

HEMOCE - 04

H-4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

OBSERVAÇÕES "IN VITRO" NO SANGUE
ESTOCADO COM HEMOGLOBINA AS



Trabalho apresentado como requisito
final ao Curso de Hematologia e He-
moterapia, convênio MEC/BID III/UFCE.

FORTALEZA - CEARÁ

1986

JANDIRA FREITAS DE MORAIS

OBSERVAÇÕES "IN VITRO" DO SANGUE
ESTOCADO COM HEMOGLOBINA AS



Trabalho apresentado como requisito
final ao Curso de Hematologia e He-
moterapia, convênio MEC/BID III/UFC.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza - Ceará
1986

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Murilo Martins, pelo incentivo, apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Hêlio Frota Vieira, Maria Laise Chaves Vieira e Maria da Silva Pitombeira, pelas sugestões e colaboração científica.

Ao Prof. Roberto Cláudio da Frota Bezerra, pela valiosa ajuda na análise estatística.

A todos os professores do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia, pelos ensinamentos proporcionados durante este Curso.

Aos Drs. Ormando Rodrigues Campos e Telma Cavalcante Campos, pela amizade e colaboração.

À Srt.^a Norma Cavalcante Linhares, pela preciosa ajuda na pesquisa bibliográfica.

A todos funcionários do HEMOCE e colegas que de diversas maneiras nos ajudaram.

O MEU RECONHECIMENTO

Ao Dr. Luiz Carlos Fontenele, Diretor do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará.

OBSERVAÇÕES "IN VITRO" NO SANGUE ESTOCADO COM HEMOGLOBINA AS

Jandira Freitas de Moraes(*)

RESUMO

Foram estudados morfologicamente hemácias estocadas a 4°C de doadores com traço S, provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará. Observou-se um índice elevado de falcização das hemácias a partir de 24 horas após sua estocagem. Este índice teve um aumento progressivo até o 25º dia, evidenciando uma média 14,6% de eritrócitos falcizados. Houve uma variação de bolsa para bolsa e o maior índice falcêmico encontrado foi 36% no 20º dia. Outras alterações morfológicas foram observadas em relação ao grupo controle no decorrer do armazenamento.

Julgamos necessário recomendar a não utilização de concentrados de hemácias com hemoglobina AS e estimular os bancos de sangue a desenvolver testes laboratoriais para excluir os possíveis portadores do traço falcêmico.

(*) Farmacêutica Bioquímica do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará e aluna do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

Í N D I C E

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
3. RESULTADOS	11
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	15
5. CONCLUSÃO	18
6. SUMMARY	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1 - INTRODUÇÃO

A hemoglobina S é devido a mutação genética na síntese de cadeias beta. Pode estar presente sob as formas homozigota (HbSS) responsável por uma anemia hemolítica grave, a anemia falciforme e heterozigota (HbAS), geralmente não apresentando complicações clínicas evidentes (23)

A forma heterozigota da hemoglobina S também conhecida por traço ou estigma falcêmico, é comum em diversas populações. Em algumas áreas da África pode atingir cifras de 40% (1). Em outras regiões sua incidência é relativamente alta, porém inferior aquelas encontradas no continente africano como por exemplo nas populações negróides dos Estados Unidos e do Brasil onde os valores variam de 7-13% e 6-10% respectivamente (6-10-22-23-8-11-24-36). Contudo a incidência de hemoglobina AS não é restrita à população negróide, mas são encontradas também em alta frequência em pessoas não negróides da Índia, Caribe e Mediterrâneo (4).

O portador do traço falcêmico contém de 22 a 45% de hemoglobina S, embora assintomático na presença de fatores indutores da falcização como hipóxia, acidose, desidratação e fenômenos microtrombóticos os heterozigotos podem apresentar complicações sérias por vezes fatais (12-18-21-35).

Diversos autores recomendam a identificação de portadores do traço falcêmico em doadores de sangue, sugerindo que a presença de hemoglobina AS seja uma condição para a desclassificação do indivíduo como doador (7-19-26-30-31).

Embora tenha sido demonstrado há mais de 30 anos, que as hemácias de indivíduos com traço S tem sobrevivência normal quando transfundidas em receptores normais (9-34), o mesmo não acontece quando são transfundidas em pacientes sob condições de hipóxia, pois as hemácias falciformes são retiradas precocemente da circulação pelo baço (20). Esses riscos aumentam quando o sangue siclêmico é utilizado para exsanguíneo-transfusão. Veiga e Vaithianathan (37) relatam a morte de um recém-nascido após ter recebido uma exsanguíneo-transfusão de sangue contendo hemoglobina AS.

