

## Síndrome Hemolítica. Fisiopatologia e Clínica. Classificação

Fernando Ferreira Costa • Kleber Yotsumoto Fertrin • Nicola Conran

### INTRODUÇÃO

O complexo mecanismo da formação do eritrócito, a eritropoese, ocorre no ambiente específico da medula óssea. Após a perda do núcleo picnótico, a hemácia é liberada em circulação com sua forma característica de disco bicôncavo, e sobrevive, em média, por 120 dias. Durante esse período, percorre uma distância de aproximadamente 200 quilômetros e enfrenta a turbulência da bomba cardíaca mais de 500 mil vezes. Portanto, é previsível que a hemácia seja uma célula metabolicamente ativa e necessite de suprimento adequado de glicose para produção de energia.

A produção de energia sob a forma de ATP é derivada do metabolismo da glicose pela via glicolítica de Embden-Meyerhof. Além da produção de ATP, as duas outras vias metabólicas ativas nas hemácias, a via das pentoses e a via de Rapoport-Luebering, resultam, respectivamente, na produção do potencial redutor intraeritrocitário (NADPH e GSH) e de 2,3 DPG, que é importante no controle da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

As reações do metabolismo eritrocitário anaeróbico de glicose dependem de grande número de enzimas existentes na membrana eritrocitária. Essas enzimas são sintetizadas nos eritroblastos e permanecem nas hemácias durante toda a vida, embora ocorra progressiva redução na sua atividade com o envelhecimento da célula. O metabolismo eritrocitário e consequente produção de energia visam fundamentalmente a manter a flexibilidade da membrana, a forma bicôncava da hemácia e a integridade da hemoglobina. Desse modo, o ATP produzido protege a membrana celular e a hemoglobina da oxidação de grupos SH, mantém a concentração intracelular alta de  $K^+$  e baixa de  $Na^+$  e  $Ca^{++}$  contra um gradiente de concentração, sendo ainda fundamental na manutenção de lipídeos da membrana celular.

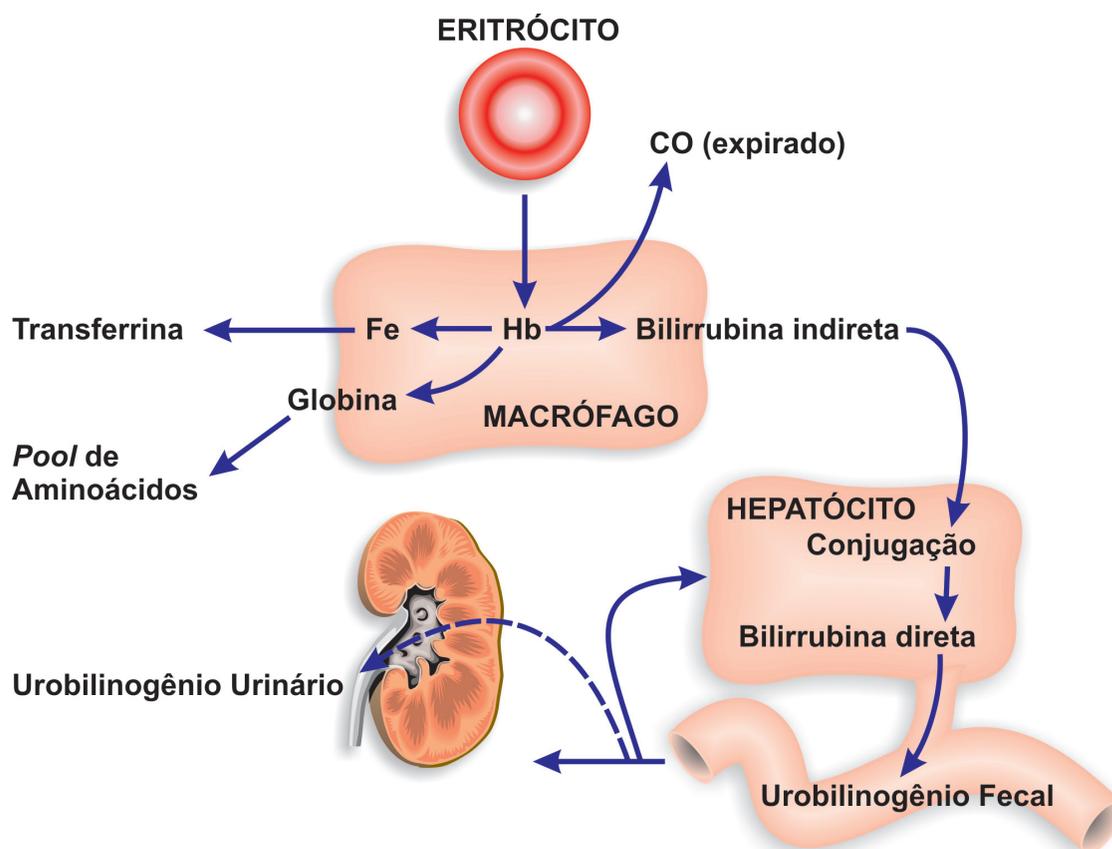
Com o envelhecimento, a maioria das enzimas da via glicolítica torna-se menos efetiva e há dificuldade de manutenção da concentração intracelular de ATP. Assim, a membrana perde lipídeos progressivamente, a relação superfície-volume diminui, e a célula se torna semelhante a uma esfera. Além disso, a concentração de Hb intracelular aumenta em consequência da redução do volume, proteínas de membrana tornam-se desnaturadas pela oxidação de grupos SH, e a concentração de íons  $Ca^{++}$  na membrana se eleva. As moléculas de hemoglobina oxidadas e desnaturadas se ligam à membrana celular em quantidades crescentes, combinando-se com as proteínas do citoesqueleto eritrocitário formando complexos. Esse conjunto de fenômenos resulta em uma célula menos deformável, o que determina, em última análise, sua destruição pelos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear.

