

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Laura Maria Freitas da Silva

**HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA:
ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CURSO CLÍNICO EM
PORTADORES**

São Paulo
2019

Laura Maria Freitas da Silva

**HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA:
ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CURSO CLÍNICO EM
PORTADORES**

**HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA:
ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS CURSO CLÍNICO EM
PORTADORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientada pelo Prof. Dr. Michelangelo Juvenale, como requisito parcial para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Silva, Laura Maria Freitas da
Hemoglobinúria paroxística noturna: aspectos fisiopatológicos e curso
clínico em portadores / Laura Maria Freitas da Silva . -- São Paulo:
Centro Universitário São Camilo, 2019.
65 p.

Orientação de Michelangelo Juvenale.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro
Universitário São Camilo, 2019.

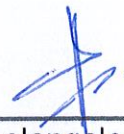
1. Glicosilfosfatidilinositóis 2. Hemoglobinúria paroxística 3.
Insuficiência renal 4. Óxido nítrico 5. Proteínas dos sistema complemento
6. Trombose I. Juvenale, Michelangelo II. Centro Universitário São Camilo
III. Título

CDD: 616.15


Laura Maria Freitas da Silva

**HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA:
ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CURSO CLÍNICO EM
PORTADORES**

São Paulo, 23 de maio de 2019



Professor Orientador - Prof. Dr. Michelangelo Juvenale



Professor Examinador – Profª Leila Jaldim Borracha Gonçalves

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, Maria Cristina e Emanuel, por sempre estarem presentes e acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Michelangelo Juvenale, pela orientação, aconselhamento e pelo exemplo de profissional dedicado ao que faz.

Às minhas amigas Ana Paula, Camilla Amaral, Larissa Akie, Ana Isabel e Camila pelo apoio, amizade e por compartilhar momentos ao longo desses anos.

À todas as pessoas que caminharam comigo.

Um eterno, obrigada!

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA

SILVA, L. M. F. **Hemoglobinúria paroxística noturna**: aspectos fisiopatológicos e curso clínico em portadores. 2019. 65 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) trata-se de uma doença hematológica rara de células tronco hematopoiéticas, provocada por uma mutação somática adquirida no gene glicosilfosfatidilinositol glicano classe A (PIG-A), o qual é responsável pela síntese de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essa molécula tem por função, ancorar diversas proteínas de membrana, dentre elas CD55 e CD59, proteínas responsáveis pela regulação do sistema Complemento. A falência de síntese dessas âncoras, leva a ausência parcial ou total dessas proteínas, tornando as células sensibilizadas à ação do Complemento, com consequente lise. Os sintomas clínicos apresentam-se de maneira diversificada entre pacientes, não são específicos, são imprevisíveis e semelhantes aos de outras doenças. É caracterizada por uma tríade, anemia hemolítica, citopenia e trombose. A hemólise intravascular crônica é responsável pelos principais sintomas da doença, e a hemoglobina liberada tem direta relação com o óxido nítrico, que possui um papel relevante nos aspectos clínicos da doença em que complicações mais graves também podem aparecer, como coágulos sanguíneos, insuficiência renal e lesões em órgãos vitais. Essa diversidade de apresentações clínicas pode afetar de maneiras diferentes cada paciente, principalmente quando em associação com outras condições como a gravidez. Testes utilizados para o diagnóstico foram substituídos em parte, pela citometria de fluxo, a qual trouxe maior precisão e sensibilidade para detectar clones HPN. Tratamentos estão disponíveis, porém a única terapia curativa é o transplante de medula óssea, mesmo com riscos no procedimento e pós-procedimento. A incorporação na terapia do eculizumab, um anticorpo monoclonal, vem sendo muito utilizada e estudada com efeitos relevantes de melhora da hemólise e suas consequências, o que contribuiu também para novas perspectivas de tratamento em estudo.

Palavras-chave: Glicosilfosfatidilinositóis. Hemoglobinúria paroxística. Insuficiência renal. Óxido nítrico. Proteínas do sistema complemento. Trombose.

ABSTRACT

SILVA, L. M. F. **Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria**: pathophysiological aspects and clinical course in patients. 2019. 65 f. Completion of course work (Bachelor in Biomedicine) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is a rare haematological hematopoietic stem cell disease caused by a somatic mutation acquired in the glycosylphosphatidylinositol class A (PIG-A) gene, which is responsible for the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors. This molecule has the function of anchoring several membrane proteins, among them CD55 and CD59, proteins responsible for the regulation of the complement system. The failure of synthesis of these anchors leads to partial or total absence of these proteins, making the cells sensitized to Complement action, with consequent lysis. Clinical symptoms are diverse in patients, non-specific, unpredictable, and similar to other diseases. It is characterized by a triad, hemolytic anemia, cytopenia and thrombosis. Chronic intravascular hemolysis is responsible for the main symptoms of the disease, and hemoglobin released has a direct relationship with nitric oxide, which has a relevant role in the clinical aspects of the disease in which more serious complications may also appear, such as blood clots, renal failure and lesions in vital organs. This diversity of clinical presentations can affect each patient in different forms, especially when in association with other conditions such as pregnancy. Tests used for the diagnosis were replaced in part by flow cytometry, which brought greater precision and sensitivity to detect HPN clones. Treatments are available, but the only curative therapy is bone marrow transplantation, even with procedural and post-procedure risks. The incorporation into the therapy of eculizumab, a monoclonal antibody, has been widely used and studied with relevant effects of improved hemolysis and its consequences, which has also contributed to new treatment prospects under study.

Keywords: Glycosylphosphatidylinositols. Paroxysmal hemoglobinuria. Renal insufficiency. Nitric oxide. Proteins of the complement system. Thrombosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do gene PIG-A e primers de PCR	15
Figura 2- Diagrama simplificado da estrutura GPI	16
Figura 3 - Estrutura e biossíntese da molécula GPI	17
Figura 4 - Via clássica de ativação do Complemento	21
Figura 5 - Via alternativa de ativação do Complemento	22
Figura 6 - Via da lectina de ativação do Complemento	23
Figura 7 - Mecanismo de ação de CD55	25
Figura 8 - Mecanismo de ação de CD59	25
Figura 9 - Ação do Complemento em indivíduos saudáveis e em pacientes com HPN	26
Figura 10 - Amostras de urina colhidas ao longo do dia de paciente com HPN	29
Figura 11 - O papel do óxido nítrico na HPN.....	30
Figura 12 - Visão geral e classificação da urina descolorida com base no exame de Urina	33
Figura 13 - Aspirado de medula óssea (A-B) e seções de biópsia (C-D) de paciente Com HPN em 2002 e em 2013	37
Figura 14 - Biópsia de rim: Deposição de pigmentos de hemossiderina no epitélio Tubular proximal	38
Figura 15 - Exemplo de Teste de Ham e Sacarose	41
Figura 16 - Histogramas representativos da expressão de GPI-AP em diferentes Subconjuntos de células hematopoiéticas presentes em amostras de Sangue periférico de indivíduos normais e HPN	43
Figura 17 - Análise por citometria de fluxo multiparâmetro de sangue periférico na HPN.....	44
Figura 18 - Mecanismo de ação do eculizumab na cascata do Complemento	47
Figura 19 - Mecanismo da hemólise extravascular durante tratamento com Eculizumab	47
Figura 20 - Visão geral da patogênese da HPN e manifestações clínicas	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Anemia Aplástica
CMF	Citometria de Fluxo
cGMP	Monofosfato Cíclico de Guanosina
DAF	Decay Accelerating Factor (Fator Acelerador de Degradação)
FOS	Fosfoetanolamina
FcyRIII	Receptor Fc de baixa afinidade
Fc	Fração constante
FLAER	Proaerolisina Marcada com Fluoresceína
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPI-AP	Proteínas Âncora de Glicosilfosfatidilinositol
GlcNAc	N-Acetilglicosamina
HPN	Hemoglobinúria Paroxística Noturna
IPIG	International PNH Interest Group (Grupo Internacional para o Estudo da HPN)
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
LDH	Lactato Desidrogenase
MAC	Membrane Attack Complex (Complexo de Ataque a Membrana)
MASPs	Serino proteases associadas à MBL
MIRL	Membrane Inhibitor of Reactive Lysis (Inibidor da Lise de Membrana)
MBLs	Lectinas de Ligação à Manose
NO	Óxido Nítrico
NK	Natural Killer
PIG-A	Fosfatidilinositolglicano classe A
PI	Fosfatidilinositol
PLTs	Plaquetas
RE	Retículo Endoplasmático
REG	Retículo Endoplasmático Rugoso
RBC	Glóbulos vermelhos
SFM	Síndrome de Falência Medular
TAD	Teste de Antiglobulina Direta
TE	Tromboembolismo
TMO	Transplante de Medula Óssea
TCTH	Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas
u-PAR	Receptor do Ativador de Plasminogênio do Tipo Uroquinase
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivos gerais	11
2.2	Objetivos específicos	11
3	METODOLOGIA.....	12
4	DESENVOLVIMENTO.....	13
4.1	Aspectos gerais	13
4.2	Fisiopatologia e aspectos moleculares.....	14
4.2.1	O gene	14
4.2.2	Âncora GPI.....	15
4.2.3	Fisiopatologia	18
4.3	Manifestações clínicas.....	28
4.3.1	Hemólise intravascular.....	29
4.3.2	Trombose	30
4.3.3	Achados laboratoriais – sangue	32
4.3.4	Achados laboratoriais – plasma	32
4.3.5	Achados laboratoriais – medula.....	33
4.3.6	Achados laboratoriais – urina.....	33
4.4	Classificação.....	34
4.5	HPN em associação com insuficiência medular	35
4.6	HPN em associação com insuficiência renal	37
4.7	HPN em associação com gravidez.....	39
4.8	Diagnóstico.....	40
4.9	Tratamento	45
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é alteração complexa da hematopoese caracterizada por expansão clonal de uma ou mais células-tronco hematopoiéticas que sofreram modificações no material genético. Evidenciadas, em casos clássicos, manifestações de episódios de hemólise intravascular e hemoglobinúria (PARKER; WARE, 2008).

Descrita como síndrome clínica pela primeira vez em 1882 por Paul Strübing (HILLMEN *et al.*, 1995), com relatos de casos compatíveis já em 1793, trata-se de uma anemia hemolítica rara de desenvolvimento lento e prolongado adquirida em algum momento da vida, em que o curso clínico se apresenta de maneira imensamente variável. Regularmente, pacientes com HPN demonstram quadros com infecções regulares, neutropenia e trombocitopenia. Seu surgimento pode vir em associação com síndromes de insuficiência medular, como a anemia aplástica e síndromes mielodisplásicas. Também é considerada um tipo de trombofilia adquirida devido sua propensão por trombose em especial de veias hepáticas e intra-abdominais, sua principal causa de mortalidade. Consiste de uma tríade: anemia hemolítica, pancitopenia e trombose. Estas fizeram com que a tornasse uma síndrome clínica única (ARRUDA *et al.*, 2010).

A modificação genética que levou ao fenótipo da doença advém de mutação no gene fosfatidilinositolglicano classe A (PIG-A). Essa mutação, resulta em deficiência de glicosilfosfatidilinositol (GPI), estrutura responsável por manter ancoradas às membranas de células, proteínas com funções específicas, incluindo CD55 e CD59, proteínas regulatórias do Complemento (SOCIÉ *et al.*, 2016).

São mutações heterogêneas que foram descritas mais de 180 alterações moleculares do gene em portadores de HPN. A maioria resulta de pequenas inserções ou deleções, levando a erro de leitura o que torna o gene não funcional, com produção nula da enzima por ele codificada. Mutações pontuais também ocorrem, levando à produção de molécula limitada funcionalmente (SOUZA, 2009).

A falha de regulação resulta em lise de células do sangue que se tornaram alvos da ação do Complemento. Hemólise intravascular constante e grave acarreta em hemoglobina livre e depleção de óxido nítrico (NO), que leva a vasoconstrição e

ativação plaquetária (MUÑOZ-LINARES *et al.*, 2014).

Pode manifestar-se em todas as populações do mundo, com prevalência estimada em cerca de 5 por milhão, podendo apresentar-se menos rara no Sudeste Asiático e no Extremo Oriente (KASPER *et al.*, 2016). Análises sugerem que a incidência ocorre no intervalo de cerca de 1,3/ 1.000.000 ao ano, semelhante em ambos os sexos. Dados podem sofrer desvio quanto ao centro de referência e critérios adotados, sendo que as variações geográficas também devem ser consideradas (RISITANO, 2012).

O diagnóstico da HPN tem evoluído ao longo do tempo, em que testes bioquímicos têm sido substituídos pela citometria de fluxo. Por muitos anos o teste de Ham, baseado no princípio de que as células HPN são mais vulneráveis ao soro acidificado, que serve para ativar a via alternativa do Complemento (GAVRIILAKI *et al.*, 2015), foi o meio diagnóstico padrão para identificação de clones HPN em eritrócitos e o teste de lise da sacarose utilizado no rastreamento da HPN. Contudo ambos os testes não são específicos para a doença e deixam de ter utilidade após transfusão. Não possuem sensibilidade adequada para detectar populações mínimas de células HPN ou na avaliação do tamanho real do clone, além de não diferenciar os níveis de deficiência das proteínas ancoradas pelo GPI. Para screening, diagnóstico e monitorização, a imunofenotipagem de eritrócitos e granulócitos por citometria é o método mais adequado de escolha em função de sua alta especificidade e sensibilidade (RODRIGUES, 2011).

A maioria dos pacientes são diagnosticados em sua terceira ou quarta décadas, apesar de existirem relatos de casos que acometeram adolescentes, crianças e idosos (RISITANO, 2012).

Existem várias opções de tratamento para portadores de HPN, sendo que as mais usadas incluem a terapia com anticorpo monoclonal, como eculizumab, um anticorpo monoclonal humanizado que visa estritamente a proteína C5 do Complemento e evita a sua clivagem, bloqueando a atividade hemolítica e progressão da cascata (HILL *et al.*, 2005); Terapias paliativas, que podem aliviar sintomas como transfusões, corticosteroides que melhoram níveis de hemoglobina e reduzem hemólise, apesar de que a longo prazo, a toxicidade e eficácia tornam a terapia limitada (BRODSKY, 2009); e terapia curativa, atualmente a única existente é transplante de medula óssea (TMO), contudo, existem riscos consideráveis com mortalidade associada ao procedimento (OLIVEIRA, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Realizar revisão bibliográfica em bases de dados e bibliotecas científicas, abordando a fisiopatologia, diagnóstico e tratamento de Hemoglobinúria Paroxística Noturna.

2.2 Objetivos específicos

Explorar os mecanismos fisiopatológicos da hemoglobinúria paroxística noturna, aspectos moleculares, sua influência no desenvolvimento da doença e impacto na qualidade de vida de portadores. Explorar os mecanismos das manifestações clínicas, parâmetros laboratoriais e associação com insuficiência medular, insuficiência renal e gravidez. Abordar diagnóstico histórico e atual e medidas de tratamento atualmente disponíveis, assim como perspectivas futuras.

3 METODOLOGIA

Trabalho de revisão bibliográfica descritivo construído por meio de levantamento de dados em livros, artigos de pesquisa e revisões de literatura presentes em bases de dados como Scielo, Pubmed e plataformas de pesquisa como Google Acadêmico. Para a obtenção dos artigos, foram utilizados descritores como: hemoglobinúria paroxística noturna, PIG-A, GPI, sistema Complemento, óxido nítrico, eculizumab, CD55, CD59, insuficiência renal, trombose, entre outros. A seleção foi feita de artigos que se apresentavam disponíveis em português e inglês prioritariamente, em período de abrangência de 1995 a 2018.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Aspectos gerais

Doença rara e adquirida de células tronco hematopoiéticas, Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é caracterizada principalmente por hemólise intravascular permanente e falha da medula. Doença grave cuja anormalidade celular pode gerar um risco de vida, (SOCIE *et al.*, 2016) é consequência de hipersensibilidade mediada pelo Complemento das células eritrocitárias com consequente lise das mesmas (SANTOS, 2013).

Parker e Ware (2008) citam que o artigo publicado por Strübing em 1882, deu reconhecimento a individualidade da doença, dando suporte laboratorial à hipótese básica a respeito de sua etiologia. Posteriormente, Marchiafava e Nazari (1911) e Micheli (1931) descreveram os aspectos clínicos da doença, motivo pelo qual foi denominada anteriormente como “Síndrome de Marchiafava Michelli” (PARKER; WARE, 2008).

Na doença descrita pela primeira vez, Strübing tinha como proposta a hemoglobinúria como consequência da vulnerabilidade de eritrócitos à acidose sistêmica, causada por acúmulo de dióxido de carbono durante o sono. Ham e Dingle em 1939, perceberam que a hemólise dos eritrócitos acontecia quando incubados em soro acidificado, o que levou a introdução do teste de Ham, por muito tempo utilizado como meio diagnóstico. Novas descobertas determinaram que a sensibilidade anormal de eritrócitos era decorrente de lise mediada pelo Complemento, com a revelação da existência da via alternativa (SANTOS, 2013).

Enneking em 1925 introduziu o termo (BRODSKY, 2014), que se refere a destruição eritrocitária com consequente liberação de hemoglobina na urina (hemoglobinúria) e um fenômeno repentino, irregular (paroxística) que é notada principalmente por coloração escura na primeira urina da manhã. O termo “noturna” por sua vez, refere-se a crença inicial de que a acidose durante a noite desencadearia a hemólise. Porém, o fato de que a hemólise ocorre durante todo o dia contrapõe essa ideia. A observação da aparência anormal da urina deve-se ao fato de que há aumento de sua concentração durante o sono, que só será notada pela manhã (ARRUDA *et al.*, 2010).