Considerando a elevada incidência de hemoglobina S na população brasileira, o reconhecimento dessa hemoglobina

torna-se necessário na prática hemoterápica. O presente trabalho tem como objetivo observar a morfologia das hemácias estocadas a 4°C provenientes de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), que foram identificados como heterozigoto para hemoglobina S.



2 - MATERIAL E MÉTODOS

No período de outubro a dezembro de 1985, identificamos 30 doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) como portadores de traço falcêmico. Para nosso estudo utilizamos somente 20 unidades de concentrado de hemácias com hemoglobina AS, sendo os demais desprezados por motivos técnicos.

A colheita do sangue foi feita conforme as normas do HEMOCE. Após o indivíduo ter sido considerado apto para doar foram coletados 450 ml de sangue em bolsas plásticas HEMOBAG com CPD e 5 ml em um frasco com EDTA 1%, a fim de pesquisar hemoglobina S. A bolsa foi centrifugada e o sangue fracionado, sendo 250 ml de concentrado de hemácias estocado a 4°C.

Para o estudo da hemoglobina S, inicialmente fizemos o teste de solubilidade de Itano (16). No caso do teste positivo, preparamos uma solução de hemoglobina a 10g% (13) onde submetemos em eletroforeses de acetato de celulose pH 9,5 (29) e gel de agar pH 6,1 (2).

Confirmada a presença de hemoglobina AS por meio de padrões eletroforeticamente conhecidos, a bolsa foi removida para o laboratório de hemoglobina permanecendo estocada a 4°C em posição horizontal.

Após 24 horas do sangue coletado, introduzimos no interior da bolsa uma agulha tipo macrohematócrito conectada a uma seringa contendo 1 ml de formalina 10% e com o máximo rigor de assepsia, retiramos aproximadamente 1 ml de concentrado de hemácias. Homogeneizamos a mistura e a deixamos em repouso por 10 minutos (25). Em seguida fizemos o esfregão e coramos pelo May Grunwald Giemsa. Repetimos o mesmo procedimento no 5º, 10º, 15º, 20º, 25º e 30º dias após o sangue estocado. Durante todo esse tempo as bolsas não sofreram qualquer tipo de agitação e só retiramos da geladeira o tempo mínimo necessário para colher o material.

Analizamos as lâminas em microscópio óptico e o número de eritrócitos falcizados, foi dado após a contagem de 500 hemácias. Realizamos uma contagem extra e classificamos os demais eritrócitos morfológicamente em discóides, disco crenado, esferócitos crenados e esferócitos lisos (27).

Paralelamente fizemos um controle com 5 bolsas de doadores portadores de hemoglobina A, a fim de compararmos morfologicamente com as hemácias dos doadores falcêmicos.

Para efeitos de análises estatísticas consideramos os diferentes dias como tratamento, sendo que o 1º dia funcionou como controle e as bolsas como bloco. Foi procedida a análise de variância e aplicado o teste de Dunnett (17) para verificação e diferença estatística dos diversos tratamentos em relação ao controle. Todas as análises estatísticas foram realizadas a um nível de significância α igual a 0,05.

3 - RESULTADOS

Analizamos morfologicamente as hemácias de 25 bolsas estocadas a 4°C, onde 20 eram de doadores com traço S e 5 doadores portadores de hemoglobina A.

As observações "in vitro" dos números de hemácias falciformes em uma contagem de 500 hemácias estão sumarizados na Tabela I.

A Tabela II mostra que em todas as bolsas o número de hemácias falcizadas foram diferentes durante o período de estocagem. Para verificar a partir de que período há uma mudança na falciformação das hemácias com relação a situação inicial, aplicamos o teste de Dunnett.

Na Figura 1 estão presentes as médias do número de células falciformes apresentando uma diferença significativa ao nível α 0,05 a partir do 15º até 25º dia.

Nos concentrados de hemácias contendo hemoglobina AS, além da presença de hemácias discoides e falciformes, encontramos hemácias crenadas, ovais, esferócitos crenados e esferócitos lisos. A Tabela III sumariza o comportamento dessas hemácias ao longo do período de estocagem.