### MECANISMOS DE DESTRUIÇÃO DAS HEMÁCIAS

#### ► Fagocitose pelos macrófagos (hemólise extravascular)

Como a vida média das hemácias em circulação é de aproximadamente 120 dias, cerca de 1/120 ou 0,8% da massa total de hemácias é destruída diariamente, e outra quantidade igual é produzida, resultando em equilíbrio.

Em condições normais, a destruição das hemácias ocorre preferencialmente no interior dos macrófagos, e somente pequena quantidade de hemólise ocorre no compartimento intravascular (Figura 22.1). A hemólise no sistema fagocítico mononuclear acontece primariamente no baço, no fígado e na medula óssea. Devido a sua anatomia vascular peculiar, o baço é extremamente sensível para detectar defeitos eritrocitários mínimos. O sangue da zona marginal do baço e o da arteríola terminal é drenado para a polpa



**Figura 22.1** Catabolismo da hemoglobina após a hemólise.

vermelha, diretamente aos seios venosos e daí para as veias eferentes ou, alternativamente, para os cordões existentes entre os seios. A passagem de volta dos cordões esplênicos para os sinusoides só é possível através de poros estreitos, irregulares e tortuosos, e os macrófagos e outras células atuam como obstáculos físicos à sua volta. Para ultrapassar esses obstáculos, o eritrócito necessita de enorme grau de deformabilidade. Esse tipo de circulação, além de remover eritrócitos pouco deformáveis, é capaz de remover partículas ligadas à membrana como corpos de Heinz, corpúsculos de Howell-Jolly, grânulos sideróticos e vacúolos. Outro importante aspecto da circulação esplênica é a redução no volume de plasma no sangue esplênico (*plasma skimming*). O fluxo laminar nas arteríolas centrais desvia o plasma para os ramos perpendiculares, levando à formação de sangue de elevado hematócrito que circula lentamente na polpa vermelha. Como consequência, há maior estase e condições metabólicas desfavoráveis, como hipóxia, acidose e redução na concentração de glicose.