Doença incomum, acomete ambos os sexos em qualquer idade, porém é mais frequente em adultos. Estima-se uma incidência de 2 a 6 casos por milhão de pessoas ao ano, com idade mediana de 35 anos (GARCIA; FRANCO, 2001). Mesmo não apresentando predisposição familiar ou racial, é observada mais frequentemente em alguns países asiáticos (Tailândia, Japão e Extremo Oriente), com predomínio masculino, enquanto na Europa é recorrente no sexo feminino (ROLDÁN *et al.*, 2003).

Possui sobrevida estimada em 10 a 15 anos após diagnóstico, e portadores podem apresentar desde poucos sintomas até graves incapacitantes (AZAMBUJA, 2013). Existe uma variabilidade na sintomatologia clínica e não havendo tratamento adequado, podem evoluir para uma doença crônica progressiva a qual assim como complicações trombóticas, podem gerar um alto risco de mortalidade (KELLY *et al.*, 2015).

4.2 Fisiopatologia e Aspectos moleculares

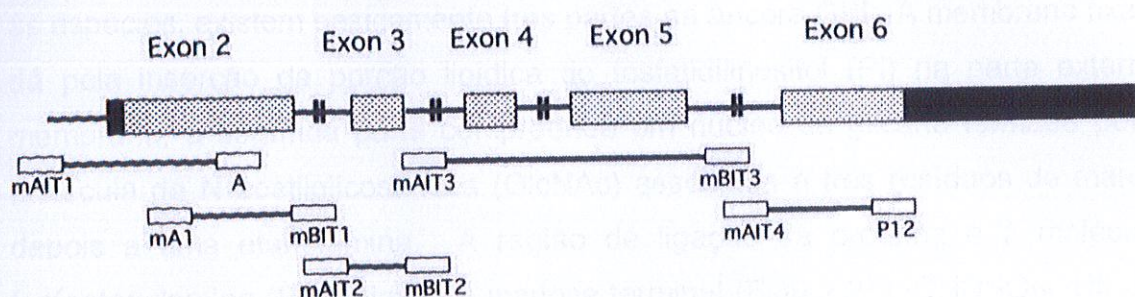
Para a compreensão dos mecanismos da doença, é importante introduzir o conceito de células tronco (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA, 2016). As células-tronco hematopoiéticas são células de origem embrionária, fetal ou do adulto que conseguem se dividir indefinidamente. Ou seja, possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas do sistema imune e do tecido sanguíneo, assim como se autor renovar (JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009). Em outros termos, são elas as encarregadas em dar origem a todas as células sanguíneas, os glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas. Logo, a HPN trata-se de uma doença das células-tronco em que se caracteriza por anemia hemolítica, situação na qual a medula não é capaz de repor glóbulos sanguíneos. As causas para seu surgimento ainda não são totalmente esclarecidas, contudo já se tem por certo a mutação de um dos genes das células-tronco, chamado PIG-A. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA, 2016).

4.2.1 O gene

O gene Fosfatidilinositolglicano classe A (PIG-A) é constituído por 6 éxons, medindo 17 kb no cromossomo X (Xp22.1) (Figura 1) (ROSTI, 2000). Está envolvido na primeira etapa da biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI) juntamente com outras sete proteínas envolvidas no processo. Codifica uma subunidade proteica

fundamental para a atividade da N-acetilglucosaminiltransferase, enzima vital para a síntese de moléculas âncora GPI (BESSLER; HIKEN, 2008). Várias proteínas são ancoradas às células por meio de âncoras GPI e, na ausência dessas moléculas, tais proteínas são degradadas (JOHNSTON *et al.*, 2012).

Figura 1- Representação esquemática do gene PIG-A e primers de PCR



Nota: Os retângulos cinza e preto representam regiões codificantes e não-codificadoras, respectivamente, em 5 éxons do gene PIG-A. Linhas conectando éxons representam íntrons. Primers (retângulos abertos) usados para PCR estão nas áreas correspondentes no gene.

FONTE: (KAI *et al.*, 2002)

Já foram relatadas mais de 100 mutações diferentes de PIG-A em pacientes afetados pela doença as quais estão distribuídas por todo o gene, com maior ocorrência no éxon 2, talvez pelo fato de ser o maior dos éxons do gene. Isso também propõe que este éxon possui domínios importantes para a formação do complexo enzimático. A maioria delas incluem deleções pequenas ou inserções, sendo que grandes deleções foram descritas em alguns quadros (ROSTI, 2000).

Mutações resultam em proteína não funcional, por perda total da função ou podem ser observadas mutações que deixam o produto do PIG-A com atividade residual, cuja atividade seria consequência de perda parcial de proteínas ligadas à GPI nas membranas das células sanguíneas. Todas descritas até o momento correspondem a mutações somáticas (ROSTI, 2000)

4.2.2 Âncora GPI

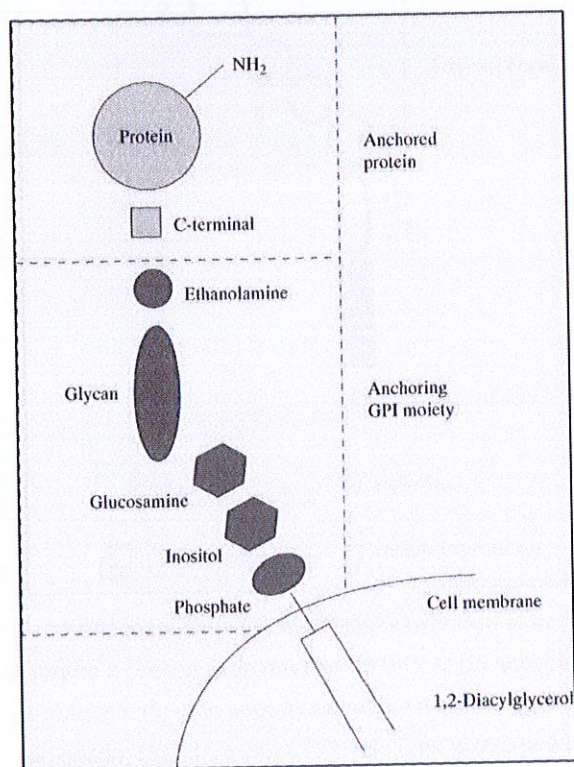
Grande parte das proteínas de superfície celular, são associadas às membranas por intermédio de sequências de aminoácidos hidrofóbicos os quais contemplam a porção lipídica da bicamada. Este domínio transmembrana atinge uma interação estável a qual não é facilmente interrompida sem que destrua a própria membrana. No período de 1980, um método de ligação celular descrito, utilizou-se de

uma molécula de GPI inserida na membrana a qual proteínas foram associadas (JOHNSON; HILLMEN, 2002).

A molécula é responsável por ancorar várias proteínas largamente distribuídas entre proteínas de superfície celular de organismos eucarióticos e altamente preservadas em todas as células dos mesmos (BESSLER; HIKEN, 2008). Em todas as espécies, existem basicamente três partes na âncora GPI: A membrana fixada se dá pela inserção da porção lipídica do fosfatidilinositol (PI) na parte externa da membrana; a segunda parte compreende um núcleo de glicano formado por uma molécula de N acetilglicosamina (GlcNAc) associada à três resíduos de manose e depois a uma etanolamina. A região de ligação da proteína é à molécula de fosfoetanolamina (FOS) ligada à manose terminal (Figura 2) (JOHNSON; HILLMEN, 2002).

Localizada na membrana celular, a proteína atua como suporte ou "âncora" para outras proteínas protetoras de membrana (GARCIA; FRANCO, 2001).

Figura 2- Diagrama simplificado da estrutura GPI

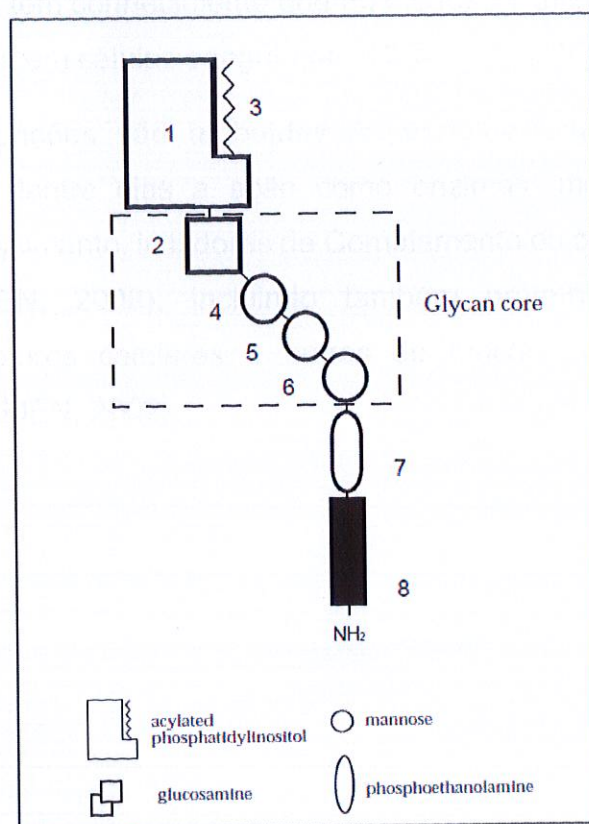


Nota: O C-terminal da proteína ancorada liga-se a um resíduo de etanolamina na âncora GPI. A âncora em si consiste nesta porção de etanolamina ligada a um núcleo de glicano, que é formado por uma molécula de GlcNAc ligada a três resíduos de manose. A estrutura GPI liga-se à membrana celular através de PI.

Fonte: (JOHNSON; HILLMEN, 2002)

A biossíntese de GPI acontece no retículo endoplasmático rugoso (REG) (Figura 3). Não se tem ao certo ainda, o local preciso de cada reação. Enquanto algumas das etapas ocorrem na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático (RE), outras ocorrem dentro do espaço da cisterna. O primeiro passo consiste em adição de uma molécula de GlcNAc a um resíduo de PI. Segue-se então uma série de três manosições utilizando dolicol-fosfato-manose como doador. A etanolamina é adicionada a cada um desses açúcares. A transamidação da proteína a qual foi sintetizada, leva à sua ligação à molécula FOS na manose terminal e, por fim, o complexo de proteína-GPI é transportado para a superfície externa da célula (JOHNSON; HILLMEN, 2002).

Figura 3- Estrutura e biossíntese da molécula GPI



Nota: (1) molécula de fosfatidilinositol (PI); (2) N-acetilglucosamina é transferida para inositol * e o produto é desacetilado. Este passo requer a presença do produto do PIG-A; (3) acilação de inositol; (4) uma primeira manose é doada de dolicol-fosfato-manose; (5) uma segunda manose é adicionada; (6) uma terceira manose é adicionada; (7) fosfoetanolamina é adicionada; (8) o terminal COOH de uma proteína é então ligado à etanolamina.

Fonte: (ROSTI, 2000)

Foi observado que em todas as células HPN o defeito ocorria na primeira etapa de síntese de GPI quando a N- acetilglucosamina é transferida para o PI (BESSLER; HIKEN, 2008).

4.2.3 Fisiopatologia

Com os anos, se observa um aumento no número de antígenos de superfície celular que se encontram deficientes em células HPN. Foi sugerido inicialmente em 1980, que alguns antígenos estivessem retidos na membrana através de uma estrutura glicolípídica, e posteriormente foi definida a estrutura da âncora GPI (HILLMEN; RICHARDS, 2000). A característica notável das células HPN é que tais apresentam uma deficiência em todas as proteínas de superfície que são ancoradas pela molécula. Se tem conhecimento que ao menos 27 diferentes proteínas ligadas a GPI são expressas em células sanguíneas (BESSLER; HIKEN, 2008).

Diversas funções são atribuídas às proteínas ligadas a GPI em células hematopoiéticas, dentre elas a ação como enzimas, moléculas acessórias para receptores de crescimento, inibidores de Complemento ou como moléculas de adesão (BESSLER; HIKEN, 2008), incluindo também proteínas antígenos de grupo sanguíneo, receptores celulares e outros de função desconhecida (Tabela 1) (JOHNSON; HILLMEN, 2002).

Tabela 1- Algumas proteínas ancoradas por moléculas GPI expressas por células hematopoiéticas

<i>Antígeno</i>	<i>Função</i>	<i>Distribuição celular</i>
CD14	Receptor de endotoxina	Monócitos – forte expressão; Granulócitos - expressão parcial e fraca
CD16	Receptor Fc de baixa afinidade (FcγRIII)	Neutrófilos células NK (Natural Killer) células T (parcial)
CD24	Adesão celular; ativação e diferenciação de linfócitos B	Neutrófilos e linfócitos B
CD48	Ativação e adesão celular	Linfócitos e monócitos
CD52	Desconhecida	Linfócitos e monócitos
CD55	Regulação do Complemento (limita a formação das convertases de C3)	Leucócitos, eritrócitos e plaquetas
CD58	Molécula ligante de CD2; sinal coestimulatório em respostas imunes	Leucócitos, eritrócitos e plaquetas
CD59	Inibição da formação do complexo de ataque à membrana; Proteção das células da lise mediada pelo Complemento; sinalizador celular na ativação de células T	Leucócitos, eritrócitos e plaquetas
CD66b	Adesão e ativação celular	Neutrófilos
CD87	Receptor do ativador do plasminogênio tipo-uroquinase	Monócitos, neutrófilos, células T ativadas e células NK
CD90	Ativação de células T; adesão celular	Células progenitoras e células T (parcial)
CD109	Desconhecida	Células T ativadas, plaquetas, megacariócitos e células progenitoras (parcial)
CD157	Ecto-enzima; suporte ao crescimento de células B; adesão e migração de monócitos e granulócitos	Células estromais medulares, monócitos e granulócitos

Fonte: Modificado de (ROCHA, 2013)

l) Sistema Complemento

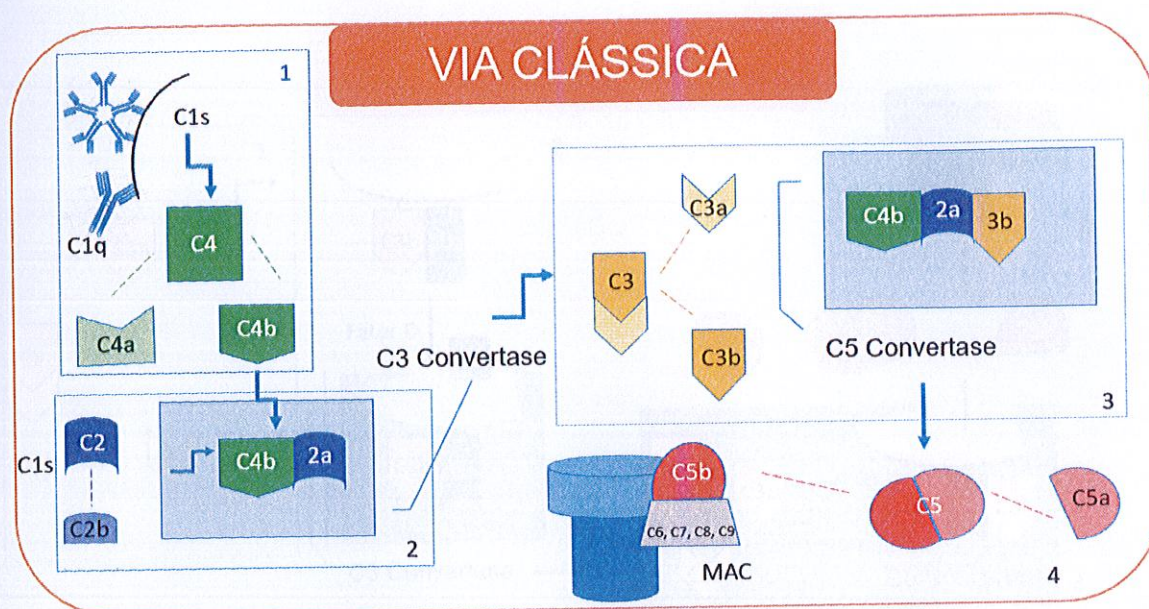
O Sistema Complemento é formado por uma série de proteínas que, embora não exclusivamente, são principalmente em sua maioria sintetizadas no fígado, presentes no plasma e nas superfícies celulares como precursores inativos (NESARGIKAR; SPILLER; CHAVEZ, 2012). Cerca de 30 proteínas envolvidas no processo agem conjuntamente para promover inflamação e dano direto à microrganismos, células e tecidos dados como anormais por um anticorpo específico (PICCOLI *et al.*, 2011).

A principal função atribuída é a proteção do hospedeiro contra infecção / inflamação na defesa contra patógenos (bactérias, células infectadas por vírus e parasitas) por meio de recrutamento (quimiotaxia) e aumento da fagocitose por células imunes inatas (opsonização), levando à lise das células-alvo (NESARGIKAR; SPILLER; CHAVEZ, 2012).

Via Clássica

A via clássica do Complemento é desencadeada por um anticorpo ligado a um antígeno-alvo, ou seja, é iniciada através da interação do componente C1q do Complemento, a primeira proteína da cascata, aos domínios da fração constante (Fc) das imunoglobulinas IgM ou IgG complexadas ao antígeno. A ligação leva à ativação enzimática do C1r associado, que leva a clivagem e ativação de C1s. Este ativado, cliva proteína C4 e C2 gerando C4b e C2a respectivamente, que associados formam C4b2a, a C3 convertase a qual cliva C3 em dois fragmentos (C3a e C3b). Enquanto C3a age recrutando células inflamatórias, algumas moléculas de C3b se liga à convertase formando outro complexo a C5 convertase (C4b2a3b). Essa convertase, cliva C5 iniciando as etapas terminais de ativação do Complemento com a formação do MAC (Membrane Attack Complex), o qual se insere na bicamada fosfolipídica criando poros os quais interferem na propriedade de permeabilidade seletiva permitindo entrada de água, íons, levando a lise celular (Figura 4) (NESARGIKAR; SPILLER; CHAVEZ, 2012).