Quanto às mudanças morfológicas dos eritrócitos contidos nas bolsas controle, a transformação processou-se de forma gradativa de discoide para esferócitos durante todo o período de estocagem, com uma total ausência de hemácias falciformes.

TABELA I - Número de hemácias falciformes em concentrados de hemácias provenientes de doadores com hemoglobina AS durante o período de armazenamento à 4°C.

Nº DE BOLSAS COM HbAS		NÚMEROS DE HEMÁCIAS FALCIZADAS						
		01	05	10	15	20	25	30
DIAS DE ESTOCAGEM								
524.857		34	35	40	35	35	34	25
841.715		30	27	30	25	21	24	27
846.765		33	36	35	70	41	48	39
845.392		56	55	62	58	60	64	58
842.619		18	23	37	34	21	25	27
845.911		26	22	22	24	140	135	140
524.267		60	65	78	100	130	135	100
841.710		30	35	40	38	40	45	30
990.761		34	36	35	60	45	40	30
523.805		60	85	80	75	80	80	35
844.236		62	68	73	70	70	130	100
845.386		140	160	160	175	180	170	100
847.037		40	40	45	48	90	150	100
846.575		40	55	60	180	130	140	100
846.554		15	22	50	55	60	60	40
635.223		5	3	3	3	5	2	4
525.699		40	48	65	60	65	65	65
847.084		37	50	44	51	25	28	24
846.609		29	60	44	25	25	28	50
$\bar{X}$		40,95	48,2	52,65	61,55	65,50	73,15	57,2
% FALCIZAÇÃO		8,19	9,64	10,53	12,31	13,1	14,63	11,44

OBS.: Número total de hemácias contadas em cada amostra: 500.

TABELA II - Quadro de análise de variância dos dados de hemácias falciformes da Tabela I.

FV	GL	SQ	QM	F
Período de Estocagem	6	14.155,5	2.259,25	4,69*
Bolsas	19	150.980,5	7.946,34	15,65*
Erro Residual	114	58.895,9	507,86	-
T O T A L	139	-	-	-

* Significativo ao nível $\alpha = 0,05$.