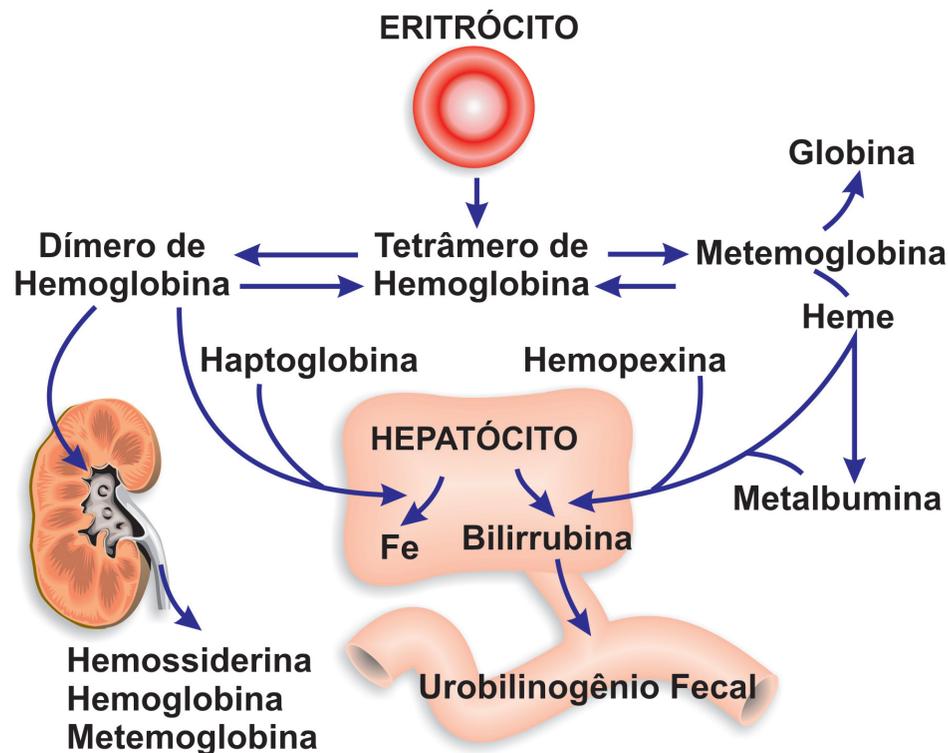
O fígado não é tão sensível quanto o baço para detectar defeitos mínimos das hemácias. No entanto, sendo a lesão suficientemente importante para ser detectada pelos macrófagos hepáticos, ele é mais eficiente que o baço, pois seu fluxo sanguíneo é muito maior: o fluxo sanguíneo hepático corresponde a 35% do volume-minuto cardíaco, ao passo que o fluxo esplênico corresponde a 5%.

Assim, na *esferocitose hereditária* as hemácias são destruídas no baço; o fígado não é capaz de detectar o defeito. Como consequência, a esplenectomia é terapêutica eficaz nessa moléstia. Já as hemácias na *anemia falciforme* são suficientemente deformadas para serem detectadas pelo fígado, e de nada adianta a remoção do baço nessa doença.

### ► Hemólise intravascular

Uma lesão grave das hemácias pode levar à sua destruição no espaço intravascular, como acontece nos traumas ou na hemólise por ação do complemento. Nessas circunstâncias, a hemoglobina é liberada na circulação (hemoglobinemia) e pode, eventualmente, ser perdida pela urina (hemoglobinúria) (Figura 22.2).

Quando a quantidade de hemoglobina liberada no plasma é pequena, toda ela se liga à *haptoglobina*,  $\alpha_2$ -glicoproteína plasmática sintetizada pelo fígado, e o complexo hemoglobina-haptoglobina é levado ao fígado, onde é catabolizado. Esse fenômeno reduz drasticamente a concentração de haptoglobina plasmática. Quando a quantidade de hemoglobina liberada em circulação excede a capacidade de ligação da haptoglobina, a hemoglobina livre é filtrada nos rins. A maior parte da hemoglobina filtrada nos glomérulos é reabsorvida nos túbulos; se a capacidade de reabsorção dos túbulos é excedida, aparece hemoglobina na urina (he-



**Figura 22.2** Catabolismo da hemoglobina após a hemólise intravascular.

moglobinúria). A hemoglobina reabsorvida é metabolizada na célula epitelial tubular, e o ferro fica acumulado sob a forma de ferritina e hemossiderina. Quando a hemólise intravascular ocorre cronicamente, as células epiteliais carregadas de hemossiderina podem ser demonstradas na urina pela reação do azul da prússia (hemossiderinúria).

### CONCEITO DE ANEMIA HEMOLÍTICA

As anemias hemolíticas compreendem um grupo de doenças em que a sobrevivência das hemácias em circulação está acentuadamente reduzida e a medula óssea não é capaz de compensação mesmo aumentando sua produção. Essas doenças podem ser facilmente identificadas porque, além de anemia, esses pacientes exibem sinais clínicos e laboratoriais de aumento do catabolismo de hemoglobina e aumento da produção de hemácias.