Figura 4 – Via clássica de ativação do Complemento

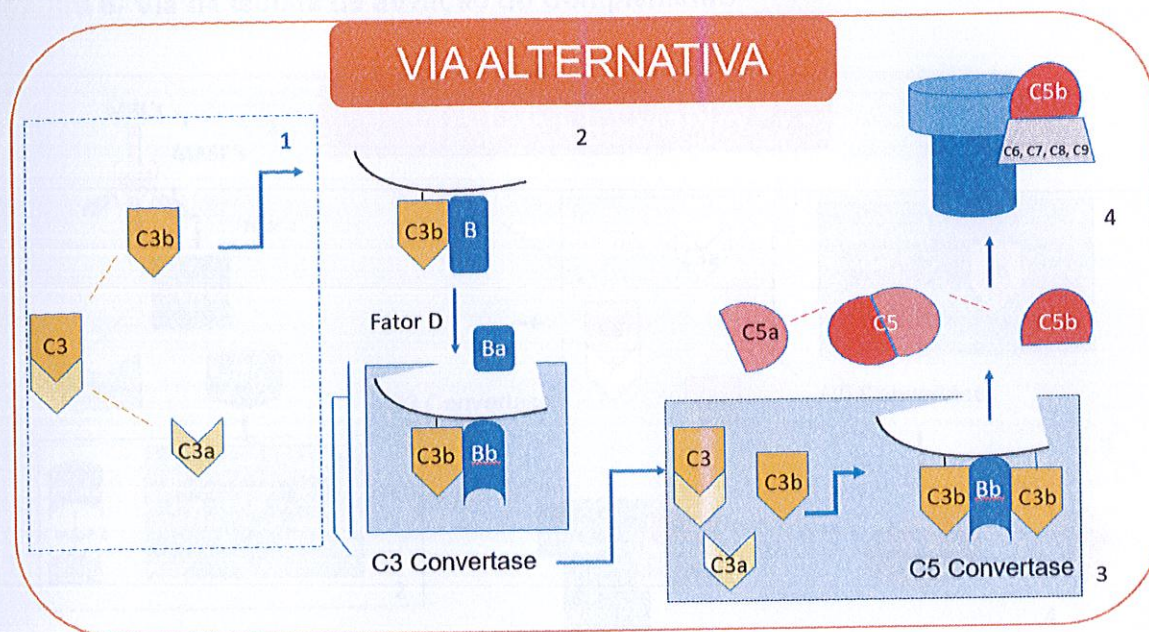


Nota: (1) Ativação de C1s cliva proteína C4 e C2; (2) C4b e C2a associados formam C3 convertase; (3) C3 convertase cliva C3 em dois fragmentos, em que C3b se associa a convertase formando C5 convertase; (4) C5 convertase cliva C5 dando início as etapas terminais de ativação com formação do MAC.

Via Alternativa

Diferentemente das vias clássica e da lectina, a via alternativa é capaz de se auto ativar, ou seja, é ativada espontaneamente e constantemente na membrana celular, na ausência de anticorpo. Normalmente, o C3 é continuamente clivado no plasma a uma taxa baixa gerando C3b que pode se ligar à superfície de células onde é capaz de ligar-se ao fator B. Uma vez associado, o próprio fator B altera a conformação e é então clivado pelo fator D, uma serinoprotease plasmática, liberando um fragmento Ba e gerando um fragmento Bb que permanece associado ao complexo (C3bBb) chamado C3 convertase. Este, por meio do seu próprio domínio de serina protease, cliva moléculas C3 adicionais estabelecendo uma sequência de amplificação, gerando C3b. Uma vez formado, algumas moléculas C3b ligam-se à própria convertase resultando em um complexo denominado C5 convertase (C3bBbC3b), a qual cliva C5 iniciando as etapas de ativação da via terminal do Complemento. Devido a capacidade de ativação espontânea, a via alternativa requer controle ativo contínuo (Figura 5) (THURMAN; HOLERS, 2006).

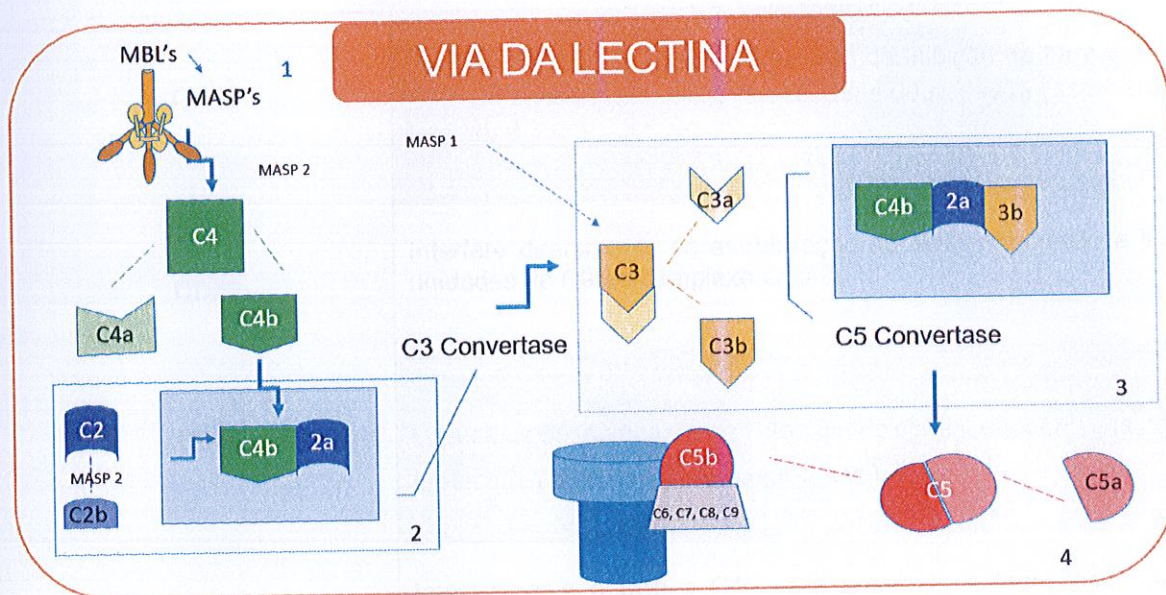
Figura 5- Via alternativa de ativação do Complemento



Via da Lectina

A via da lectina envolve o reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de microrganismos pelas lectinas de ligação à manose (MBLs) e ficolinas sempre na ausência de anticorpo. Estas promovem ativação subsequente de enzimas associadas, as serinoproteases associadas à MBL (MASPs). Dessa forma, a ligação das moléculas de reconhecimento aos carboidratos microbianos, ativa os MASPs (MASP-1, MASP-2, MASP-3) os quais são exclusivos da via da lectina. MASP's são estruturalmente homólogos às proteases C1r e C1s com função similar, ou seja, o MASP-2 é o componente enzimático que assim como o C1s da via clássica, é responsável por clivar os componentes do Complemento C4 e C2 para formar C3 convertase. Eventos subsequentes nesta via, são idênticos aos que ocorrem na via clássica. Da mesma forma, MASP-1 é capaz de clivar C3 diretamente, culminando com ativação da via alternativa (Figura 6) (FUJITA; MATSUSHITA; ENDO, 2004).

Figura 6- Via da lectina de ativação do Complemento



Embora reconhecido pelo seu importante papel muito eficiente na defesa contra patógenos, também tem sido alvo de atenção de pesquisadores devido seu potencial de danos às células do próprio organismo (PICCOLI et al., 2011). Isso é provocado pela ausência de uma ou mais proteínas de defesa do Complemento da superfície de células, como glóbulos vermelhos, levando à ativação inadequada e sem oposição do Complemento (JOHNSON; HILLMEN, 2002).

II) Proteínas regulatórias

Células normais possuem um sistema regulador na membrana celular formado por proteínas, a fim de prevenir lesões mediadas pelo Complemento. Tais proteínas são divididas em duas grandes classes: solúveis nos líquidos biológicos e ancoradas à membrana celular, que incluem CD55, CD59, CD46 e CD35, sendo as principais em questão, o CD55 e CD59. Proteínas ancoradas a membrana celular, são capazes de controlar as três vias de ativação do Complemento, enquanto as solúveis são mais específicas, controlando apenas umas das três vias, agindo quase que exclusivamente sobre C3 ou C4 (PICCOLI et al., 2011). Os principais mecanismos de ação estão resumidos na tabela 2.

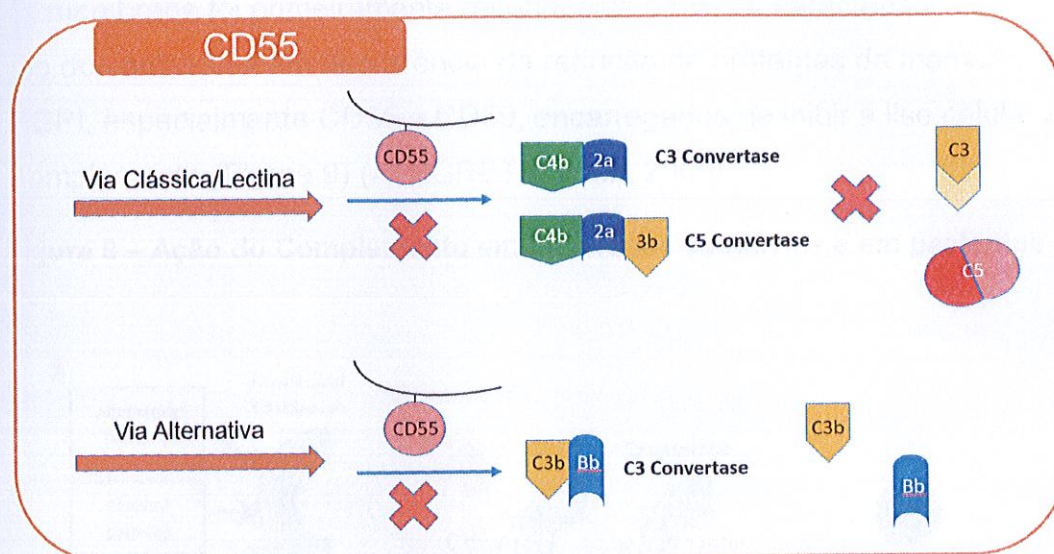
Tabela 2- Principais funções inibidoras das proteínas reguladoras do complemento

Proteína	Função regulatória
CD55	Impede clivagem de C3 e C5 através da inibição da formação de novas C3 e C5 convertases, além de acelerar a degradação destas enzimas pré-formadas.
CD59	Interfere diretamente na estruturação do MAC impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8.
CD46	Liga-se às opsoninas C3b e C4b, agindo como cofator na sua degradação proteolítica através da serina-protease fator I.
CD35	Interage com o C3b e C4b para promover a fagocitose mediada por neutrófilos. Atua como cofator para inativar o C3b e o C4b a iC3b e iC4b através do fator I.

Fonte: Modificado de (PICCOLI *et al.*, 2011)

O CD55, fator acelerador de degradação (DAF-Decay Accelerating Factor), trata-se de uma glicoproteína globular expressa em diferentes tipos celulares, que está ancorada à membrana celular por meio de uma molécula GPI a qual atua inibindo a formação de novas C3 e C5 convertases, o que previne clivagem de C3 e C5, acelerando também a degradação dessas enzimas pré-formadas (Figura 7). É detectado de forma solúvel no plasma, lágrima, saliva, urina, líquido sinovial e líquido (ALEGRETTI *et al.*, 2009).

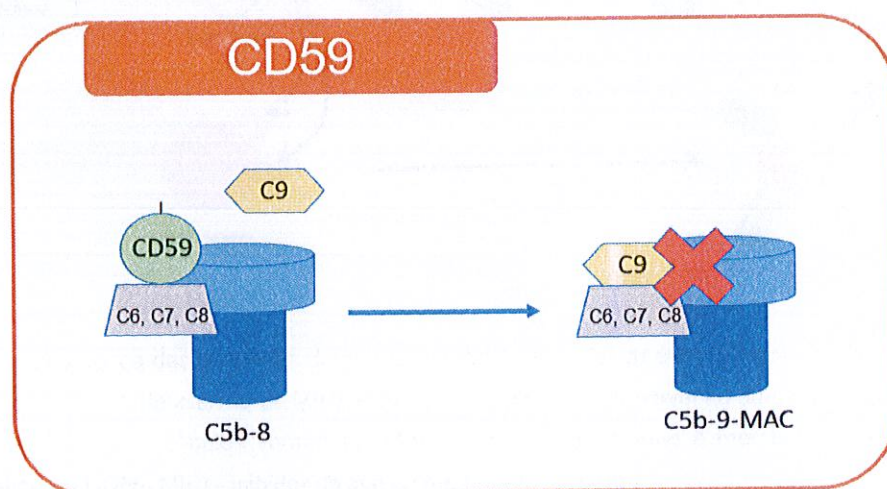
Figura 7 – Mecanismo de ação de CD55



Nota: CD55 inibe formação de novas C3 e C5 convertases da via alternativa (C3bBb) promovendo dissociação do Bb e da via clássica e da via das lectinas (C4bC2a), impedindo clivagem de C3 e C5.

O inibidor da lise de membrana (MIRL- Membrane Inhibitor of Reactive Lysis) ou CD59, é uma glicoproteína globular pequena, assim como a CD55 também é ancorada por GPI e é largamente expressa na maioria dos tecidos e em todas as células circulantes. Trata-se do único regulador de membrana que interfere diretamente na formação estrutural do MAC, através de sua incorporação física ao complexo em formação, o que impede a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8 (Figura 8) (ALEGRETTI *et al.*, 2009).

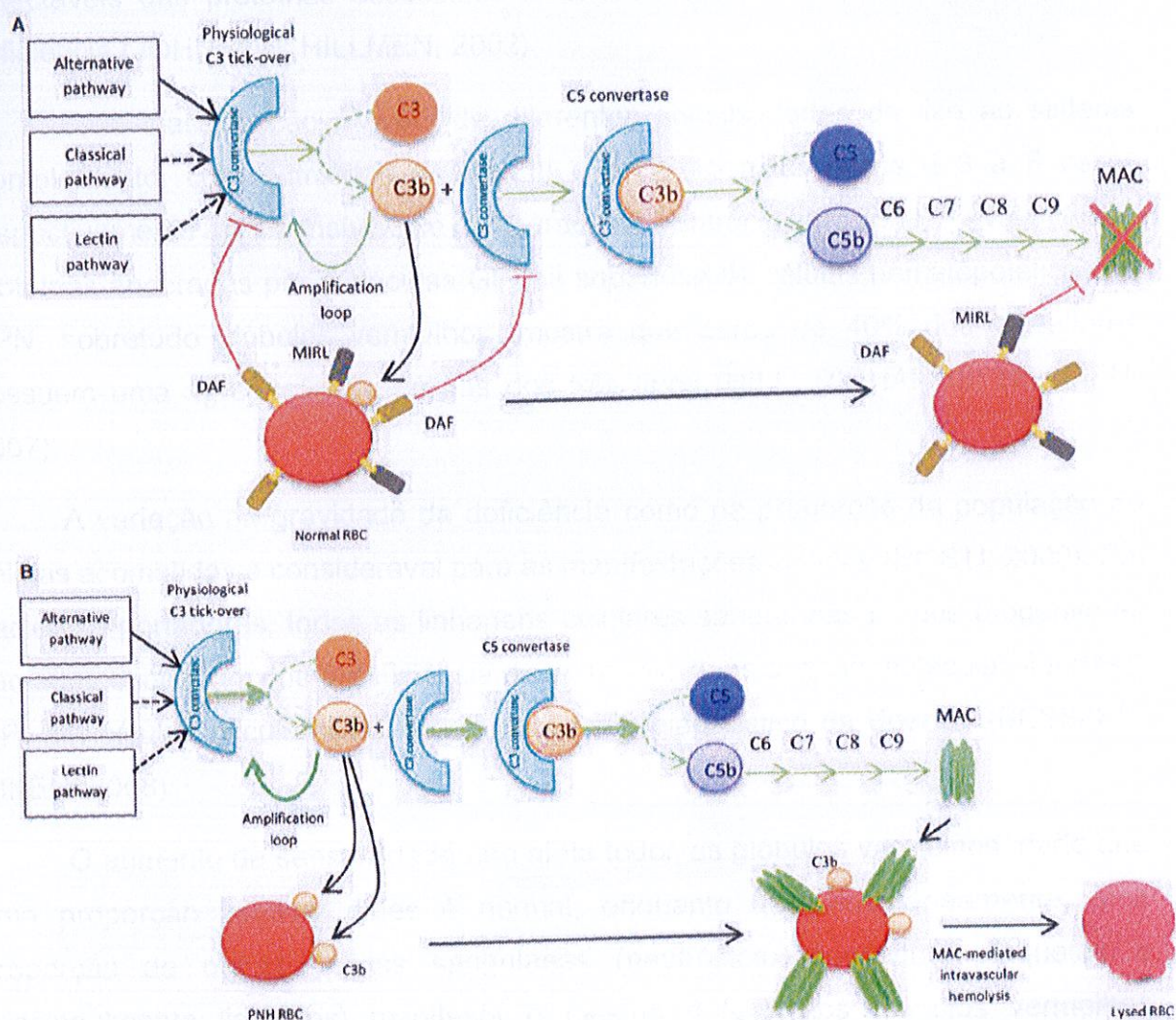
Figura 8 – Mecanismo de ação de CD59



Nota: CD59 inibe formação do MAC (C5b-9) por meio de sua inserção durante a formação estrutural dos componentes impedindo ligação de unidades de C9 ao complexo C5b-8.