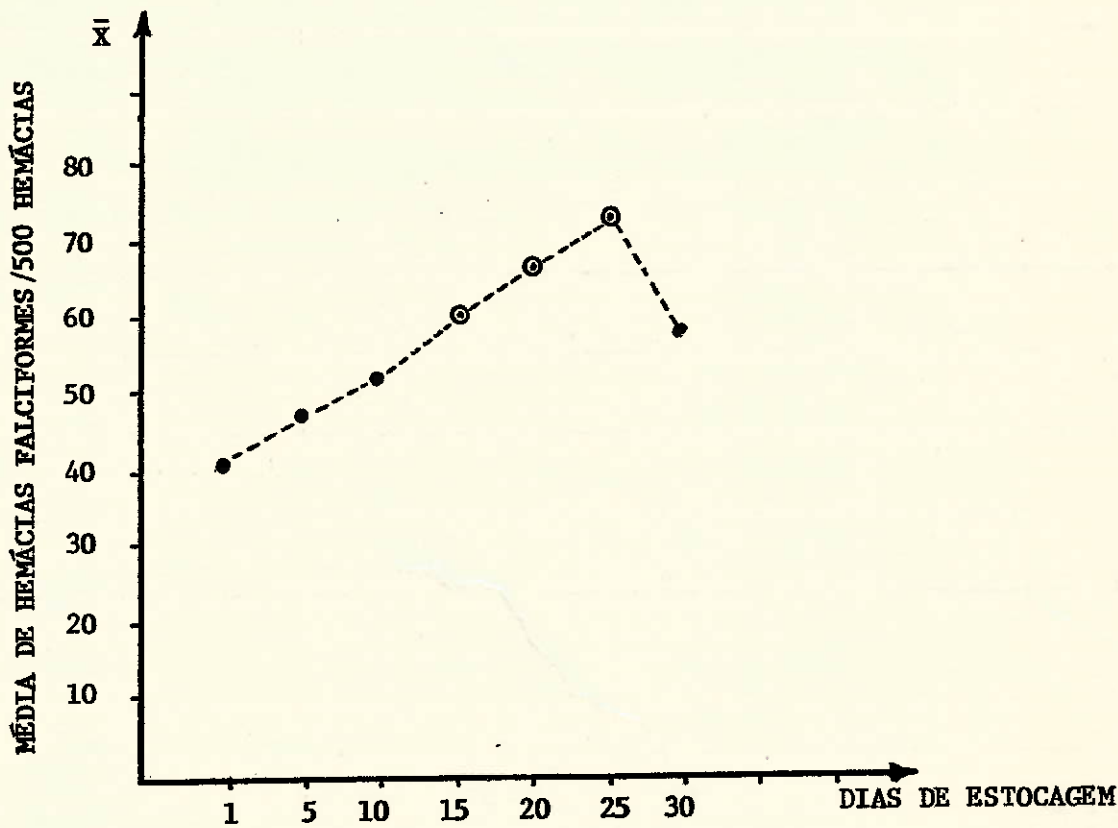


FIGURA 1 - Média das hemácias falcizadas em função do armazenamento das bolsas a 4°C.

- Média estatisticamente igual à situação inicial.
- Média estatisticamente diferente da situação inicial.

TABELA III - Morfologia das hemácias estocadas a 4°C em Citrato-Fosfato-Dextrose no 1º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º e 30º dias após o sangue coletado (%)

DIAS DE ESTOCAGEM		01						05						10						15						20						25						30					
		OV	D	E	C	L	OV	D	E	C	L	OV	D	E	C	L	OV	D	E	C	L	OV	D	E	C	L	OV	D	E	C	L	OV	D	E	C	L							
FORMAS	Nº DA BOLSA	2					2,0	2,9				2,5				2,1	2,8	3,0				2,1																					
524.857		2					2,0	2,9				2,5				2,1	2,8	3,0				2,1																					
841.715		2,1		1,5			2,2	2,0					3,5	10	15	3,0	6,0	9,0			12	3,1	7,5																				
846.765		3					2,5		3,0			2,9			8,0	4,0					3,5																						
845.392		2,4					2,5					2,5				2,9																											
842.619		2,1					2,4	4,5	5,0	8,0	13	2,4					9,5			17																							
845.911		2,5					2,4			8,9	15	2,5				3,0				15																							
524.267		2,3		2,2			2,3			9,0	14	3,0				2,5				12		3,0																					
841.710									3,5	10	15	2,2				2,7				18																							
990.761		2,4					2,5	3,5		6,0	10					6,0				17,5																							
523.805		2,9					2,3	4,1			11	2,3				2,9				12,5		2,5																					
844.189							2,6				12	2,5				2,6				17,1		2,1																					
844.236		1,5					2,3	5,0				2,1								16,5		2,3																					
845.386		1,7					2,4					2,3				2,5				16,7																							
847.037		2,1					2,5													14,5																							
846.575		2,4		2,0			2,3	5,5				2,4				4,0				14		2,0																					
846.554		2,5					2,2	4,5				2,2								31																							
635.223		2,3		2,5			2,1	4,0												30																							
525.699		2,1					2,0	2,9				2,0				3,5				30																							
847.084		2,2					2,1	2,5				2,3								35																							
846.609		2,1					2,3		3,0		7,0	2,4				2,4				30																							
̄x		2,03	-	0,3	0,32		2,18	0,72	2,07	3,93		1,92	0,47	2,90	7,56	2,20	0,44	3,72	10,29	1,33	0,95	3,87	15,84	1,24	0,59	3,83	18,24	0,72	-	3,97	33,55												

OV ≡ Ovolócitos. DC ≡ Disco Grenado. EC ≡ Esferócito Grenado. EL ≡ Esferócito Liso.

OV ≡ Ovolócitos. DC ≡ Disco Crenado. EC ≡ Esferócito Crenado. EL ≡ Esferócito Liso.

4 - DISCUSSÃO

Analísando nossos resultados podemos observar que o número de hemácias falcizadas encontradas nas bolsas após 24 horas de estocagem a 4°C variou de 5 células (1%) até 140 (28%). Esses dados nos mostram que o número de células falcizadas é bastante variável, fato esse já discutido (28), porém de difícil explicação.

Outro aspecto que nos parece bastante interessante é que das 20 bolsas estudadas 4 delas diminuíram o número de células falcizadas enquanto que apenas uma manteve esse número constante, 8 bolsas mostraram aumento de hemácias falcizadas, sendo que uma delas apresentou 36% no 20º dia de estocagem. Nas outras 7 bolsas o aumento de células falcizadas foi o mais significativo, durante todo o período estudado.