### CONSEQUÊNCIAS DA HEMÓLISE EXACERBADA

#### ► Destruição excessiva de hemácias

A maior destruição de hemoglobina resulta em um rápido catabolismo do heme (porção não proteica da hemoglobina), com produção acelerada dos dois principais catabólitos do heme: pigmentos biliares e monóxido de carbono. Nos macrófagos, o heme livre é rompido pela oxidação de uma das quatro pontes de meteno do anel da protoporfirina, pela ação da enzima heme oxigenase

microssomal. O carbono liberado forma monóxido de carbono, o ferro é reaproveitado, e a protoporfirina rompida e oxidada forma a biliverdina, pigmento esverdeado que é rapidamente reduzido a bilirrubina. Liberada dos locais de catabolismo do heme, a bilirrubina aparece no plasma em valores de 0,5 a 1,0 mg/dL. A bilirrubina é muito pouco solúvel em água, mas é lipossolúvel, e por isso circula ligada à albumina, o que aumenta acentuadamente sua solubilidade.

No fígado, liberada da albumina, a bilirrubina é captada pelo hepatócito e conjugada com ácido glicurônico. A reação é catalisada pela enzima glicuroniltransferase, ocorrendo formação de diglicuronato de bilirrubina (bilirrubina conjugada). Esse composto é hidrossolúvel e excretado nas fezes juntamente com a bile, não sendo normalmente encontrado no plasma em grandes quantidades. Em algumas condições patológicas pode ocorrer aumento de sua concentração plasmática e, nesses casos, é facilmente filtrada e excretada na urina: bilirrubina (ou “pigmentos biliares”) na urina é sinal de excreção de bilirrubina conjugada (ou bilirrubina direta), enquanto que a bilirrubina não conjugada (indireta) não é excretada na urina.

No intestino, a bilirrubina é reduzida a uma série de compostos incolores conhecidos como urobilinogênios. Esses podem dar origem a compostos coloridos nas fezes (urobilinas) ou ser absorvidos (10-20%) e levados ao fígado e reexcretados (recirculação entero-hepática do urobilinogênio). Pequena quantidade desse urobilinogênio reabsorvido é filtrada e excretada pelos rins. Quando há

comprometimento de função hepática, uma quantidade elevada de urobilinogênio pode aparecer na urina.

Como consequência do catabolismo aumentado do heme, a quantidade de bilirrubina produzida aumenta: isso, frequentemente (mas não invariavelmente), leva à elevação da bilirrubina não conjugada (indireta) no plasma e clinicamente se manifesta por **icterícia**. Como se trata de bilirrubina indireta, ela não é excretada na urina e, portanto, não há escurecimento da urina (icterícia acolúrica).

A grande quantidade de urobilinogênio excretada diariamente leva à formação de cálculos biliares. Nas anemias hemolíticas hereditárias esses cálculos podem ser detectados em 30 a 60% dos pacientes, embora somente 10 a 15% venham a apresentar sintomas. Em consequência, esses pacientes podem ter crises intermitentes de icterícia obstrutiva, com elevação de bilirrubina conjugada (“direta”) e excreção de pigmentos biliares na urina (icterícia colúrica).

A excessiva destruição de eritrócitos no sistema fagocitário quase invariavelmente conduz a hiperplasia celular e esplenomegalia e, também, ocasionalmente, à hepatomegalia (Tabela 22.1)

**Tabela 22.1**

► Consequências do aumento da quantidade de eritrócitos destruídos diariamente.

**Aumento do catabolismo do heme**

- Elevação da bilirrubina indireta
- Icterícia
- Aumento da excreção de urobilinogênio
- Cálculos biliares

**Esplenomegalia**

**Hepatomegalia**

► **Compensação pela medula óssea**

Nas anemias hemolíticas, a medula óssea se mostra excepcionalmente hiperplásica. Os eritroblastos, que normalmente constituem menos de 20% das células da medula óssea, chegam a 60% ou mais, isto é, a relação leucócito-eritroblasto passa de 4 a 5: 1 para 1:1, podendo mesmo inverter-se.