A consequência patológica da deficiência desses reguladores do Complemento na membrana foi primeiramente reconhecida na HPN, caracterizada pelo aumento de lise dos eritrócitos em decorrência da redução de proteínas de membrana ancoradas à GPI, especialmente CD55 e CD59, encarregados de inibir a lise celular autóloga do Complemento (Figura 9) (ALEGRETTI *et al.*, 2009).

Figura 9 – Ação do Complemento em indivíduos saudáveis e em pacientes com HPN



Nota: (A) A presença das proteínas de membrana MIRL e DAF, um eritrócito normal é protegido da ativação do Complemento. (B) A deficiência de MIRL e DAF torna o eritrócito sensível ao ataque do Complemento, resultando em hemólise. RBC - glóbulos vermelhos; MAC- complexo de ataque à membrana; DAF- fator acelerador de degradação ou CD55; MIRL- inibidor da lise de membrana ou CD59.

Fonte: (DEVALET *et al.*, 2015)

Um fator agravante na análise do fenótipo de superfície na HPN é a possibilidade de alguns pacientes sintetizarem pouca quantidade de âncora GPI, o que aparenta gerar uma competição entre as proteínas por esse resíduo, resultando em expressão parcial de algumas moléculas enquanto completa ausência de outras. Essa condição é melhor observada em glóbulos vermelhos que são separados em três tipos através da citometria de fluxo. Células do tipo I correspondem as normais em relação a expressão de superfície, tipo II apresentam quantidades reduzidas, mas detectáveis das proteínas associadas à GPI e as células tipo III com completa deficiência (JOHNSON; HILLMEN, 2002).

Essa classificação provém de diferentes sensibilidades de lise ao sistema Complemento, com eritrócitos do tipo III e II de 15 a 25 vezes e 3 a 5 vezes respectivamente mais sensíveis se comparado aos eritrócitos do tipo I. A avaliação de proteínas ancoradas por moléculas GPI na superfície de células hematopoiéticas na HPN, sobretudo glóbulos vermelhos, mostra que cerca de 40% dos portadores possuem uma agregação de células dos três tipos (HILL; RICHARDS; HILLMEN, 2007).

A variação na gravidade da deficiência como na proporção da população de células acometidas é considerável para as manifestações clínicas (ROSTI, 2000). Em pacientes portadores, todas as linhagens celulares sanguíneas e seus progenitores são acometidos, em que a deficiência de ao menos duas dessas moléculas ligadas a GPI em células circulantes é suficiente para o diagnóstico da doença (BESSLER; HIKEN, 2008).

O aumento da sensibilidade não afeta todos os glóbulos vermelhos, dado que uma proporção variável deles é normal, enquanto que simultaneamente, uma proporção de outras células sanguíneas (neutrófilos, monócitos, plaquetas e ocasionalmente linfócitos) manifesta o mesmo defeito dos glóbulos vermelhos anormais (ROSTI, 2000).

Plaquetas de pacientes portadores também possuem deficiência de proteínas ancoradas por GPI e essa ausência de CD59, assim como ocorre com eritrócitos, tornam-nas sensibilizadas ao ataque do Complemento. Neste momento, as plaquetas sofrem mudanças na forma que levam à liberação de MAC em vesícula ou micropartículas as quais são pró-coagulantes *in vitro* e podem ser observadas em

níveis aumentados em casos de HPN. Logo, a consequência grave dessa deficiência é a formação de trombina e elevado risco para desenvolvimento de trombose (HILL *et al.*, 2006).

As proteínas reguladoras do Complemento CD46, CD55 e CD59 são expressas tanto em células linfoides como também nas células não linfoides humanas. Estas foram expressas em todos os subgrupos de leucócitos isolados e analisados em estudo, alguns apresentando diferenças significativas do nível de expressão. Esses níveis se mostraram mais altos de CD59 em neutrófilos do que em monócitos, enquanto que a expressão de CD55 foi observado em proporção contrária nessas células. Isso revela que a expressão dessas proteínas não se apresenta de forma coordenada ou uniforme nos subgrupos. Sabe-se que as proteínas reguladoras do Complemento são expressas em diversos tipos celulares podendo atuar como receptores para patógenos microbianos, ou seja, qualquer alteração nos níveis das proteínas em diferentes subgrupos de leucócitos, pode resultar em alteração de função imunorregulatória e susceptibilidade à infecções em níveis diferentes, assim como danos provocados pelo Complemento. Na HPN, portanto, podem ser observados níveis reduzidos de CD59 em todos os subgrupos de linfócitos, monócitos e neutrófilos, além dos eritrócitos já citados (CHRISTMAS *et al.*, 2006).

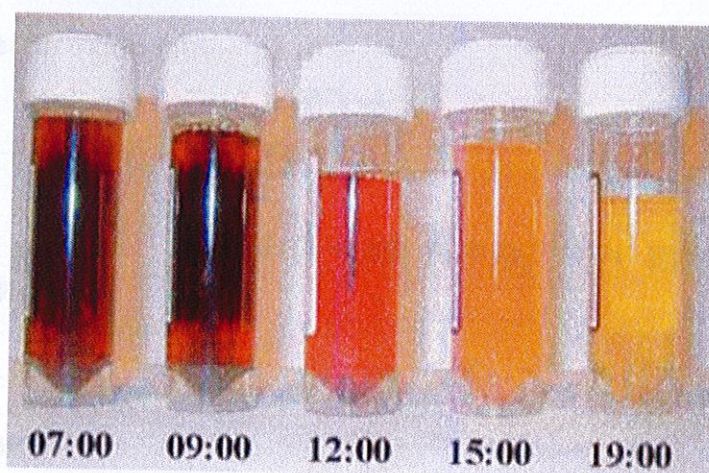
4.3. Manifestações clínicas

Em 1953, no mínimo 162 casos foram apurados e alguns não diagnosticados, já que os sinais e sintomas característicos que se observam frequentemente podem não se manifestar. Os aspectos clínicos apresentados pelos pacientes podem variar, e podem levar anos entre o início dos sintomas e o diagnóstico preciso, uma vez que não é raro portadores não apresentarem o sintoma mais reconhecido da doença. Diante disso, pode-se afirmar que o termo “hemoglobinúria paroxística” apesar de aplicado devido uso popular como parte característica da HPN, é inexato, uma vez que caracteriza apenas uma manifestação da doença presente em somente um quarto dos indivíduos portadores (PARKER; WARE, 2008).

4.3.1. Hemólise intravascular

Uma hemólise intravascular crônica pode provocar sintomas e manifestações variadas em pacientes com HPN, dentre elas anemia com necessidade de transfusão (para sustentar os níveis de hemoglobina), fadiga, urina escura e hemoglobinúria que, mesmo se apresentando como uma manifestação própria e característica da HPN, está presente em apenas 26% dos pacientes (Figura 10) (AZAMBUJA, 2013).

Figura 10 – Amostras de urina colhidas ao longo do dia de paciente com HPN



Fonte: (LIU, 2017)

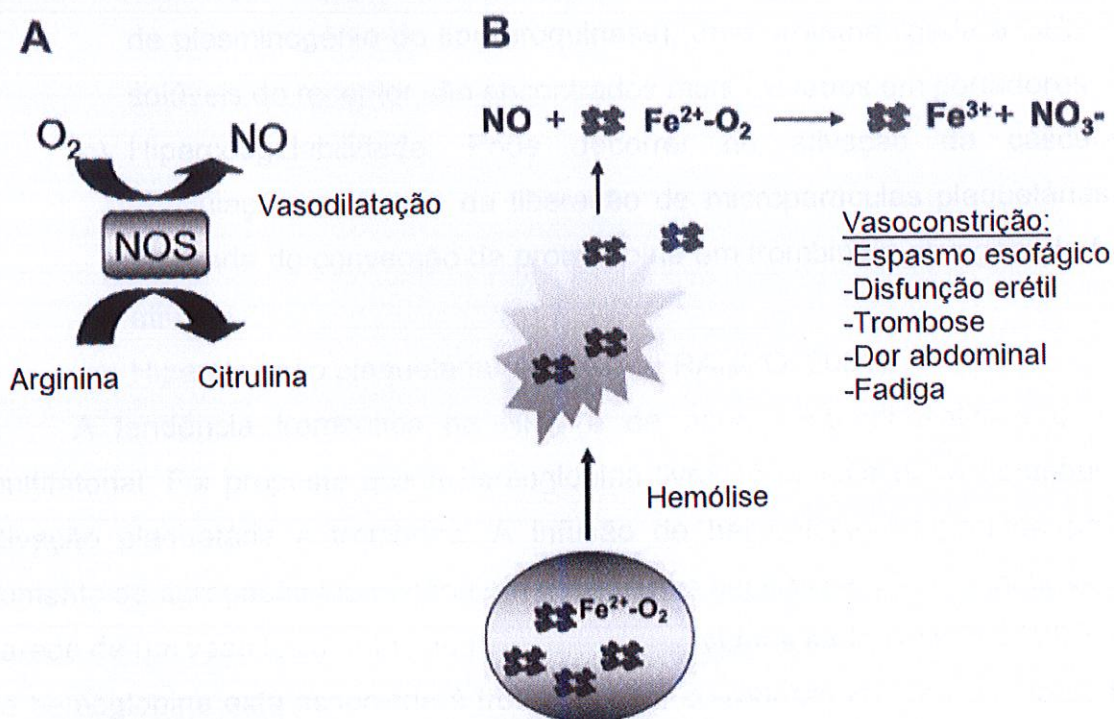
A anemia hemolítica é decorrente de hemólise intravascular mediada por Complemento, a qual resulta também em lactato desidrogenase (LDH) elevada, contagem elevada de reticulócitos, hiperbilirrubinemia indireta e baixa haptoglobina. A perda crônica de hemoglobina na urina pode levar à anemia por deficiência de ferro. A lise dos eritrócitos libera hemoglobina no plasma, onde se liga à haptoglobina - o que justifica os níveis baixos ou indetectáveis dessa molécula. Quando não é mais possível se ligar à molécula, níveis podem ser detectados no plasma (VEERREDDY, 2013).

A hemoglobina livre possui muita afinidade pelo óxido nítrico (NO), o que promove sua retirada da circulação e isso pode causar distonia de músculo liso, como também ativação e agregação plaquetária. Logo, essa perda de NO dos tecidos é manifestada por fadiga severa, forte dor abdominal, espasmo esofagiano, disfagia, impotência sexual masculina e possibilidade de desenvolvimento de trombose

(AZAMBUJA, 2013). Tais sintomas resultantes de uma hemólise contínua possuem grande impacto no bem-estar e qualidade de vida do paciente (HILL, 2012).

Verreddy (2013) em seu estudo faz menção ao trabalho de Rother e Hillmen *et al*, relatando o papel da perda do NO nas manifestações clínicas da HPN descrevendo sua atividade no sistema vascular. Este, participa da vasodilatação e hemostasia vascular. No estudo, descreveram o papel do excesso de hemoglobina livre como um eliminador de NO, convertendo-o em nitrato (Figura 11). Também foi descrita a ação da arginase eritrocitária (liberada da lise de hemácias) na diminuição da síntese de NO pela degradação do substrato L-arginina (VEERREDDY, 2013).

Figura 11- O papel do óxido nítrico na HPN



Fonte: (CONITEC, 2018)

4.3.2. Trombose

Complicações trombóticas e pancitopenia progressiva são as principais causas de morte. Esporadicamente ocorre remissão espontânea ou transformação para leucemia mieloide aguda, em 10% e 5% dos casos respectivamente (GARCIA; FRANCO, 2001).

A trombose venosa é a consequência mais temida da doença, acometendo cerca de 50% dos pacientes com doença hemolítica, havendo predileção pelas veias intra-abdominais e cerebrais e considerada a causa de morte em pelo menos um terço. O risco é maior em pacientes da Europa e dos EUA do que em pacientes do Extremo Oriente. Foi observado também, que parece existir um risco maior em pacientes afro-americanos ou latino-americanos, talvez devido pacientes de diferentes grupos étnicos possuírem diferentes traços pró-trombóticos hereditários (HILL; RICHARDS; HILLMEN, 2007).

Embora pouco conhecida a patogênese dos eventos trombóticos na doença, estudos se concentram, nos seguintes possíveis mecanismos:

- a) interferência na fibrinólise: redução na fibrinólise pode ser decorrente de diminuição na membrana celular do receptor u-PAR (receptor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase), uma proteína ligada à GPI. Níveis solúveis do receptor são encontrados mais elevados em portadores.
- b) Hipercoagulabilidade: Pode decorrer de ativação da cascata da coagulação, por meio da liberação de micropartículas plaquetárias com atividade de conversão da protrombina em trombina e clivagem do fator X ativado.
- c) Hiperativação plaquetária (GARCIA; FRANCO, 2001).

A tendência trombótica na HPN é de pouco entendimento, e pode ser multifatorial. Foi proposto que a hemoglobina livre no plasma pode contribuir para ativação plaquetária e trombose. A infusão de hemoglobina reticulada promove aumento de agregação plaquetária e a adesão nas superfícies pró-trombóticas, como parede de um vaso lesionado, além de que em indivíduos saudáveis, a administração de hemoglobina está associada à tromboflebite, corroborando que o heme pode ser causador de inflamação vascular seguida de obstrução. O efeito da hemoglobina na função plaquetária é possivelmente através da retirada de NO. Este, atua inibindo agregação plaquetária, induzindo a desagregação das plaquetas agregadas e inibe também essa agregação aumentando níveis de cGMP (Monofosfato cíclico de guanosina). Logo, como já mencionado, a eliminação de NO pela hemoglobina ou redução de sua síntese por inibição do metabolismo da arginina, resulta em aumento na agregação de plaquetas. O NO também interage com componentes da cascata de coagulação, regulando negativamente formação de coágulo (HILL; RICHARDS; HILLMEN, 2007).

Há evidências, que plaquetas deficientes em GPI são mais facilmente ativadas pelo Complemento se comparado às normais. Esta tendência, também pode resultar da deficiência de CD59, que as tornam mais suscetíveis ao ataque. A ativação do Complemento na superfície das plaquetas leva ao aumento da exovesiculação, que expõe o fosfolipídio como um local para a geração de trombina (JOHNSON; HILLMEN, 2002).

4.3.3. Achados Laboratoriais- Sangue

Pacientes com HPN costumam apresentar anemia, e em muitos casos, grave. Eritrócitos são geralmente normocíticos, porém a média do volume corpuscular médio (VCM) pode variar entre pacientes. Se há considerável perda de ferro na urina, os eritrócitos podem aparecer hipocrômicos e microcíticos. Esferócitos e outras formas de células vermelhas anormais não são observadas, contudo em determinadas circunstâncias fragmentos de glóbulos vermelhos podem ser observados, os quais podem indicar uma coagulopatia intravascular (PARKER; WARE, 2008).

A morfologia da linhagem eritróide pode ser normal ou pode ser observada determinado grau de macrocitose ligeira, com poiquilocitose e anisocitose de leve a moderada (MARTINS, 2014) e comum a presença de policromasia decorrente de reticulócitos (AZEVEDO, 2014). A contagem de reticulócitos depende da função medular do paciente e, como resultado, o grau de anemia também depende dessa mesma função junto de outras condições (MARTINS, 2014).

Policromatofilia pode estar presente e normoblastos podem ser encontrados no sangue periférico. A fragilidade osmótica e mecânica dos eritrócitos é normal e a reação ao Teste de Antiglobulina Direta (TAD) é negativa. Leucopenia pode estar presente, como resultado de hematopoese anormal; O conteúdo de fosfatase alcalina de neutrófilos é baixo ou ausente. Trombocitopenia de moderada a severa é comum, mas a vida plaquetária e função geralmente são normais (PARKER; WARE, 2008).

No sangue periférico podem ser encontrados clones diferentes de células HPN em um mesmo paciente, ou seja, pode ser detectado conjunto normal de eritrócitos junto com eritrócitos anormais (VEERREDDY, 2013).

4.3.4. Achados Laboratoriais- Plasma

O plasma pode ser marrom dourado, resultado de presença de níveis elevados

de bilirrubina não conjugada, hemoglobina e metilemalbumina. A concentração sérica de haptoglobina é baixa e a concentração de LDH é elevada, refletindo a hemólise intravascular crônica (PARKER; WARE, 2008).

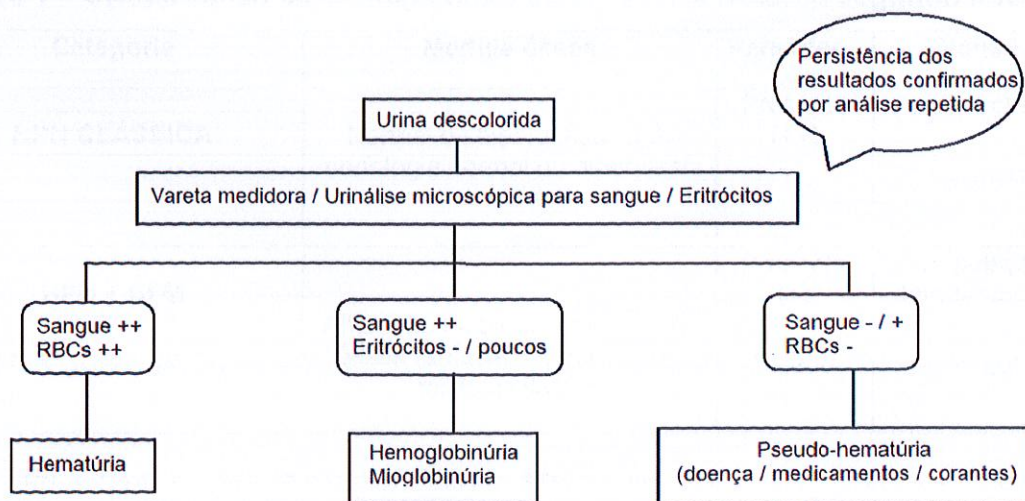
4.3.5. Achados Laboratoriais- Medula

A hiperplasia normoblástica é o achado característico. Até 50% das células nucleadas podem ser normoblastos, ocasionalmente são observadas alterações megaloblásticas. O número de megacariócitos pode estar diminuído. Quando a pancitopenia é evidente, pode ser observada uma medula hipoplásica (PARKER; WARE, 2008).