A média de hemácias falcizadas no decorrer do estudo mostrou valores crescentes, variando de 40,95 (8,19%) a 73,15 (14,63%). Esses dados considerados como estatisticamente significativos, por testes de análise de variância, sugere-nos uma análise mais crítica que nos permita propor um mecanismo explicando o fato.

Desse modo, podemos observar que as bolsas foram estocadas em posição horizontal e critérios rigorosos para impedir a homogeneização do material foram tomados. As possíveis trocas gasosas entre os eritrócitos contidos na bolsa são pequenas, porém existentes (15) favorecendo, nesse caso as células localizadas em locais periféricos, e dada a não homogeneização, as células contidas no centro da bolsa são as que menos têm contato com o oxigênio exterior.

Por outro lado, o consumo de oxigênio nesse material é considerado como desprezível e a falcização das células obtidas no interior da bolsa nos permita afirmar a existência da desoxigenação das hemoglobinas o que possibilita sua precipitação e conseqüentemente o fenômeno de falcização, caso seja a célula constituída de hemoglobina S.

Outra consideração que podemos fazer, se refere a temperatura de estocagem do material, pois a baixa temperatura, 4°C, por exemplo, facilita os gases a se solubilizarem no líquido permitindo-nos admitir que no processo de troca de oxigênio entre as hemoglobinas e o meio haja um deslocamento do equilíbrio favorecendo a solubilidade do gás em detrimento

de oxigênio da hemoproteína (33).

Desse modo podemos admitir que durante o processo de estocagem a troca de oxigênio entre hemoglobina das hemácias e o meio possa permitir a desoxigenação total de muitas moléculas e conseqüente precipitação quando se tratava de hemoglobina S. Sendo assim, com o passar dos dias o número de células desoxigenadas, isto é, falcizadas, foi aumentando progressivamente, chegando ao 25º dia onde praticamente todas as hemácias falciformes já estavam desoxigenadas.

Por outro lado, a existência de um número menor de células falcizadas após 30 dias de estocagem nos faz pensar na possibilidade de ter ocorrido hemólise. Isso talvez explique a inflexão do gráfico da Figura 1, que apresenta uma tendência de diminuição dessas hemácias a partir do 25º dia onde o fenômeno hemólise continua ocorrendo normalmente, porém a falcização das células começa a diminuir em função de pouca existência de células ainda capaz de se falcizar o que propiciou a diminuição de células a ser observada. Outro fato que se pode sugerir seria em relação a problemas técnicos na colheita das alíquotas onde a obtenção de material contido na parte mais central da bolsa tornava-se muitas vezes sujeito a erros.

Analisando os dados obtidos com as hipóteses de igualdade observamos diferenças significativas a nível de α igual a 0,05 nos experimentos feitos após 15, 20 e 25 dias de estocagem e não significativo após 5, 10 e 30 dias. Isso talvez possa ser explicado como conseqüência das diferentes condições de obtenção do sangue pelo Banco de Sangue onde o indivíduo AS pode se mostrar em diferentes condições de stress no momento da colheita do material. Dessa forma, a não significância a nível $\alpha = 0,05$ no 5º e 10º dia de estocagem torna-se aceitável ao se considerar a variação das condições da colheita de material o que irá influenciar bastante nos primeiros dias de estocagem onde a difusão do material na bolsa é pequena (baixa temperatura) e a oxigenação do sangue é insuficiente para reverter muitas células já falcizadas. Esse equilíbrio só é observável após 15 dias de estocagem.

O grande número de células falcizadas observadas durante a estocagem das bolsas quando comparadas com outros trabalhos pode nos parecer discrepante porém valores de 1,5% encontrado por RAY (32) se referem a condições diferentes das nossas, incluindo aí, a porosidade da bolsa que pode ser diferente. Em nosso trabalho utilizamos a bolsa plástica "Hemobag"

que já foi testada e se mostrou permíável ao oxigênio (5).

Além do alto índice de falcização das hemácias observamos, de acordo com a classificação de Nakao (27), uma sequência de mudanças na forma de disco bicôncavo para esfera crenada e finalmente para esfera lisa. Transformações semelhantes foram observados no grupo controle que foi constituído de 5 bolsas de doadores portadores de hemoglobina A. Essas anormalidades foram compatíveis com a literatura, pois é sabido que eritrócitos estocados sofrem alterações morfológicas (14-38).