Além disso, a medula óssea ativa expande seu volume, ocupando áreas que normalmente conteriam medula óssea inativa (medula óssea gordurosa). No homem adulto, a medula óssea ativa pode ser duplicada e a quantidade de precursores eritrocitários pode ser triplicada na ocorrência de anemia hemolítica. Assim, a produção de eritrócitos na anemia hemolítica pode atingir seis a sete vezes o normal. A sobrevivência das hemácias poderia cair de 120 para vinte dias (um sexto do normal) e a medula compensaria pro-

duzindo seis vezes o normal sem que houvesse anemia, situação descrita como **hemólise compensada**. Quando a sobrevivência das hemácias for menor que vinte dias, provavelmente não haverá compensação pela medula, manifestando-se a anemia. Nesse caso, após um período inicial em que a quantidade de hemácias destruídas é maior que a produzida, o volume de hemácias circulantes diminui alcançando um novo equilíbrio, em que quantidades iguais de hemácias são produzidas e destruídas, mas como o volume total de hemácias está abaixo do normal, isto é, há **anemia**. Como consequência da hiperatividade da medula óssea, há **aumento de reticulócitos** no sangue periférico.

Nas anemias hemolíticas de evolução crônica, o **esqueleto** pode manifestar alterações importantes, particularmente evidentes na talassemia  $\beta$ -homozigótica, visíveis nas radiografias dos ossos. (Tabela 22.2)

**Tabela 22.2**

► Consequências da maior produção de eritrócitos.

**Sangue periférico**

- Reticulocitose
- Macrocitose
- Eritroblastos circulantes

**Medula óssea**

- Hiperplasia eritroide
- Alterações radiológicas esqueléticas

**MECANISMOS DE HEMÓLISE**

Em geral, os mecanismos conducentes à hemólise podem ser sintetizados em quatro grupos (Tabelas 22.3 e 22.4), embora a causa exata seja obscura ou incompletamente estabelecida em muitas anemias hemolíticas:

- a) anormalidades da membrana das hemácias;
- b) anormalidades da hemoglobina;
- c) anormalidades das enzimas eritrocitárias;
- d) fatores extrínsecos às hemácias.

► **Alterações da estrutura ou função da membrana**

São alterações que afetam a forma e a deformabilidade eritrocitária. Em geral, ocorre diminuição da relação superfície/volume e redução da deformabilidade. O exemplo mais comum desse tipo de anormalidade é a esferocitose hereditária. Nessa doença existem anormalidades em proteínas do citoesqueleto eritrocitário, que resultam em perda de lipídeos, colesterol e fragmentos da membrana, com a hemácia perdendo sua forma bicôncava e transformando-se gradualmente em um esferócito. Esses esferócitos podem

**Tabela 22.3**

► Anemia hemolítica por defeitos intrínsecos das hemácias.

<b>Anormalidades da membrana eritrocitária</b>
<b>Hereditárias</b>
■ Esferocitose hereditária, eliptocitose hereditária, piropoiquilocitose hereditária
<b>Adquiridas</b>
■ Hemoglobinúria paroxística noturna, cirrose hepática
<b>Anormalidades da hemoglobina</b>
<b>Alteração estrutural</b>
■ Doenças falciformes, hemoglobinopatia C, hemoglobina instável
<b>Alteração no ritmo de síntese</b>
■ Talassemias $\alpha$ e $\beta$
<b>Defeito enzimático eritrocitário</b>
■ Deficiência de G6PD, deficiência de PK

**Tabela 22.4**

► Anemia hemolítica por defeitos extrínsecos das hemácias.

<b>Ruptura mecânica das hemácias</b>
■ Anemia hemolítica microangiopática (CID, PTT, SHU, HELLP)
■ Próteses valvares cardíacas
■ Marcha prolongada
<b>Agentes químicos, biológicos ou micro-organismos</b>
■ Malária
■ Veneno de cobra
<b>Imune</b>
<b>Aloimunes</b>
■ Doença hemolítica do recém-nascido
■ Transfusão de sangue incompatível
<b>Autoimunes</b>
■ Por anticorpos a frio
■ Por anticorpos a quente
■ Por drogas
<b>Hiperesplenismo</b>
■ Esplenomegalia de qualquer etiologia

sufrer hemólise intraesplênica e, devido a sua reduzida deformabilidade, podem ser fagocitados pelos macrófagos. Outras alterações da membrana incluem a eliptocitose hereditária e a estomatocitose hereditária.

Uma alteração adquirida da membrana eritrocitária é a Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN). Na HPN, ocorre o surgimento de um clone na medula óssea com uma mutação no gene *PIG-A* (fosfatidilinositol glican, classe A), produzindo células sanguíneas com membrana sensível à lise pelo sistema complemento, gerando hemólise intravascular e graus variados de citopenias. Outra anormalidade adquirida da membrana eritrocitária é provocada pelo excesso de colesterol que se acumula na membrana em pacientes com doenças hepáticas, como na cirrose. A célula perde sua deformabilidade e pode ser destruída prematuramente no baço.