4.3.6 Achados Laboratoriais- Urina

A urina de coloração escura é uma causa comum de procura médica e encaminhamento para urologistas a qual pode ser decorrente de variadas condições. O termo "hematúria" é frequentemente usado para descrever a urina escura. Geralmente, outras causas de urina escurecida são diagnosticadas de forma errada como hematúria. Tais causas podem ser classificadas em: hematúria, hemoglobinúria, mioglobinúria e pseudo-hematúria. Em casos de hemoglobinúria e mioglobinúria a diferenciação da hematúria pode ser dificultada. O diagrama a seguir mostra as causas da urina descolorida dividida em três grupos com base no exame de urina (Figura 12) (VEERREDDY, 2013):

Figura 12 - Visão geral e classificação da urina descolorida com base no exame de urina



Fonte: (VEERREDDY, 2013).

A presença de sangue no teste com vareta de medição e presença de um número proporcional de hemácias na urinálise microscópica são indicativos de hematúria. Caso o sangue seja detectável com poucas ou ausência de hemácias microscopicamente visíveis, a presença de pigmento é sugestiva de hemoglobina ou mioglobina presentes na urina. Outras causas, observadas em casos de ingestão de determinados medicamentos, corantes, nota-se presença ou ausência de sangue, sem hemácias. Vale notar, que em centrifugação de amostras de urina, o sedimento fica vermelho em hematúria enquanto o sobrenadante fica vermelho em hemoglobinúria, mioglobinúria ou pseudo-hematúria. Detectada a presença de pigmento na amostra de urina, a diferenciação do tipo pode ser feita usando teste de sulfato de amônio. A mistura deste com a amostra de urina é centrifugada, onde o sulfato precipita hemoglobina, mas não mioglobina. Logo, se o sobrenadante é claro, o pigmento é hemoglobina. Alternativamente, esta pode ser detectada por espectrofotometria (VEERREDDY, 2013).

4.4. Classificação

Na tentativa de padronizar a classificação e o diagnóstico clínico-laboratorial da doença, em 2005 o IPIG (International PNH Interest Group), grupo internacional para o estudo da HPN, apresentou critérios que aplicam a presença de alteração na biópsia medular (aplasia, hipoplasia ou mielodisplasia) e o diagnóstico clínico documentado de hemólise e/ou trombose. Nessa perspectiva, três grupos foram definidos de acordo com o quadro 1:

Quadro 1 – Classificação da Hemoglobinúria Paroxística Noturna segundo IPIG

Categoria	Medula óssea	Hemólise	Clone HPN*
HPN CLÁSSICA	Normal ou hiper celular com morfologia normal ou hiperplasia eritróide	Presente (++)	Geralmente grande
HPN + SFM	Alteração na biópsia de medula óssea (aplasia, hipoplasia ou mielodisplasia).	Presente (+)	População de tamanho variável
HPN SUBCLÍNICA		Ausente (-)	Pequena

Siglas: HPN = Hemoglobinúria Paroxística Noturna; SFM = Síndrome de falência medular. * Clone HPN: percentagem varia entre os estudos.

Fonte: Modificado de (AZAMBUJA, 2013)

Pacientes cuja classificação se enquadra em HPN clássica, possuem indícios clínicos de hemólise intravascular crônica na forma de reticulocitose, LDH sérica elevada e bilirrubina indireta (RAO *et al.*, 2018). Aspectos laboratoriais podem evidenciar anemia com nível de hemoglobina <12 g / dL, hemoglobinúria, icterícia e sintomas gerais como fadiga e mal-estar. Na forma clássica, pode não ser encontrado falha da medula óssea com neutrófilos > 1500 / μ L, plaquetas > 120.000 / μ L (DEVALET *et al.*, 2015) ou a medula óssea se apresenta com hiperplasia eritróide (RAO *et al.*, 2018).

A HPN+ SFM envolve a doença no contexto de outros distúrbios da medula óssea. Quando está envolvida com anemia aplástica (AA), podem ser observados aspectos clínicos e/ou biológicos de hemólise associada a duas ou três citopenias apresentando: Hb <10 g / dL, neutrófilos <1000 / μ L, plaquetas <80.000 / μ L). Em grande parte, a insuficiência da medula óssea abrange o quadro clínico. Já na HPN subclínica, A HPN subclínica é caracterizada quando o clone da HPN é $<1\%$, sem evidência de hemólise. (DEVALET *et al.*, 2015).

4.5. HPN em associação com insuficiência medular

Citopenia é a segunda característica clínica chave da HPN. Determinado grau de insuficiência medular é comum ou esperado em pacientes portadores, variando de citopenias leves a anemia aplástica grave. O quadro clínico entre pacientes pode sofrer variação e mudar ao longo da doença, podendo apresentar inicialmente função medular normal e posteriormente desenvolver uma insuficiência mais grave. Também pode ocorrer casos de pacientes diagnosticados inicialmente com anemia aplástica desenvolverem HPN. A insuficiência normalmente se torna notória por causa da neutropenia e trombocitopenia, contudo essa falha medular também pode colaborar para anemia em pacientes com HPN. A proporção desses pacientes portadores com insuficiência medular varia de 30 a 70% em diferentes níveis, provavelmente devido à graus heterogêneos de insuficiência da medula óssea (RISITANO, 2012).

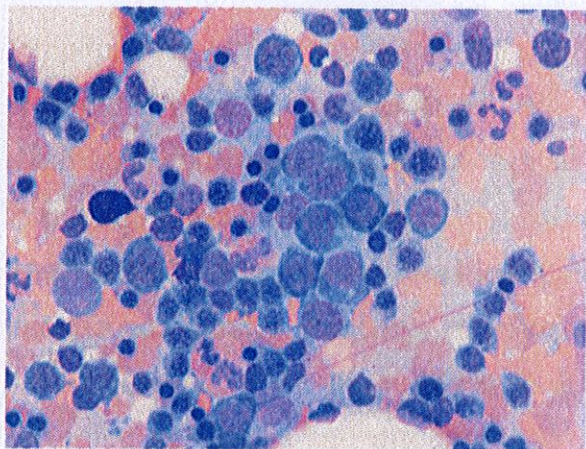
A anemia aplástica pode ser definida como distúrbio caracterizado por pancitopenia do sangue periférico associada com hipocelularidade da medula óssea sem explicação (TICHELLI *et al.*, 2002). Pode ser causada por agressão tóxica (infecções virais, drogas e irradiação) e é possível que a lesão da medula óssea promova um ataque mediado por imunoglobulinas contra determinada proteína-alvo

em células-tronco normais. Essas por um período, são alteradas pelo evento causador fazendo com que se pareça anormal, permissiva a um ataque auto-imune. Quando o agente causador sumir, a autoimunidade ainda poderá estar presente. Desse modo, para que um clone HPN escape desse ataque auto-imune, a proteína-alvo ou molécula acessória essencial para destruição da célula-tronco pela célula imune, eventualmente célula T citotóxica, deve estar associada à molécula GPI. Como clones HPN normalmente possuem uma parcela de moléculas GPI ausentes, proteínas não poderão se ligar, e o processo auto-imune será ineficiente para eliminar as células-tronco HPN, diante disso, elas escapariam da lesão e dominariam a hematopoese (HILL; RICHARDS; HILLMEN, 2007).

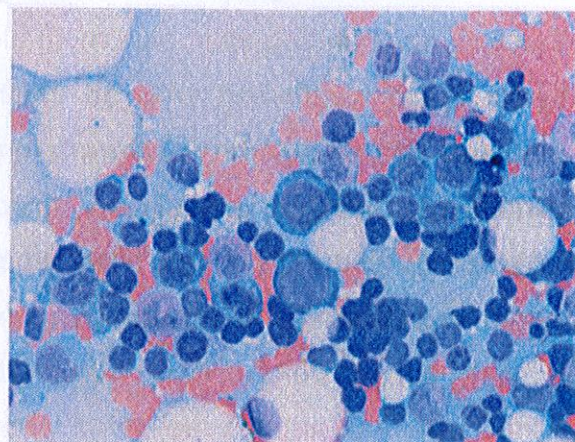
A avaliação da medula óssea se torna relevante para análise da contribuição de doenças hematológicas sobrepostas, associadas, como exemplo a anemia aplástica ou síndrome mielodisplásica. Em um caso apresentado por Townsley e Young (2013), uma paciente portadora de HPN apresentou uma população elevada de granulócitos deficientes em proteínas ancoradas por GPI e celularidade normal de medula óssea com hiperplasia eritróide, exemplificado HPN clássica, como mostrado na figura 13.

Figura 13 - Aspirado de medula óssea (A-B) e seções de biópsia (C-D) de paciente com HPN em 2002 e em 2013

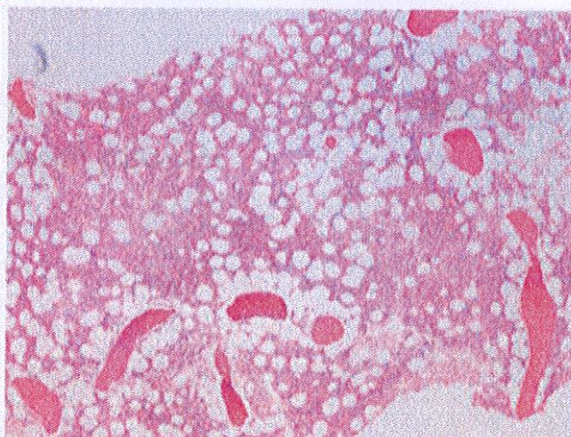
A 2002



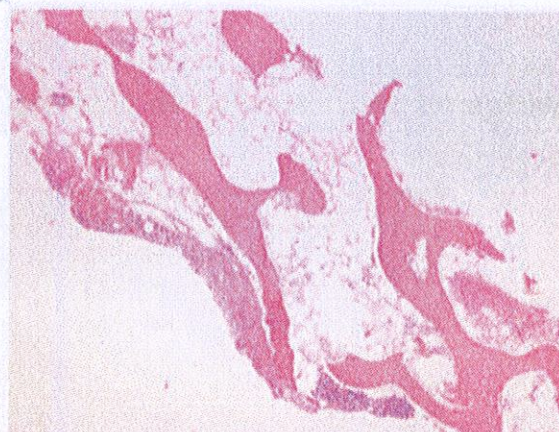
B 2013



C



D



Nota: Figuras (A, C) - Medula óssea em 2002 mostrando hiperplasia eritróide, aumento do número de eritroblastos, 50% a 60% de celularidade na biópsia central e ausência de ferro. Figuras (B, D) - Medula óssea em 2013 mostrando precursores mielóides diminuídos com hiperplasia eritróide, hipocelularidade acentuada (10%), megacariócitos reduzidos e mancha de ferro marcadamente aumentada.

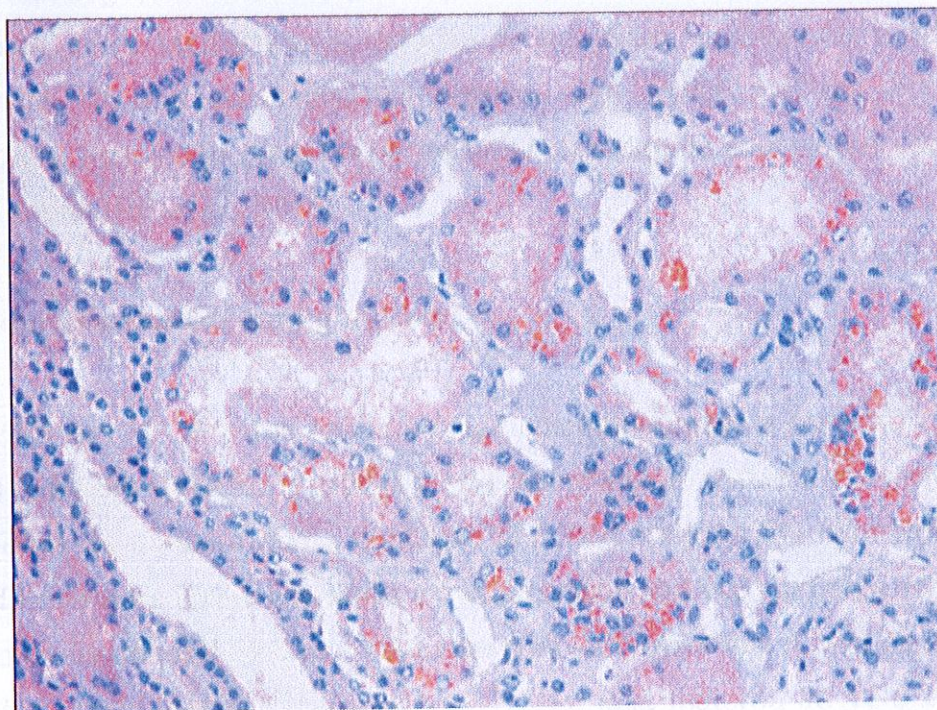
Fonte: (TOWNSLEY; YOUNG, 2013)

4.6. HPN em associação com insuficiência renal

Desequilíbrios renais podem ser resultantes de episódios frequentes de trombo ou crises hemolíticas agudas que podem ser reversíveis a depender da toxicidade epitelial renal mediada pela hemoglobina, da contração dos vasos sanguíneos renais e da obstrução intratubular. (RAO *et al.*, 2018).

Portadores de HPN possuem maior risco de insuficiência renal, uma complicação comum nesses pacientes. A hemólise intravascular associada à HPN pode provocar uma necrose tubular aguda (RE *et al.*, 2018). Nesse quadro de hemólise, a hemoglobina livre no plasma se associa à haptoglobina formando um complexo que normalmente não é filtrado pelo glomérulo, mas pode ser catabolizado no fígado, baço e medula óssea. No contexto de uma hemólise crônica, níveis plasmáticos de haptoglobina são reduzidos por causa do aumento de seu consumo, com isso tem-se um acúmulo de hemoglobina no plasma, onde a hemoglobina tetramérica se dissocia em dimérica que é mais facilmente filtrada pelo glomérulo e inserida nos túbulos proximais, acarretando em acúmulo de íons férricos nas células (hemossiderina) (RAO *et al.*, 2018). O achado mais consolidado de biópsia renal em pacientes com HPN são depósitos de hemossiderina em células tubulares renais (Figura 14) (PARK *et al.*, 2018).

Figura 14 – Biópsia de rim: Deposição de pigmentos de hemossiderina no epitélio tubular proximal



Nota: (hematoxylin-eosin stain, $\times 400$)

Fonte: (PARK *et al.*, 2018)

A hemoglobina possui efeito citotóxico, através da geração de espécies reativas de oxigênio, apoptose e inflamação, que podem levar à necrose tubular aguda, atrofia

tubular e fibrose intersticial junto com infarto renal como consequência de trombose da artéria renal e afinamento cortical. A trombose regular pode provocar necrose cortical (RAO *et al.*, 2018).

A lesão renal aguda tem por definição a diminuição súbita da função renal que inclui a insuficiência renal aguda (RE *et al.*, 2018). A lesão na HPN requer diagnóstico precoce e tratamento, já que se trata da causa de morte em até 18% dos casos de pacientes com HPN. Uma quantidade considerável de casos relatados nessas circunstâncias foi tratada com hemodiálise. A opção curativa para pacientes com HPN é o transplante de medula óssea e a utilização de eculizumab pode reduzir a incidência de manifestações renais, já que vai impedir processos que levam à hemólise crônica. Corticoides podem também ser uma opção terapêutica, reduzindo gravidade e duração de crises hemolíticas, porém, não são recomendáveis para uso em períodos prolongados (RAO *et al.*, 2018).

Eculizumab visa a proteína C5 do Complemento o que impede a produção do mediador pró-inflamatório C5a e montagem do MAC durante ativação do complemento. Logo, é eficaz tanto para a prevenção de tromboembolismo e disfunção renal crônica, como também para redução de hemólise intravascular e melhora da função renal. O uso em pacientes resultou em nítida melhora nos valores hematológicos, resolução progressiva da urina descolorida e acelerado declínio da creatinina sérica (RE *et al.*, 2018).

4.7. HPN em associação com gravidez

A HPN em 16-18% dos casos é diagnosticada durante a gravidez (NOMURA *et al.*, 2004). Nesse contexto, a gravidez está associada ao aumento de complicações materno-fetais de maneira que a condição tem sido considerada contraindicada na HPN, dado que a hemólise e anemia intravasculares são normalmente mais graves com aumento da necessidade de transfusão durante a gravidez. A taxa de morbidade e mortalidade, esta última correspondendo a uma taxa materna de 12 a 21% tendo como principal risco tromboembolismo e infecções, também se elevam na HPN durante a gravidez como também durante o período pós-parto para a mãe. O aumento nas taxas de mortalidade fetal é devido a partos prematuros, com taxas de 7 a 9% relatadas (KELLY *et al.*, 2010).

Manter os níveis de hemoglobina materna e fetal adequados requer elevada

frequência de transfusão com riscos associados. Há necessidade de reposição oral de ácido fólico e ferro; o uso de corticoides para alguns casos pode reduzir eventos hemorrágicos; terapia hormonal é contraindicada, e profilaxia de eventos tromboembólicos é essencial, utilizando-se de heparina não fracionada ou de baixo peso molecular. O transplante de medula é o tratamento efetivo, com possível utilização de células totipotentes fetais retiradas do cordão umbilical (NOMURA *et al.*, 2004).