Baseados nesses dados obtidos, julgamos não ser aconselhável a utilização de concentrados de hemácias com hemoglobina AS no tratamento hemoterápico.

5 - CONCLUSÃO

Os experimentos "in vitro" mostraram que as hemácias com hemoglobina AS estocadas em bolsas plásticas a 4°C, falcizam em números variáveis no decorrer do período de armazenamento.

As médias dos números de eritrócitos falciformes durante a estocagem, aumentaram de forma estatisticamente significativa.

Outras alterações morfológicas foram observadas em relação ao grupo controle no decorrer do armazenamento.

Pela facilidade com que as hemácias falcizaram no período de estocagem, chamamos atenção para o perigo que essas células possam causar quando submetidas a transfusão sanguínea, principalmente se o receptor estiver sob condição de hipóxia. Isso pode ser evitado se for incluído em banco de sangue, a pesquisa sistemática de hemoglobina S em doadores.

6 - SUMMARY

Rede cells maintained at 4°C from donators with the sickle cell trait, proceeding from the center of Hematology and Hemoterapy of Ceará were studied morphologically. It was observed a high index of red cells falcization after 24 hours of storage. This index had a progressive resing until the 25th day, showing a media of 14,6% of red cells falcization. There was a variation from bag to bag and the higher index of falcization found was 36% on the 20th day. Other morphological charges were observed in relation to the control group with the elapse of the storage.

We judge necessary to recommed against the use of red cells concentrates eith sickle cell trait and stimulate the Blood Banks to develop laboratory tests to exclude possible carriers of the sickle cell trait.



7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLISON, A. C. Malaria in carriers of the sickle-cell trait and in newborn children. Exp. Parasit., 6:418-47, 1957.
2. ARAÚJO, J.T. Hemoglobinas anormais em São Paulo (métodos de estudo - incidência). J. Bras. Med., 9:1264-83, 1965.
3. ARAÚJO, J.T. & JAMRA, M. Incidência de hemoglobinas anormais em amostra da população da cidade de São Paulo, Brasil. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, 20:310-9, 1965.
4. ATLAS, S.A. The sickle cell trait and surgical complications: a matched - pair patient analysis. JAMA, 299 (8): 1078-80, 1974.
5. BARRETO, O.C. O.P.; NONOYAMA, K.; SAWATANI, K. T.; OKUMURA, Y.; JAMRA, M. Viabilidade de sangue conservado em recipientes de várias procedências. Rev. Ass. Med. Brasil, 29: 102-105, 1985.
6. BEET, E.A. The genetics of the sickle - cell trait in a Bantu tribe. Ann. Eng., 14:279-84, 1949.
7. BERTHIER, C.O. Triagem em hospital pediátrico. Rio de Janeiro, 1981. Tese (Mestrado) Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira.
8. BOTURÃO, E. & BOTURÃO, E. Doença por hemácias falciformes. Incidência na Santa Casa de Santos. Observações clínicas e hematológicas. O Hospital, 32:709-28, 1947.
9. CALLENDER, S.T.E.; NICKEL, J.F.; MOORE, C.V.; POWELL, E.O. Sickle cell disease: Studied by measuring the survival of transfused red blood cells. J. Lab. Clin. Med. 34:90-104, 1949.
10. CANNING, D.M. & HUNTSMAN, R.G. An assessment of Sickledex as an alternative to the sickling test. J. Clin. Pathol., 23:736-7, 1970.
11. CÉZAR, P.C.; MIZUSAKI, K.; PINTO Jr., W.; OPRMOLLA, D. V. A.; BEIGUELMAN, B. Hemoglobina S e lepra. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol., 7(2)151-67, 1974.
12. COOPER, M.R. & TOOLE, J.F. Sickle-cell trait: benign or malignant? Ann. Intern. Med., 77:997-8, 1972.

13. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. Hematologia practica. 2 ed. Barcelona, Toray, 1970.
14. FÉO, C.J. & LEBLOND, P.F. The Discocyte-echinocyte Transformation: comparison of normal and ATP-enriched human erythrocytes. Blood, 44(5):639-46, 1974.
15. GENETET, B. & MANNONI, P. Transfusion de globules rouges. In: --- La transfusion. Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1978. 680p. cap. 3. p. 73-143.
16. ITANO, H.A. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. Arch. Biochem. Biophys., 47:148-59, 1953.
17. JAMES, R.G.D.S. & TORRIE, H. Principles and procedures of statistics. A Biometrical Approach. 2. ed. Tokyo, Tosho Printing, 1980.
18. JONES, S.R.; BINDER, R.A.; DONOWHO, E. Sudden death in sickle-cell trait. N. Engl. J. Med., 282:323-5, 1971.
19. JUNQUEIRA, P.C.; FORTES, H.M.; SOUTO MAIOR, N. Triagem rápida da hemoglobina S em doadores. Rev. Bras. Patol. Clin., 17(4):140-2, 1981.
20. KREVANS, J.R. In vivo behavior of sickle-trait erythrocytes when exposed to continuous hypoxia. Clin. Res., 7: 203, 1959. Em Mollison, P.L. ref. 26.
21. LEVIN, W.C. "Asymptomatic" sickle cell trait. Blood, 13: 904-6, 1958.
22. McCORMICK, W.F. Abnormal hemoglobins, II The pathology of sickle cell trait. Amer. J. Med. Sci., 241:329-35, 1961.
23. MARINHO, H.M. Hemoglobinopatia S (Doença eritrofalcêmica). Guanabara, Centro de Estudos, Treinamento e Aperfeiçoamento de Secretaria de Saúde, 1970 (Memória Apresentada à Academia Nacional de Medicina em 17.9.1969). 93p.
24. MARTINS, J.M.; PITOMBEIRA, M.S.; CUNHA, R.V. Hemoglobinopatias, Estudos feitos no Estado do Ceará. O Hospital, 68:701-9, 1965.
25. MIALE, J.B. Demonstration of sickle cells. In: ---. Laboratory medicine - hematology. St. Louis, C.V. Mosby, 1958. 735p. p. 648-9.

26. MOLLISON, P.L. The withara wal of blood. In: ---. Blood transfusion in clinical medicine. 7 ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1983. 988p. Cap. 1. p. 1-34.
27. NAKAO, M.; NAKAO, T.; YAMAZOE, S. Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. Nature. 187(4741):945-6, 1966.
28. NEEL, I. V.; WELLS, I. C.; ITANO, H.A. Familial differences in the proportion of abnormal hemoglobin present in the sickle cell trait. J. Clin. Invest. 30:1120-4, 1951.
29. PABIS, A. Cellogel eletrophoresis of haemoglobins. Clin. Chim. Acta, 20:449-53, 1968.
30. PEREIRA, J.M.; MENECHINE, T.; PESSOA, A.L. C.de.; CALLADO, A.N.A.; SANTOS, V.C. dos; NAKAMURA, N. Uso de um novo teste de solubilidade para o diagnóstico de hemoglobina S em doadores de sangue do Estado da Guanabara. B. Inst. Hemat. Arthur de Siqueira Cavalcanti, 2/3(7-12):7-11, 1972/73.
31. RAMALHO, A.S. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. Rev. Ass. Med. Bras., 22(12):467-8, 1976.
32. RAY, R.N.; CASSEL,.; CHAPLIN Jr. H. In vitro and in vivo observations on stored sickle trait red blood cells. Am. J. Clin. Path., 32(5):430-5, 1959.
33. RIGGS, A. Properties of fish hemoglobins. In:--- Fish Physiology. Ed. W.S. Hoar & D.J. Randall New York, Academic Press. 4:209-251, 1970.
34. SINGER, K.; ROBIN, S.; KING, J.C. & JEFFERSON, R.N. Life span of sickle cell and pathogenesis of sickle-cell anemia. J. Lab. Clin. Med. 33:975-84, 1948.
35. SMITH, E.B. Complications in sickle-cell trait. J.Nat.Med. Ass., 62:334-338, 1970.
36. TONDO, C.V. & SALZANO, F.M. Abnormal hemoglobins in a Brazilian negro population. Amer. J. Hum. Genet., 14(4): 401-9, 1962.
37. VEIGA, S. & VAITHIANATHAN, T. Massive Intravascular sickling after exchange transfusion with sickle-cell trait blood. Transfusion, 3:387-91, 1963.
38. WOLFE, L. The red cell membrane and the storage lesion. Clin. Haemat., 14(1):259-76, 1985.