A investigação laboratorial das **anormalidades da membrana eritrocitária** compreende resumidamente os seguintes passos:

- Hemograma e observação cuidadosa da morfologia do sangue periférico.
- Teste de fragilidade osmótica das hemácias (incubação a 37°C por 24 horas).
- Análise eletroforética das proteínas da membrana pelos métodos de Fairbanks e Laemmli e avaliação da quantidade de dímeros por gel não desnaturante.
- Análise eletroforética após digestão das proteínas com tripsina.
- Análise do gene correspondente à proteína qualitativa ou quantitativamente alterada.
- Citometria de fluxo com marcação para eosina-5' maleimida.
- Ectacitometria.

### ► Anormalidades da hemoglobina

As anormalidades da hemoglobina podem ser classificadas genericamente em estruturais e no ritmo de síntese das globinas. A presença da hemoglobina anormal no interior das hemácias pode alterar sua viscosidade ou sua deformabilidade, sendo o exemplo mais conhecido a hemoglobina S. As anormalidades no ritmo de síntese são representadas pelas síndromes talassêmicas  $\beta$  e  $\alpha$ . A investigação laboratorial das **anormalidades das hemoglobinas**, em geral, pode incluir os seguintes aspectos:

- Hemograma, índices hematimétricos confiáveis, análise da morfologia do sangue periférico.
- Eletroforese das hemoglobinas em tampão alcalino (acetato de celulose) e, se necessário, em tampão ácido.
- Eletroforese de hemoglobinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) com quantificação de Hb A<sub>2</sub> e Hb F.
- Teste de solubilidade da hemoglobina em tampão fosfato concentrado.
- Pesquisa de Hb H e Hb Bart's.
- Pesquisa de Hb instável e corpos de Heinz.
- Eletroforese de cadeias de globinas.
- Análise molecular dos genes da globina.

É importante lembrar que, sempre que possível, deve ser realizado o estudo em todos os familiares disponíveis, pois, sendo a maioria dessas doenças de natureza hereditária, e podendo resultar de associações complexas de genótipos, em muitos casos, somente o estudo familiar permite o diagnóstico correto.

### ► Anormalidades das enzimas eritrocitárias

Embora seja relativamente simples do ponto de vista metabólico, a sobrevivência e a função das hemácias dependem de numerosas enzimas. A produção de cada uma dessas enzimas pode ser deficiente por alterações na codificação genética, podendo levar a manifestações clínicas ou laboratoriais. No entanto, os defeitos da maioria das enzimas são muito raros, e apenas algumas enzimopatias têm importância clínica. As anormalidades das enzimas eritrocitárias podem ser genericamente classificadas em:

- **defeitos da via de Embden-Meyerhof:** a anormalidade mais frequente é a deficiência de Piruvato Quinase ou Cinase (PK, do inglês *Pyruvate Kinase*);
- **defeitos na via das pentoses:** a alteração mais frequente é a deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD).

A investigação laboratorial das anormalidades enzimáticas se inicia com a avaliação semiquantitativa e quantitativa da G6PD com os testes de Brewer, imunofluorescência e quantificação da G6PD. Além disso, deve ser feita a eletroforese em acetato de celulose, e nos casos que revelarem alterações, pode ser realizado o estudo molecular do gene da G6PD em busca das mutações mais frequentes. Nos casos sem alterações da G6PD, devem ser avaliadas as demais enzimas eritrocitárias. A deficiência de PK pode ser sugerida pelo pontilhado basófilo característico nas hemácias no esfregaço de sangue periférico e, nesses casos, a dosagem da atividade da PK está indicada.

### ► Fatores extrínsecos à hemácia

**Fixação de anticorpos à membrana.** Trata-se de processos imunes em que à membrana celular ligam-se aglutina-

ninas tipo IgM, anticorpos incompletos do tipo IgG (que causa esferocitose imune) ou anticorpos que fixam e ativam o complemento. Quando o anticorpo fixa e ativa o complemento, ocorre hemólise intravascular. Um exemplo é a reação hemolítica a uma transfusão incompatível do sistema ABO.