A utilização do eculizumab vem sido alvo de estudos para esse grupo de pacientes. Controle na dose e frequência podem evitar manifestações clínicas graves de HPN e reduzir complicações materno-fetais (PATRIQUIN; LEBER, 2015).

Um ponto importante a ser ressaltado, é a assistência ao trabalho de parto e à via de parto. A taxa de cesarianas está diretamente associada à atividade da doença, visto que até 86% são relatadas em mulheres com aplasia de medula. Administração de plaquetas é importante para as pacientes com níveis de risco de sangramento (contagem de plaquetas menor que 50 mil por mm^3), seja qual for a via de parto, apesar de que o parto vaginal resulta em menor risco de hemorragia se comparado a cesariana. Pacientes com leucopenia apresentam frequentemente infecções a qual deve ser dada relevância especial à profilaxia com antibióticos, como também o rastreio de bacteriúria assintomática. Além dos cuidados citados anteriormente, deve-se realizar o rastreamento ecográfico de trombose das veias supra-hepáticas durante o período gestacional, a fim de estabelecer a anticoagulação evitando evolução para hipertensão portal e suas consequências (NOMURA *et al.*, 2004).

4.8. Diagnóstico

É imprescindível que haja um diagnóstico correto da HPN para uma administração eficaz quanto ao tratamento do paciente. Contudo, por ser uma doença rara é testada em frequências menores pelos laboratórios então as abordagens para detectar os clones são variadas (BOROWITZ *et al.*, 2010).

Há 10 anos, os testes diagnósticos se baseavam no aumento da sensibilidade dos eritrócitos à lise provocada pelo Complemento em meio ácido ou meio rico em sacarose, chamados testes de Ham e sacarose (Figura 15) (AZAMBUJA, 2013). O teste de Ham, incorporado na década de 30 ainda é utilizado em alguns serviços como teste de triagem para o diagnóstico, mas sabe-se que possui pouca sensibilidade já

que não é capaz de detectar populações pequenas de células HPN (MODESTO *et al.*, 2006). Essa baixa sensibilidade de avaliação se concentra apenas na linhagem vermelha, especialmente em pacientes com hemólise constante e que fizeram tratamento com transfusão (AZAMBUJA, 2013).

Figura 15 – Exemplo de Teste de Ham e Sacarose



Nota: Teste de HAM à esquerda da figura- Tubos 1 e 5 contém eritrócitos do paciente, tubo 1 com soro acidificado de doador e o tubo 5 com soro acidificado do paciente. À direita, teste da Sacarose, baseada na ativação do Complemento em meio de baixa força iônica. D (controle) P (paciente).

Fonte: (ZEINAD-VALIM, 2015)

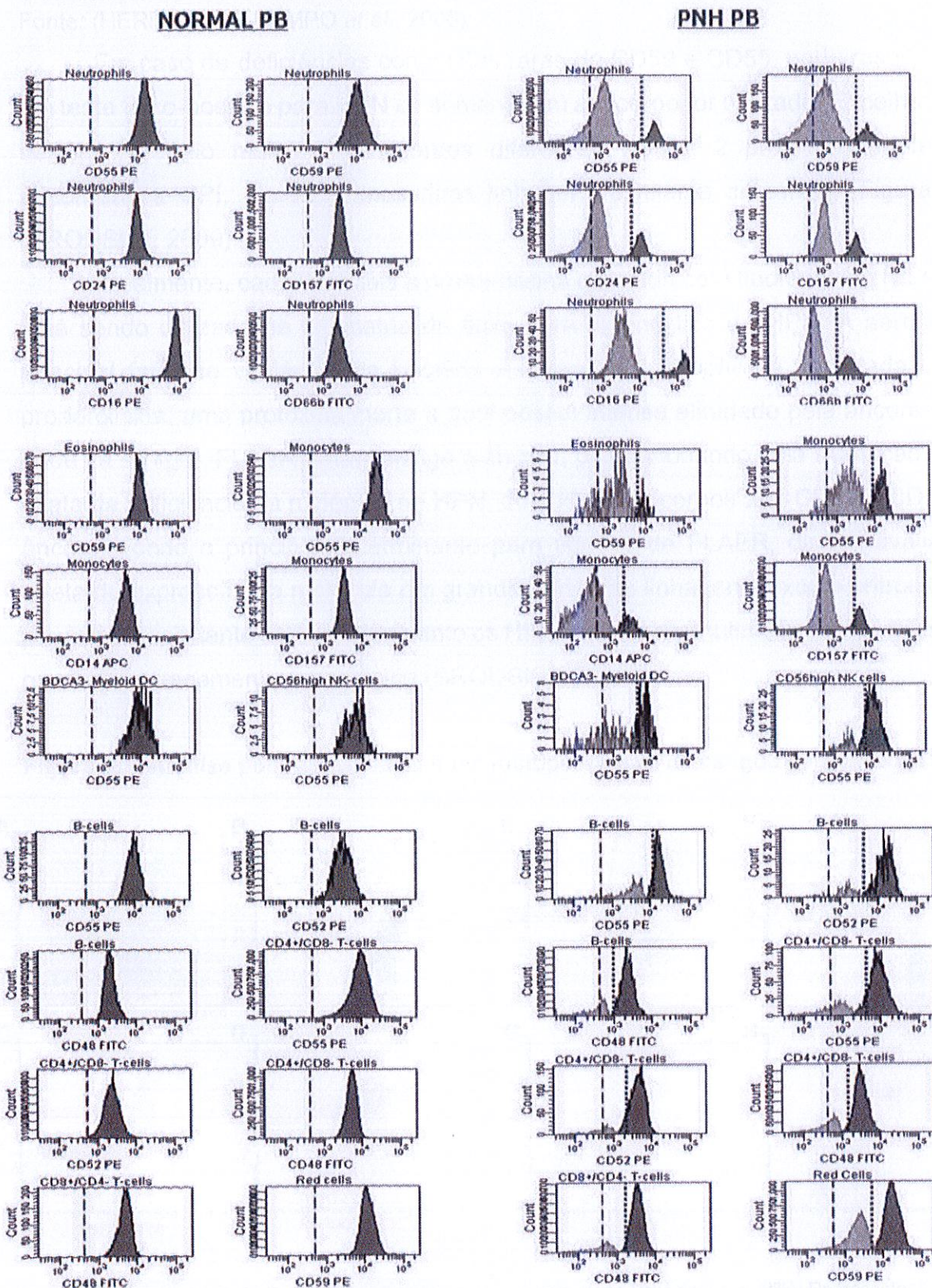
O teste de Ham (teste da hemolisina ácida) pesquisa a hemólise em eritrócitos incubados com plasma moderadamente ácido (pH 6,2). Essa acidificação do plasma leva a ativação do Complemento que promove hemólise de células sensíveis. O teste de sacarose por sua vez, é um pouco mais sensível, utilizando-se da adição de sacarose ao soro normal ativa a via clássica do Complemento, levando também à hemólise de eritrócitos sensíveis. Apesar da melhor sensibilidade, possui menos especificidade. Atualmente, possuem importância histórica, não sendo aconselhados na triagem (ARRUDA *et al.*, 2010).

HPN é diagnosticada através de achados clínicos conjuntamente com testes laboratoriais dos quais se baseiam em detectar as proteínas de membranas ligadas à GPI ou eritrócitos sensíveis à ação hemolítica do sistema Complemento, como já foi mencionado. Gel teste ou coluna de gel, método recém introduzido também permite

pesquisa de eritrócitos de CD55 e CD59, fundamentando-se na identificação dos glóbulos vermelhos anormais por aglutinação em microcolunas de gel que contém anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59. Resultados são interpretados em presença ou ausência dos antígenos, proporcionando uma estimativa do quão deficiente é a expressão, classificando-a em parcial ou completa. Apesar de possuir boa especificidade, é necessária confirmação por citometria de fluxo (CMF) (MODESTO *et al.*, 2006).

A citometria de fluxo oferece resultados mais sensíveis, específicos e precisos para o diagnóstico da doença, também utilizando anticorpos monoclonais. Possui grandes vantagens em relação a outros métodos, que incluem: análise do defeito além de eritrócitos, em granulócitos e plaquetas; quantificar o número de células deficientes de GPI em proporção; avaliar progressão da doença baseada na quantificação de células HPN (Figura 16) e detectar clones em pacientes com anemia aplástica. Os anticorpos mais utilizados são anti-CD55 e anti-CD59 os quais são suficientes para determinar o diagnóstico. A deficiência também pode ser identificada com anticorpos anti-CD58, anti-CD14, anti-CD24, anti-CD48, entre outras (MODESTO *et al.*, 2006), porém, as mais utilizadas no rastreamento são aquelas proteínas reguladoras do Complemento já que ambas estão expressas em todas as diferentes populações celulares do sangue periférico normal e pelo fato de que a expressão anormal das mesmas, tem correlação com a atividade clínica da doença (HERNÁNDEZ-CAMPO *et al.*, 2002).

Figura 16 – Histogramas representativos da expressão de GPI-AP em diferentes subconjuntos de células hematopoiéticas presentes em amostras de sangue periférico de indivíduos normais e PNH.



Nota: Sangue periférico de indivíduos normais (painéis à esquerda) e PNH (painéis à direita). Linhas tracejadas

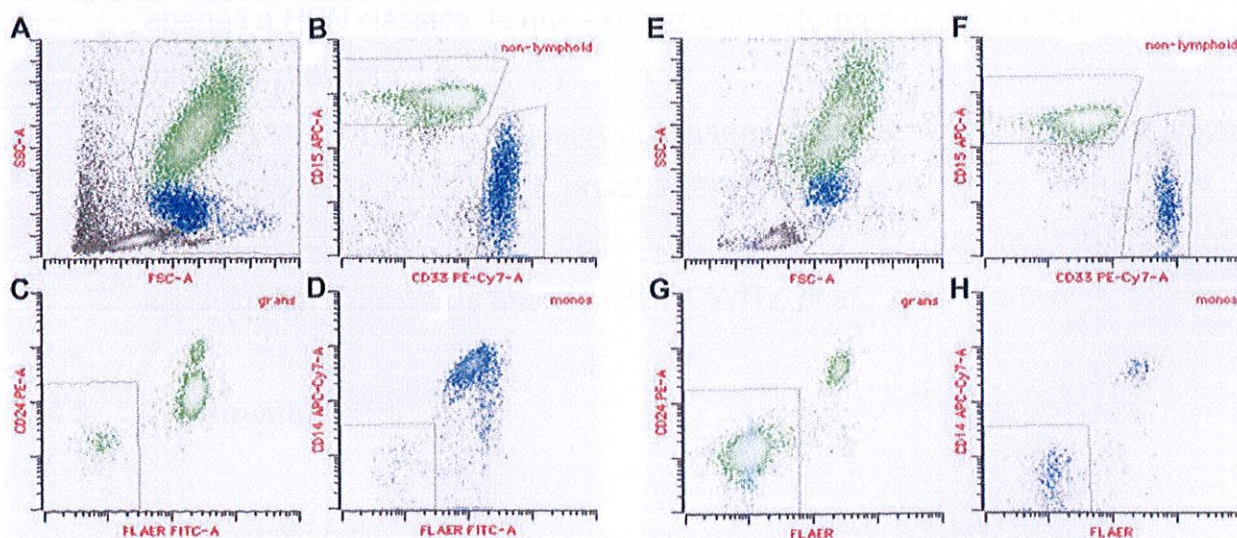
correspondem ao valor de corte para a positividade estabelecida e linhas pontilhadas correspondem aos níveis mais baixos de expressão nas amostras de sangue periférico normais observadas. Em cada histograma nos painéis de duas colunas direitas, a expressão dos diferentes marcadores exibidos pelas células HPN é exibida em cinza claro.

Fonte: (HERNÁNDEZ-CAMPO *et al.*, 2006)

Em caso de deficiências congênitas raras de CD59 e CD55, pode resultar em um teste falso-positivo para HPN se somente um anticorpo for utilizado. É melhor que se utilizem pelo menos 2 anticorpos diferentes, contra 2 proteínas diferentes ancoradas a GPI, em ao menos duas linhagens celulares diferentes (Figura 17) (BRODSKY, 2009).

Atualmente, cada vez mais a proaerolisina marcada com fluoresceína (FLAER) está sendo utilizada na citometria de fluxo para diagnóstico de HPN. A aerolisina, principal fator de virulência da bactéria *Aeromonas hydrophila* é secretada como proaerolisina, uma protoxina inerte a qual possui intensa afinidade pela ancora GPI, onde irá se ligar. FLAER então, se liga à âncora, proporcionando uma avaliação mais exata da deficiência da molécula na HPN, do que os anticorpos anti-CD59 e CD55. A âncora, sendo o principal determinante para ligação de FLAER, dispõe avaliação direta da expressão da molécula em grande parte das linhagens, exceto eritrócitos e plaquetas, pois tanto os normais quanto os HPN expressam muita glicoforina, proteína que se liga fracamente à aerolisina (BRODSKY, 2009).

Figura 17 – Análise por citometria de fluxo multiparâmetro de sangue periférico na HPN.



Nota: Representação (A-D) Paciente com anemia aplástica com clone PNH pequeno (2%); Representação (E-H) paciente clássico PNH. (A, E) Exibição de dispersão direta (FSC) e dispersão lateral (SSC) mostrando o portão

inicial para excluir linfócitos e detritos. (B, F) Representação de granulócitos (em verde) são identificados como CD15 brilhantes e CD33 baixo, enquanto os monócitos (em azul) o inverso. (C, G) População de granulócitos deficientes em proteína âncora GPI resultando em falta de coloração com anti-CD24 e FLAER. (D, H) População de monócitos deficientes em proteína-âncora GPI resultando em falta de coloração com anti-CD14 e FLAER.

Fonte: (BRODSKY *et al.*, 2009)

Indicações

Os sinais e sintomas da doença podem variar amplamente a cada paciente. Dada a raridade de incidência, o rastreio de todos os pacientes que apresentam anemia ou trombose não é adequado. Existem aqueles sintomas comuns entre todos, e algumas manifestações elevam as chances de serem encontrados clones de HPN que requerem investigação. Seguem os critérios:

- Apesar da hemoglobinúria não estar presente na maioria dos pacientes, o aparecimento dessa condição inexplicada deve ser feito o teste para HPN;
- O rastreio de rotina da HPN pode ser indicado para pacientes com anemia hemolítica negativa para Coombs, não estando presentes anormalidades celulares como esferócitos, células falciformes, esquistócitos, entre outros, não havendo também causa infecciosa da hemólise;
- Manifestações trombóticas incomuns devem proceder com teste HPN, já que os pacientes têm propensão de eventos trombóticos em regiões incomuns;
- Casos de trombose coexistente e hemólise intravascular ou citopenias;
- A ausência de hemólise não exclui a necessidade de fazer o teste, excluiria apenas a HPN clássica, já que existem outras formas de HPN onde a hemólise não está presente;
- Jovens com citopenias, naqueles cuja anemia aplástica ou hipoplásica estejam no diagnóstico diferencial, é preciso rastreio da presença de clones HPN. A anemia isolada dificilmente pede testes, a não ser que investigações não identifiquem a causa da anemia (BOROWITZ *et al.*, 2010).

4.9. Tratamento

1. Terapias paliativas

Pacientes com HPN normalmente possuem anemia por deficiência de ferro, devido à perda constante de ferro na urina (hemossidenúria e hemoglobinúria). Desta

forma, pode ser necessária suplementação e reposição do mesmo, visto que a deficiência limita a eritropoese. É indicado também reposição de folatos, eliminados pela eritropoese elevada secundária à hemólise crônica. Essa associação entre hemólise constante e hematopoese ineficiente pode acarretar em necessidade de transfusão, que pode levar ao aumento da concentração de Hb e redução da hemólise (ARRUDA *et al.*, 2010).

Casos em que são observados grandes clones e outros fatores de risco para eventos trombóticos, pode ser recomendada uso de anticoagulantes como medida profilática. Já em pacientes com anemia aplástica severa e sintomas de maior associação a ela, é indicado tratamento inicial com imunossupressor ou transplante de células-tronco (ARRUDA *et al.*, 2010).

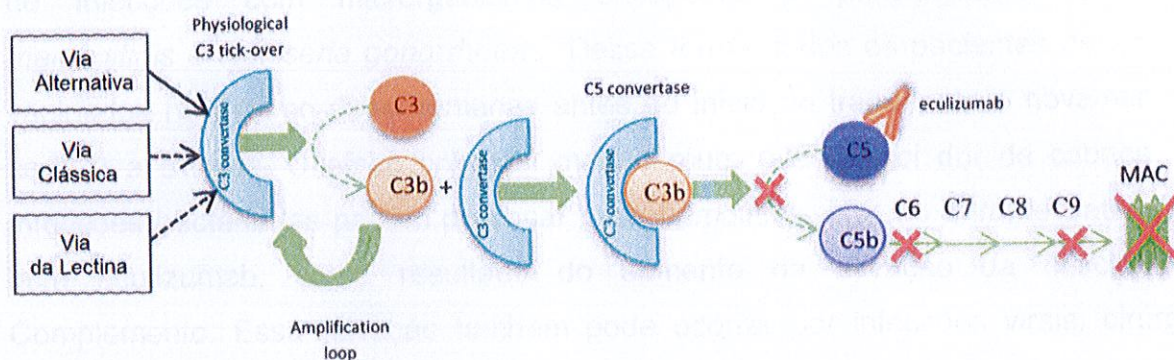
Corticosteroides e andrógenos: Os corticosteroides tanto para hemólise crônica quanto para crises hemolíticas agudas, são assunto em questionamento se tratando de utilização como tratamento. Alguns membros do IPIG são contra o uso em qualquer circunstância. O resultado notável da utilização de corticosteroides parece ser atenuar hemólises excessivas. Breves dosagens de prednisona podem diminuir a gravidade e duração das crises, sendo que o uso no tratamento de hemólise crônica é limitado devido sua capacidade de toxicidade e possíveis danos associados. Se utilizado, acompanhamento cuidadoso é imprescindível. Quanto a terapia androgênica, sozinha ou combinada à esteroides, tem tido sucesso no tratamento da doença. O mecanismo da melhora ainda não é totalmente esclarecido e as complicações associadas incluem: toxicidade hepática, o que requer monitorização da função hepática, hipertrofia prostática e efeitos virilizantes (PARKER *et al.*, 2005).

