriais e morfológicas vistas em lâmina não sejam suficientes para descartar o padrão ouro de diagnóstico das AHAI, ainda assim possuem um papel de extrema importância na identificação dessa doença, auxiliando no diagnóstico e garantindo informações adicionais ao quadro do paciente. Sendo assim, é importante que os profissionais de saúde envolvidos na realização dos exames e diagnóstico estejam atualizados acerca da interpretação dos resultados para que não sejam negligenciadas informações que podem ser obtidas por meio da análise minuciosa e criteriosa da distensão sanguínea e demais exames realizados.

Cabe então ao profissional biomédico, a importância e capacidade de estar em ambiente laboratorial, como responsável pela análise clínica dessas alterações e adotá-las como possíveis ferramentas para o diagnóstico das AHAI, adotando papel de extrema importância durante a rotina como responsável pela interpretação desses resultados.

## REFERÊNCIAS

- ALI, F.H.M. *et al.* **Role of genetics in eleven of the most common autoimmune diseases in the post genome-wide association studies era.** Eur Rev Med Pharmacol Sci, Vol. 27 - N. 18; 2023
- BARCELLINI, W.; FATTIZZO, B. **The changing landscape of autoimmune hemolytic anemia.** Frontiers in Immunology, Vol 11; 2020
- BASS, G. F.; TUSCANO, E. T.; TUSCANO, J. M. **Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia.** Autoimmunity Reviews, Vol. 13, 2014.
- BERENTSEN, S.; BARCELLINI, W. **Autoimmune Hemolytic Anemias.** New England Journal of Medicine, 2021.
- BERENTSEN, S.; RANDEN, U.; TJØNNFJORD, G. E. **Cold Agglutinin-Mediated Autoimmune Hemolytic Anemia.** Hematology/Oncology Clinics of North America, Vol. 29, 2015.
- BERENTSEN, Sigbjørn. **How I manage patients with cold agglutinin disease.** Br J Haematol, 2018.
- BINSFELD, M.; DEVEY, A.; GOTHOT, A. **Transfusion support and pre-transfusion testing in autoimmune haemolytic anaemia.** Vox Sang, 2024.
- BRODIN, P.; DAVIS, M. **Human immune system variation.** Nat Rev Immunol 17, 2017.
- DAS, S. S.; CHAKRABARTY, R.; ZAMAN, R. U. **Immuno-hematological and clinical characterizations of mixed autoimmune hemolytic anemia.** Asian J Transfus Sci, 2018.
- DESPOTOVIC, J. M.; KIM, T. O. **Cold AIHA and the best treatment strategies.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2022.
- FATTIZZO, B.; BARCELLINI, W. **Autoimmune hemolytic anemia: causes and consequences.** Expert Review of Clinical Immunology, 18(7), 2022.
- HILL, A.; HILL, Q. A. **Autoimmune hemolytic anemia.** Am Soc Hematol Educ Program, 2018.
- JELKMANN, Wolfgang. **Functional Significance of Erythrocytes.** Book Section of Erythrocytes: Physiology and Pathophysiology, 2012.
- JOHNSON, S. T.; PUCA, K. E. **Evaluating patients with autoimmune hemolytic anemia in the transfusion service and immuno-hematology reference laboratory: pretransfusion testing challenges and best transfusion - management strategies.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2022.

KUTTER, David J. **Warm autoimmune hemolytic anemia and the best treatment strategies.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2022.

LORIAMINI, M.; CSERTI-GAZDEWICH, C.; BRANCH, D. R. **Autoimmune Hemolytic Anemias: Classifications, Pathophysiology, Diagnoses and Management.** International Journal of Molecular Sciences 25, N° 8: 4296; 2024

MANTRIPRAGADA, K.; QUESENBERRY, P. J. **Doublet spherocytes,** Blood, 2014.

PACKMAN, Charles H. **The Clinical Pictures of Autoimmune Hemolytic Anemia.** Transfus Med Hemother, 42 (5); 2015.

RADHAKRISHNAN, K.; DOWNIE, P. A.; **Doublet spherocytes.** Blood, 143 (24); 2024.

ROSSUM, H. H. van *et al.* **Comparison of the direct antiglobulin test and the eluate technique for diagnosing haemolytic disease of the newborn.** Practical Laboratory Medicine, Volume 3; 2015.

ZANTEK, N.D. *et al.* **The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis.** Am. J. Hematol, 87; 2012.