Quando se trata de aglutininas, as hemácias aglutinadas são retidas pelos macrófagos e destruídas. No caso das IgG incompletas, elas se fixa à membrana das hemácias, que são então reconhecidas pelos macrófagos e retiradas da circulação. Os macrófagos podem fagocitar apenas parte da membrana, levando à formação dos esferócitos. Merecem referência também anemias hemolíticas secundárias a drogas, que provocam hemólise por desencadear mecanismos autoimunes (por exemplo, a  $\alpha$ -metildopa), por interferência com a membrana eritrocitária (por exemplo, cefalosporinas), ou ainda por acelerarem processos oxidativos (por exemplo, dapsona).

A investigação laboratorial inicial, em geral, inclui:

- Teste direto da antiglobulina (Coombs direto).
- Teste para autoanticorpos no soro do paciente (Coombs indireto).
- Eluição e identificação da especificidade do anticorpo.
- Titulação de aglutininas.

Uma causa pouco comum observada recentemente, mas capaz de induzir anemia hemolítica grave, é o uso de imunoglobulina endovenosa para tratamento de reposição ou em diversas doenças autoimunes, como síndrome de Guillain-Barré.

**Hemólise mecânica.** Inclui tanto as situações em que o rompimento das hemácias ocorre por lesão por próteses valvares cardíacas e marcha prolongada, por exemplo, quanto as anemias associadas à deposição de fibrina na microcirculação, denominadas anemias hemolíticas microangiopáticas. Essas podem ocorrer, por exemplo, na Coagulação Intravascular Disseminada (CID), na Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT), na Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) e na pré-eclâmpsia grave complicada com síndrome HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets* – hemólise, aumento de enzimas hepáticas e plaquetopenia).

## quadro 22.1 Gravidade da anemia na hemólise descompensada

Um indivíduo normal com 5 litros de sangue e hemoglobina de 15 g/dL tem uma quantidade total de hemoglobina de 750 g e, em condições normais, produz e destrói diariamente cerca de 6,3 g de hemoglobina. Se a vida média eritrocitária for reduzida a dez dias, teremos uma destruição diária de 75 g de hemoglobina e uma produção máxima pela medula óssea de aproximadamente 45 g. A massa total de hemoglobina será en-

tão gradativamente reduzida, até que alcance o valor de 450 g, quando ocorrerá novo equilíbrio, pois as quantidades produzidas e destruídas diariamente serão iguais a 45 g. Mas, nesse caso, o novo nível de hemoglobina se estabilizará na concentração de 9 g/dL. A gravidade da anemia na doença hemolítica é, pois, diretamente proporcional à redução da vida média das hemácias circulantes.

**Anemia hemolítica em infecções.** Numerosas infecções podem estar associadas à hemólise, quer pela ação direta do parasita na hemácia (malária), quer pela produção de substâncias biológicas que atuam sobre a hemácia e sua membrana ou desencadeando mecanismos imunes (vírus). Formas particularmente graves de infecções associadas à CID podem provocar hemólise do tipo microangiopático.

## CLASSIFICAÇÃO

A forma tradicional de classificação das anemias hemolíticas identifica, por dois grupos distintos, os defeitos intrínsecos dos eritrócitos e os defeitos extrínsecos aos eritrócitos. As Tabelas 22.3 e 22.4 agrupam de maneira resumida as anemias hemolíticas segundo esse tipo de classificação.

## REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Bartosz G. Erythrocyte aging; physical and chemical membrane changes. *Gerontology*. 1981;37:33-67.
2. Clark MR. Senescence of red blood cells: progress and problem. *Physiol Rev*. 1998;68:503-54.
3. George JN, Al-Nouri ZL. Diagnostic and therapeutic challenges in the thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;604-9.
4. Hilmann RS, Finch CA. *Red cell manual*. 5 ed. Philadelphia: FA Davis Company, 1985.
5. Lee GR. Hemolytic disorders: general considerations. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10. ed. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Poroskevas F, Green JP, Rodgers GM (eds.). Williams and Wilkins, 1999.
6. Pintova S, Bhardwaj AS, Aledort LM. IVIG – A hemolytic culprit. *N Engl J Med*. 2012;367:974-76.
7. Piomelli S, Seaman C. Mechanism of red blood cell aging – relationship of cell-density and cell age. *Am J Hematol*. 1993;42:46-52.
8. Robinson SH. Formation of bilirubin from erythrocyte and non-erythroid sources. *Semin Hematol*. 1972; 9:43-53.