II. *Anticorpo Monoclonal*

O eculizumab trata-se de um anticorpo monoclonal humanizado que atua em oposição ao C5, inibindo a ativação do Complemento terminal prevenindo formação do MAC. O bloqueio impede a progressão da cascata seja qual for o estímulo, já que o C5 é comum em todas as vias de ativação. O impedimento da clivagem da molécula bloqueia também a geração de mediadores pró-inflamatórios como C5a e líticos, C5b-9 (Figura 18). Sua atuação é muito eficaz na diminuição da hemólise intravascular, porém não reduz a hemólise extravascular e não trata insuficiência da medula. Logo, possui maior eficácia se utilizado no tratamento da HPN clássica. Sua utilização reduz ou até mesmo elimina necessidade de transfusões, melhora qualidade de vida e reduz

tendência a trombose (BRODSKY, 2009).

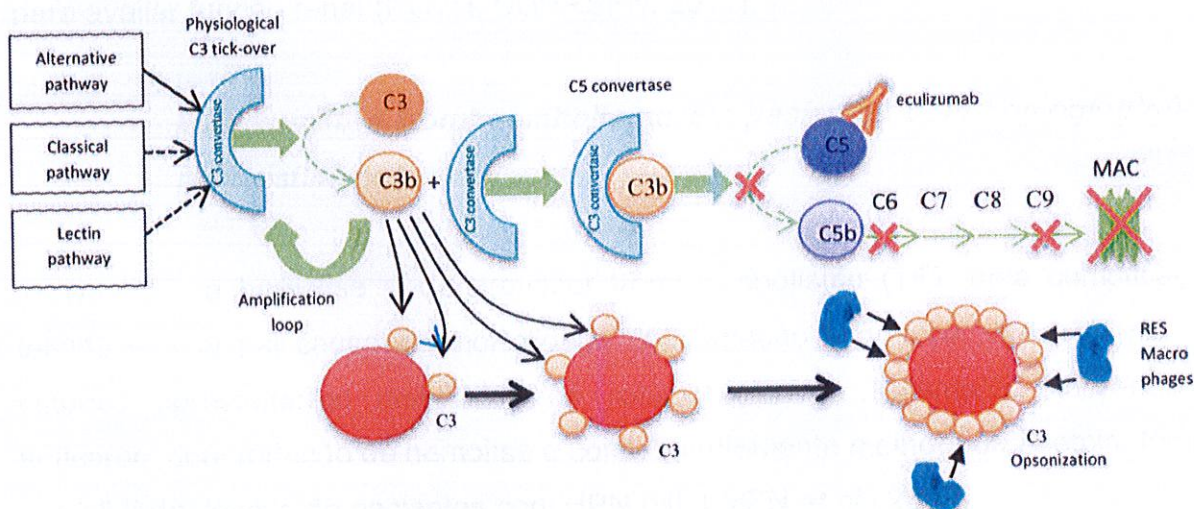
Figura 18 - Mecanismo de ação do eculizumab na cascata do Complemento



Fonte: (DEVALET *et al.*, 2015)

Durante o tratamento com eculizumab, grande parte dos pacientes sustentam uma elevação persistente de reticulócitos, bilirrubina e LDH enquanto uma queda persistente de haptoglobina. Alguns grupos podem ou não apresentar melhoria na anemia que pode ser resultado do aumento de hemólise extravascular durante o tratamento. A hemólise intravascular é bloqueada pelo anticorpo, logo o número de hemácias HPN será elevado juntamente com elementos anteriores do complemento (opsoninas C3). As células sanguíneas então opsonizadas por moléculas C3 são reconhecidas por células reticulo endoteliais, com consequente hemólise extravascular localizada (Figura 19) (DEVALET *et al.*, 2015).

Figura 19- Mecanismo da hemólise extravascular durante o tratamento com eculizumab



RES, sistema reticuloendotelial.

Fonte: (DEVALET *et al.*, 2015)

O anticorpo é administrado por via intravenosa e sua utilização aumenta o risco de infecções com microrganismos encapsulados, principalmente *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Dessa forma, todos os pacientes devem ser vacinados no mínimo duas semanas antes do início do tratamento e novamente a cada 3 a 5 anos. O efeito colateral mais comum relatado foi dor de cabeça. As infecções bacterianas podem provocar crise hemolítica, mesmo durante tratamento com eculizumab, como resultado do aumento da ativação da cascata do Complemento. Essa ativação também pode ocorrer por infecções virais, cirurgia, trauma ou gravidez (RÖTH; DÜHRSEN, 2011).

Para pacientes diagnosticados com HPN é recomendado monitorar em intervalos regulares o tamanho do clone, se tratando de piora ou melhora da doença, qualquer alteração no tamanho pode refletir mudança no quadro clínico. Quando a doença se apresenta estável, monitoramento anual pode ser o bastante. Porém, seja qual for a alteração nos parâmetros clínicos ou hematológicos, é importante que haja monitoramento em maior frequência. Esse acompanhamento periódico tem utilidade em casos de terapia com eculizumab, para certificar a estabilização dos clones de eritrócitos (BOROWITZ *et al.*, 2010).

É recomendado monitoramento com hemograma completo, com contagem de reticulócitos, LDH e fatores mais completos de hemólise como haptoglobina, hemopexina e bilirrubina. Os níveis de síntese de reticulócitos é útil para análise com precisão a produção de eritrócitos da medula. Níveis de creatinina podem ser medidos para avaliar função renal (RÖTH; DÜHRSEN, 2011)

- ***Eculizumab e tromboembolismo em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna***

Na HPN a hemólise pode provocar tromboembolismo (TE), uma complicação temida e principal causa de mortalidade com relação à doença. Até o momento, estudos apresentaram resultados de recuperação no tratamento utilizando o anticorpo, com redução de hemólise e consequentemente melhora da anemia, fadiga e qualidade de vida de pacientes com HPN (HILLMEN *et al.*, 2007).

Em estudo que analisou o efeito do eculizumab em pacientes com TE, foram

comparadas taxas de eventos ocorridos em pacientes com tratamento com anticorpo e pacientes sem tratamento. Resultados apontaram redução nas taxas de eventos tromboembólicos em cada estudo individual, sendo essa taxa de redução total entre os estudos apresentada em 7,37 eventos (total de 124) a cada 100 pacientes/ano para 1.07 eventos (total de 3) a cada 100 pacientes/ano, ou seja, uma redução em torno de 85% de eventos por 100 pacientes ao ano (HILLMEN *et al.*, 2007).

Pacientes tratados com placebo, obtiveram taxas de eventos de TE aumentadas, de 2,34 eventos por 100 pacientes/ano antes do estudo, para 4,38 eventos por 100 pacientes/ano durante 6 meses de tratamento (placebo) (HILLMEN *et al.*, 2007).

As taxas comparadas durante o mesmo período de tempo antes e depois do tratamento com eculizumab, também mostraram redução evidente no número total de eventos de 39 para 3, cerca de 92% de redução (HILLMEN *et al.*, 2007).

Para aqueles pacientes que recebiam terapia antitrombótica, as taxas de eventos também obtiveram redução com o eculizumab, cerca de 94% (HILLMEN *et al.*, 2007).

Levando em conta que a trombose é uma complicação grave, é relevante esperar que o tratamento com eculizumab pode aumentar a expectativa de vida desses pacientes, por diminuir o risco desses eventos, já que é responsável por grande parte das mortes de pacientes com essas condições na HPN (HILLMEN *et al.*, 2007).

- ***Eculizumab e gravidez***

Da mesma forma como acontece com diversos outros medicamentos administrados durante gravidez, é relevante levar em consideração os efeitos destes tanto na mãe quanto no bebê (MARASCA *et al.*, 2010).

Na HPN a gravidez está relacionada com maior morbidade e mortalidade materna fetal, em decorrência de infecções, eventos tromboembólicos e prematuridade no parto, por esse motivo, contraindicada em casos de HPN. Existem dados limitados na literatura, com respeito da utilização do eculizumab em gestantes. Contudo, há relatos de sucesso durante tratamento com o anticorpo para controle da hemólise (SHARMA *et al.*, 2015).

O diagnóstico de HPN ocorre em uma média de 34 anos, normalmente um

período em que as mulheres se encontram na faixa reprodutiva. Em estudo apresentado por Sharma *et al* (2015) foi observado que o eculizumab administrado em doses maiores em estado grávido do que no estado não grávido, no período final da gestação, foi obtido sucesso nos níveis terapêuticos de bloqueio do Complemento. Logo, ao invés de diminuir o intervalo entre doses, administrar uma dose escalonada maior é possível obter êxito no controle da hemólise. Isso pode ser justificado já que a gravidez ativa a cascata do Complemento, com maior formação de complexos terminais durante o terceiro trimestre. A hipótese dos autores, sugerem que o não controle da hemólise com eculizumab durante o segundo e terceiros trimestres, pode ser devido fator fisiológico do volume intravascular que acontece no período da gravidez. O nível sérico do anticorpo nessas fases pode ser encontrado em níveis sub terapêuticos por conta da diluição, portanto, o aumento da dose levaria ao restabelecimento do nível para um efeito terapêutico de controle da hemólise (SHARMA *et al.*, 2015). O anticorpo é metabolizado por enzimas lisossômicas em pequenos peptídeos e aminoácidos. O aumento da atividade dessas enzimas, juntamente com mudanças fisiológicas normais durante a gravidez como aumento de gordura e água, também pode explicar necessidade de doses maiores (KELLY *et al.*, 2015).

Níveis do anticorpo não detectado no sangue, sugere que ele não é capaz de atravessar a placenta- apesar de outros estudos observarem que níveis baixos podem ser detectados, porém não é suficiente para afetar a ativação do Complemento (KELLY *et al.*, 2015) - e nem ser excretado no leite materno. Portanto, a administração de eculizumab mostra segurança para tratamento de pacientes grávidas, alguns necessitando de alterações em intervalos de doses ou elevação para controle à medida que a gravidez avança. Apesar disso em casos de HPN, 45% das gestações terminam em aborto espontâneo e 6% em mortalidade materna por complicações trombóticas. Esses riscos requerem tratamento com anticoagulação durante a gravidez e por no mínimo 4 a 6 semanas após o parto (SHARMA *et al.*, 2015). Com isso, mesmo com sucesso de gravidez na HPN submetida a tratamento com eculizumab, ainda é imprescindível supervisão meticulosa dessas pacientes (MARASCA *et al.*, 2010).

III. *Terapia Curativa*

Historicamente, até então, apenas duas opções de terapia eram possíveis para a doença: Tratamento sintomático e profilaxia de complicações que não possibilitam um controle efetivo a longo prazo ou transplante de células tronco, que tem capacidade de curar, porém com altas taxas de mortalidade e morbidade, por conta de infecções, doença do enxerto contra hospedeiro e falha de enxerto (RÖTH; DÜHRSEN, 2011).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) ou transplante de medula óssea (TMO) é atualmente a única terapia curativa existente para HPN. Tem por finalidade eliminar clones HPN, fornecer “abastecimento” de células-tronco normais e substituir o sistema imune (LUZZATTO; GIANFALDONI; NOTARO, 2011). Contudo, ainda existem muitos riscos associados ao procedimento, dado que a maioria dos pacientes não são candidatos ou não possuem doador com compatibilidade (RODRIGUES, 2011).

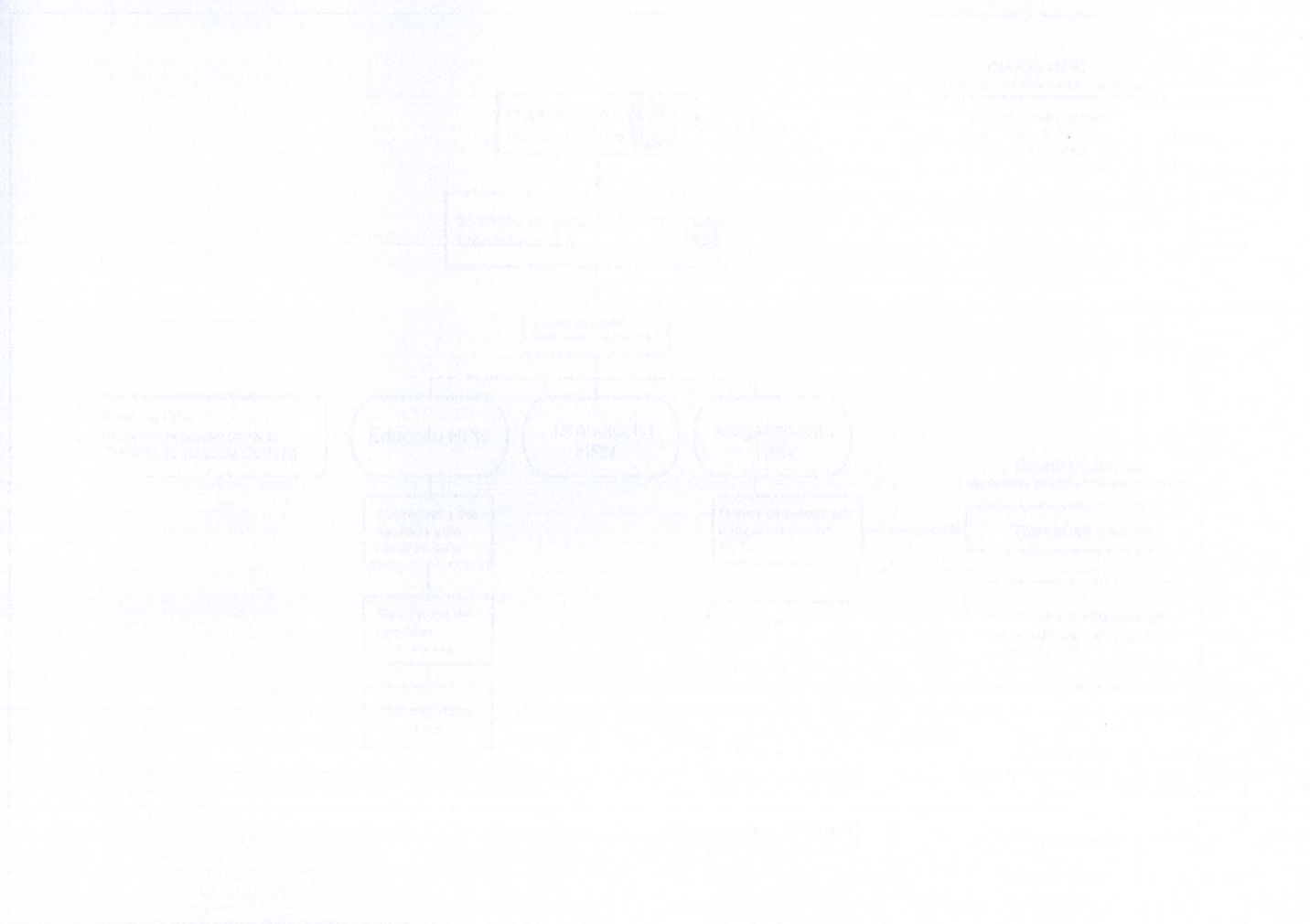
IV. *Novas perspectivas*

Um anticorpo monoclonal foi descoberto e está sendo alvo de estudos a fim de melhorar a terapêutica da HPN, o chamado 3E7/H17. Este atua inibindo a hemólise através da via alternativa e deposição de C3, sem afetar a via clássica. Apresenta uma nova abordagem onde a hemólise tanto intravascular quanto extra vascular pode ser inibida sem comprometer as funções imunes da via clássica do Complemento (RODRIGUES, 2011).

Uma diferente e recente abordagem para prevenir HPN está sendo estudada para uma possibilidade de alternativa terapêutica. O estudo tem por objetivo e base, restaurar o CD59 nas superfícies dos glóbulos vermelhos na HPN, o que poderia impedir a hemólise mediada pelo Complemento como também impedir formação de micropartículas pró-coagulantes a partir de plaquetas. A abordagem consiste na utilização de rhCD59-P, um CD59 humano recombinante solúvel o qual é expresso em *Escherichia coli*. Este, sofreu alterações a fim de substituir a âncora GPI do CD59 endógeno, permitindo que proteínas administradas de maneira exógena possam se ligar à membrana celular de maneira similar à ancora GPI. O estudo revelou que a forma modificada da molécula como um novo peptídeo sintético de ancoragem se liga devidamente as membranas in vitro, liberando CD59 para as células sanguíneas

restaurando assim a ação reguladora do Complemento. A injeção intravenosa de rhCD59-P engloba os eritrócitos de camundongos, fornecendo proteção contra lise por Complemento humano por pelo menos 24 horas enquanto ele estiver na circulação. O rhCD59-P pode ser feito utilizando uma combinação de DNA recombinante e técnicas de modificação química. Foi observada uma boa tolerância tornando-o uma opção para testes em humanos (HILL *et al.*,2006).

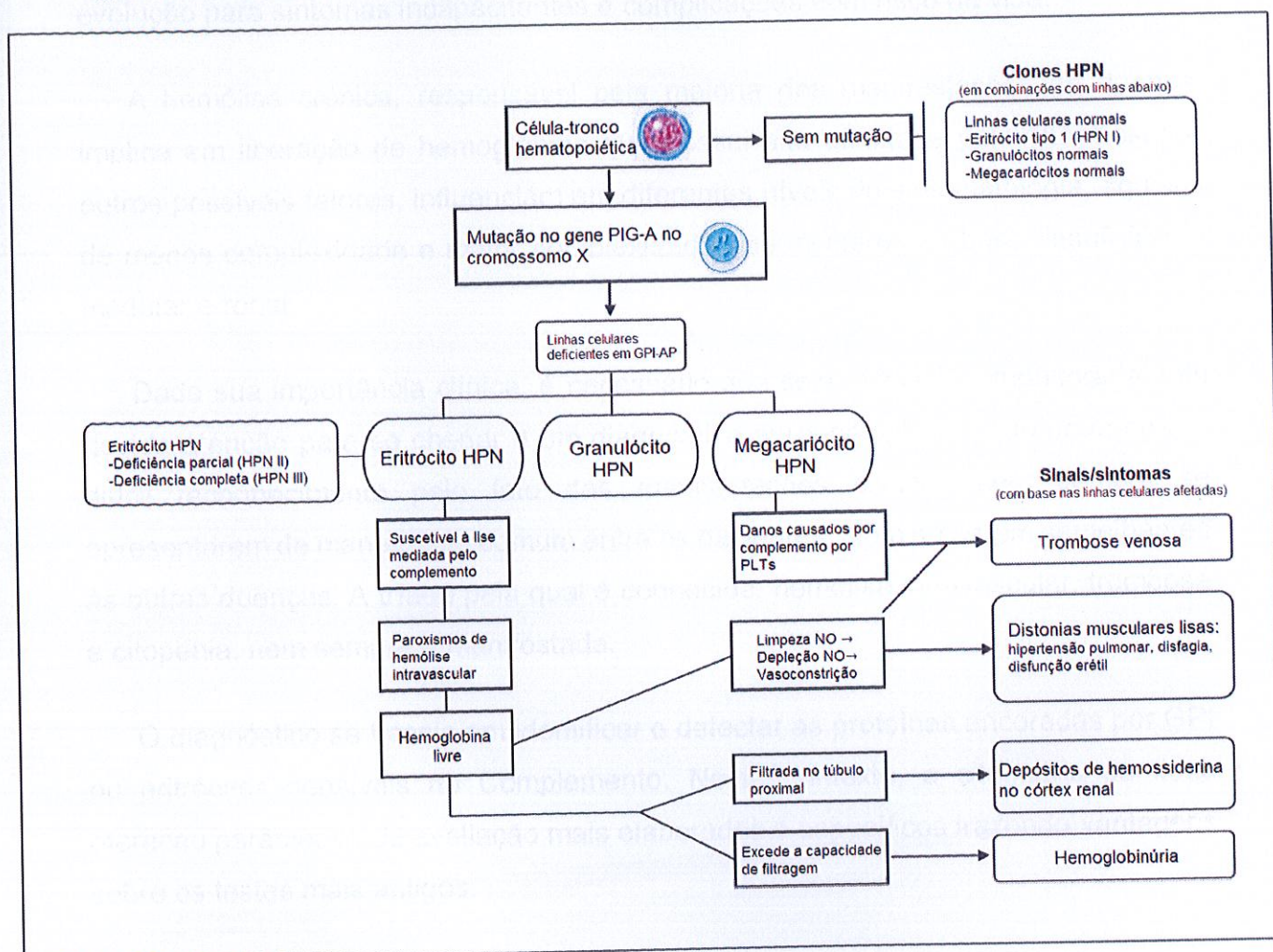
Figura 20 – Visão geral da patogênese da HFN e como isso pode ser clinicamente abordado.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A patogênese da hemoglobinúria paroxística noturna e suas manifestações clínicas podem ser contempladas de maneira geral no esquema representado na figura 20:

Figura 20 – Visão geral da patogênese da HPN e manifestações clínicas



Abreviações: HPN, Hemoglobinúria paroxística noturna; PIG-A, gene Fosfatidilinositol glicano classe A; GPI-AP, Proteínas âncoras de glicosilfosfatidilinositol; PLTs, plaquetas; NO, óxido nítrico.

Fonte: Modificado de (VEERREDDY, 2013)

Hemoglobinúria Paroxística Noturna, doença adquirida de células-tronco hematopoiéticas, é resultado de alteração genética do gene PIG-A, o qual acarreta em redução na síntese de âncoras GPI levando à perda ou ausência de proteínas de membrana ancoradas por ela com funções específicas em várias linhagens celulares.

Dada a importância da atividade do sistema Complemento na defesa do organismo, a ausência de proteínas reguladoras ancoradas por GPI na superfície de células, como CD55 e CD59, pode levar a ativação indevida e sem oposição ao Complemento tornando-o um risco potencial às células do próprio organismo.

Apesar de se tratar de uma doença rara, é grave e provoca impactos relevantes na qualidade de vida do paciente, em que aspectos clínicos podem variar com evolução para sintomas incapacitantes e complicações com risco de vida.

A hemólise crônica, responsável pela maioria das manifestações da doença, implica em liberação de hemoglobina que possui alta afinidade pelo NO. Esses e outros possíveis fatores, influenciam em diferentes níveis de sintomatologia, aqueles de menos complexidade e maior complexidade que incluem trombose, insuficiência medular e renal.

Dada sua importância clínica, é necessário que seja avaliada e monitorada com devida atenção para se chegar a um diagnóstico apropriado, visto que pode ser de difícil reconhecimento pelo fato das manifestações clínicas nem sempre se apresentarem de maneira em comum entre os pacientes, além de serem semelhantes às outras doenças. A tríade pela qual é conhecida, hemólise intravascular, trombose e citopenia, nem sempre é manifestada.

O diagnóstico se baseia em identificar e detectar as proteínas ancoradas por GPI ou eritrócitos sensíveis ao Complemento. Neste contexto, a citometria de fluxo ofereceu parâmetros de avaliação mais elaborados e específicos trazendo vantagens sobre os testes mais antigos.

Sabe-se que ainda são encontrados obstáculos, visto que a HPN pode vir em associação com outras doenças que podem ainda agravar e dificultar a terapia, algumas das quais ainda não se tem conhecimento completo de sua contribuição na doença.

O conhecimento de seu mecanismo de desenvolvimento, permitiu abordagens mais precisas em medidas terapêuticas, o que antes era possível apenas tratamentos paliativos sobre os sintomas, atualmente já são estudadas alternativas que atuem sobre a causa primária da doença, ou seja, o sistema Complemento, visando a cura.

Com um diagnóstico adequado, várias são as opções de tratamentos, em que a utilização de anticorpo monoclonal veio como alternativa eficaz no tratamento de hemólise intravascular. Embora ainda não ocupou uma posição de terapia curativa, essa nova abordagem vem sido muito explorada em diversos quadros clínicos, e apesar de suas limitações, abre caminho para novas descobertas e perspectivas.

REFERÊNCIAS

- ALEGRETTI, Ana Paula et al. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.l.], v. 49, n. 3, p.276-287, jun. 2009.
- ARRUDA, Martha Mariana de Almeida Santos et al. Hemoglobínúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 2, p.214-221, nov. 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. **Abrale**.
- AZAMBUJA, Ana Paula de. **Características clínicas e laboratoriais de pacientes que apresentam clone de hemoglobínúria paroxística noturna detectado por citometria de fluxo**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna na especialidade Clínica Médica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- AZEVEDO, Maria Regina Andrade de. Anemias Hemolíticas II: Anomalias de membrana. In: AZEVEDO, Maria Regina Andrade de. **Hematologia Básica: Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial**. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2014. Cap. 10. p. 104-110.
- BESSLER, Monica; HIKEN, Jeffrey. The Pathophysiology of Disease in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Hematology**, [S.l.], v. 2008, n. 1, p.104-110, jan. 2008.
- BOROWITZ, Michael J. et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, [S.l.], v. 78, n. 4, p.211-230, jul. 2010.

BRODSKY, Robert A.. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, [S.I.], v. 113, n. 26, p.6522-6527, abr. 2009.

BRODSKY, Robert A.. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, [S.I.], v. 124, n. 18, p.2804-2811, out. 2014.

CONITEC (BRASIL). Ministério da Saúde. **Eculizumabe para tratamento de pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN)**: Relatório de recomendação. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 93 p.

CHRISTMAS, Stephen E. et al. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. **Immunology**, [S.I.], v. 119, n. 4, p.522-528, dez. 2006.

DEVALET, Bérangère et al. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. **European Journal Of Haematology**, [S.I.], v. 95, n. 3, p.190-198, mar. 2015.

FUJITA, Teizo; MATSUSHITA, Misao; ENDO, Yuichi. The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and Evolution. **Immunological Reviews**, [S.I.], v. 198, p.185-202, abr. 2004.

GARCIA, Andrea A.; FRANCO, Rendrik F.. Trombofilias adquiridas: acquired thrombophilias. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 4, n. 34, p.258-268, jul./dez. 2001.

GAVRIILAKI, Eleni et al. Modified Ham test for atypical hemolytic uremic syndrome. **Blood**, [S.I.], v. 125, n. 23, p.3637-3646, abr. 2015.

HERNÁNDEZ-CAMPO, Pilar M. et al. Comparative analysis of different flow cytometry-based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 and CD55 expression on major peripheral blood cell subsets. **Cytometry**, [S.I.], v. 50, n. 3, p.191-201, jun. 2002.

HERNÁNDEZ-CAMPO, Pilar María et al. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: A frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, [S.I.], v. 70, n. 2, p.71-81, out. 2006.

HILL, Anita et al. Protection of erythrocytes from human complement-mediated lysis by membrane-targeted recombinant soluble CD59: a new approach to PNH therapy. **Blood**, [S.I.], v. 107, n. 5, p.2131-2137, mar. 2006.

HILL, Anita; RICHARDS, Stephen J.; HILLMEN, Peter. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **British Journal Of Haematology**, [S.I.], v. 137, n. 3, p.181-192, mai. 2007.

HILL, Anita et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, [S.I.], v.106, n.7, p. 2559-2565, out. 2005.

HILL, Anita. La hemoglobinuria paroxística nocturna y su epidemiología. **HPN LOOKS: Revista informativa dedicada a la enfermedad Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y su Asociación de pacientes**, Igualada, n. 3, p.4-5, fev. 2012.

HILLMEN, Peter et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, [S.I.], v. 110, n. 12, p.4123-4128, dez. 2007.

HILLMEN, Peter et al. Natural History of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **New England Journal Of Medicine**, [S.I.], v. 333, n. 19, p.1253-1259, nov. 1995.

HILLMEN, Peter; RICHARDS, Stephen J. Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **British Journal Of Haematology**, [S.I.], v. 108, n. 3, p.470-479, mar. 2000.

JOHNSTON, Jennifer j. et al. The phenotype of a germline mutation in PIGA: The gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **The American Journal Of Human Genetics**, [S.I.], v. 90, n. 2, p.295-300, fev. 2012.

JOHNSON, R J; HILLMEN, P. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy?. **Journal Of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, [S.I.], v. 55, n. 3, p.145-152, 2002.

JUNIOR, Francisco C. da Silva; ODONGO, Fatuma C. A.; DULLEY, Frederico L.. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 1, p.53-58, 2009.

KAI, Tatsuyuki et al. Phenotypes and phosphatidylinositol glycan-class A gene abnormalities during cell differentiation and maturation from precursor cells to mature granulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, [S.I.], v. 100, n. 10, p.3812-3818, nov. 2002.

KASPER, Dennis L. et al. **Medicina Interna de Harrison**. 19. ed. Porto Alegre: Mcgraw Hill Brasil, 2016. 3048 p.

KELLY, Richard J. et al. Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **New England Journal Of Medicine**, [S.I.], v. 373, n. 11, p.1032-1039, set. 2015.

KELLY, Richard et al. The management of pregnancy in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria on long term eculizumab. **British Journal Of Haematology**, [S.l.], v. 149, n. 3, p.446-450, maio 2010.

LIU, Lucy. **MedBullets**.

LUZZATTO, Lucio; GIANFALDONI, Giacomo; NOTARO, Rosario. Management of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: a personal view. **British Journal Of Haematology**, [S.l.], v. 153, n. 6, p.709-720, abr. 2011.

MARASCA, Roberto et al. Pregnancy in PNH: Another eculizumab baby: Correspondence. **British Journal Of Haematology**, [S.l.], v. 150, n. 6, p.707-708, set. 2010.

MARTINS, Sara Daniela Cabete. **Anemias hemolíticas: clínica, diagnóstico e terapêutica: uma revisão crítica**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Hematologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

MODESTO, Thaís M. et al. Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 28, n. 4, p.275-279, dez. 2006.

MUÑOZ-LINARES, Cristina et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a single Spanish center's experience over the last 40 yr. **European Journal Of Haematology**, [S.l.], v. 93, n. 4, p.309-319, 13 maio 2014.

NESARGIKAR, Prabhu; SPILLER, B.; CHAVEZ, R.. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. **European Journal Of Microbiology And Immunology**, [S.l.], v. 2, n. 2, p.103-111, jun. 2012.

NOMURA, Marcelo Luís et al. Hemoglobinúria Paroxística Noturna e Gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [S.l.], v. 26, n. 7, p.579-582, jun. 2004.

OLIVEIRA, Michel Michels de. **Transplante de medula óssea para tratamento da hemoglobinúria paroxística noturna: experiência do hospital de clínicas da universidade federal do paraná**. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Clínica Médica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PARK, Changhyun et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Kidney biopsy and magnetic resonance imaging. **Kidney Research And Clinical Practice**, [S.l.], v. 37, n. 1, p.96-97, 31 mar. 2018.

PARKER, Charles J.; WARE, Russell E.. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: GREER, John P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 12. ed. Philadelphia: Lippincott, 2008. Cap. 35. p. 998-1020.

PARKER, C. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, [S.l.], v. 106, n. 12, p.3699-3709, dez. 2005.

PATRIQUIN, Christopher; LEBER, Brian. Increased eculizumab requirements during pregnancy in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: case report and review of the literature. **Clinical Case Reports**, [S.l.], v. 3, n. 2, p.88-91, fev. 2015.

PICCOLI, Amanda Kirchner et al. Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 na artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.l.], v. 51, n. 5, p.503-510, nov. 2011.

RAO, Srikanth Prasad et al. Hemosiderin tubulopathy-induced acute kidney injury - A rare initial manifestation of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Saudi Journal Of Kidney Diseases And Transplantation**, [S.l.], v. 29, n. 5, p.1232-1236, out. 2018.

RE, Francesca et al. Maintenance of renal function in a patient with a history of acute paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-associated kidney injury. **Oxford Medical Case Reports**, [S.l.], v. 2018, n. 3, p.80-82, mar. 2018.

RISITANO, Antonio M.. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: SILVERBERG, Donald (Ed.). **Anemia**. [S.l.]: Intech, 2012. Cap. 22, p. 331-374.

ROCHA, Juliana Maria Camargos. **Análise da expressão de moléculas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (gpi) em diferentes linhagens celulares, em pacientes com anemia aplásica e síndrome mielodisplásica**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina na especialidade Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

RODRIGUES, Bernardete Maria Torres. **Fisiopatologia, diagnóstico e novas terapêuticas da Hemoglobinúria paroxística noturna**. 2011. 34 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2011.

ROLDÁN, María Teresa Milanés et al. Hemoglobinuria paroxística noturna. Actualización. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, [S.l.], v. 19, n. 1, abr. 2003.

ROSTI, Vittorio. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Haematologica**, Pavia, v. 85, n. 1, p.82-87, jan. 2000.

RÖTH, Alexander; DÜHRSEN, Ulrich. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of eculizumab. **European Journal Of Haematology**, [S.l.], v. 87, n. 6, p.473-479, dez. 2011.

SANTOS, Diana Andreia da Cruz Ferreira dos. **Pesquisa de clones de hemoglobinúria paroxística noturna em medula óssea de síndromes**

mielodisplásicas. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública na especialidade Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial) - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Coimbra, 2013.

SOUZA, Carlos Eduardo Rêgo de. **Diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna, por citometria de fluxo, em pacientes atendidos na fundação hemopa**. 2009. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

SOCIÉ, G. et al. Changing prognosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria disease subcategories: an analysis of the International PNH Registry. **Internal Medicine Journal**, [S.I.], v. 46, n. 9, p.1044-1053, set. 2016.

SHARMA, Ruby et al. Successful pregnancy outcome in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) following escalated eculizumab dosing to control breakthrough hemolysis. **Leukemia Research Reports**, [S.I.], v. 4, n. 1, p.36-38, mai. 2015.

TICHELLI, André' et al. Outcome of Pregnancy and Disease Course among Women with Aplastic Anemia Treated with Immunosuppression. **Annals Of Internal Medicine**, [S.I.], v. 137, n. 3, p.164-172, ago. 2002.

TOWNSLEY, Danielle M.; YOUNG, Neal S. Blood consult: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and its complications. **Blood**, [S.I.], v. 122, n. 16, p.2795-2798, set. 2013.

THURMAN, J. M.; HOLERS, V. M.. The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease. **The Journal Of Immunology**, [S.I.], v. 176, n. 3, p.1305-1310, jan. 2006.

VEERREDDY, Prashanti. Hemoglobinuria Misidentified as Hematuria: Review of Discolored Urine and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Clinical Medicine Insights: Blood Disorders**, [S.l.], v. 6, p.7-17, jan. 2013.

ZEINAD-VALIM, Audrey Kruse. **Análise da geração de trombina em uma população de indivíduos com clone HPN (Hemoglobinúria Paroxística Noturna)**. 2015. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.