

FERNANDA PINTO NUNES DA SILVA

*Centro Universitário das Faculdades
Metropolitanas Unidas, FMU, São Paulo, SP,
Brasil.*

RAYANE FELIX JESUS SOARES

*Centro Universitário das Faculdades
Metropolitanas Unidas, FMU, São Paulo, SP,
Brasil.*

PAOLO RUGGERO ERRANTE

*Universidade de São Paulo, USP, São Paulo,
SP; Universidade Federal de São Paulo,
UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.*

*Recebido em fevereiro de 2019.
Aprovado em maio de 2019.*

ATUALIZAÇÃO SOBRE O DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA

RESUMO

Introdução: A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma anemia hemolítica que se manifesta na forma de hemoglobinúria, dor abdominal, distonias dos músculos lisos, fadiga e trombose. A doença é causada pela expansão de células-tronco hematopoiéticas portadoras de mutação no gene PIG-A, que codifica uma proteína necessária para a biossíntese da âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), que liga proteínas à superfície celular. Esta deficiência nos eritrócitos leva a hemólise intravascular, uma vez que as proteínas ancoradas a GPI, CD55 e CD59, funcionam como reguladores da atividade de proteínas do Sistema Complemento. A hemoglobina liberada pela hemólise intravascular leva à depleção de óxido nítrico circulante, sendo responsável por muitas das manifestações clínicas da HPN, como fadiga, disfunção erétil, espasmo esofágico e trombose. **Método:** A revisão foi realizada por base de dados bibliográficos obtidos através da pesquisa em LILACS, MEDLINE e PubMed. **Resultados:** O diagnóstico laboratorial através de citometria de fluxo aumentou a sensibilidade diagnóstica da HPN, e o tratamento com o anticorpo monoclonal Eculizumab possibilita a redução das manifestações clínicas. **Conclusão:** O uso do Eculizumab e o aprimoramento no diagnóstico da HPN por citometria de fluxo proporcionam grandes benefícios aos pacientes, como melhora na qualidade de vida e aumento da expectativa de vida.

Palavras-Chave: hemoglobinúria paroxística noturna; pig-a; sistema complemento; cd55; cd59; hemólise intravascular.

UPDATE ON THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA

ABSTRACT

Introduction: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a hemolytic anemia manifested in the form of hemoglobinuria, abdominal pain, smooth muscle dystonias, fatigue, and thrombosis. The disease is caused by the expansion of hematopoietic stem cells that carry a mutation in PIG-A gene, which encodes a protein glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) required for biosynthesis anchor, which binds proteins to the cell surface. This deficiency in erythrocytes leads to intravascular hemolysis, because proteins anchored to GPI, CD55 and CD59 function as regulators of complement system's protein activity. Hemoglobin released by intravascular hemolysis leads to depletion of circulating nitric oxide and is responsible for many of clinical manifestations of PNH, such as fatigue, erectile dysfunction, esophageal spasm and thrombosis. **Method:** The review was performed by bibliographic database obtained through the research in LILACS, MEDLINE and PubMed. **Results:** The laboratory diagnosis through flow cytometry increased the diagnostic sensitivity of PNH, and treatment with monoclonal antibody Eculizumab allows the reduction of clinical manifestations. **Conclusion:** The use of Eculizumab and improvement in the diagnosis of PNH by flow cytometry provide great benefits to patients, such as improvement in quality of life and increase in life expectancy.

Keywords: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; pig-a; complement system; cd55; cd59; intravascular hemolysis.

INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma anemia hemolítica causada pela ausência de proteínas reguladoras do Sistema Complemento na superfície de células hematopoiéticas, causada por mutações somáticas que acometem o gene fosfotilinositolglicano (PIG-A), localizado no cromossomo Xp22.2 (BRODSKY, 2014).

A HPN difere das anemias hemolíticas por não ser confinada apenas aos eritrócitos, sendo uma doença que acomete células tronco do sistema hematopoiético. A HPN é uma doença clonal (com PIG-A mutante servindo como marcador clonal), não sendo uma doença maligna (FONTBRUNE, LATOUR, 2018).

O gene PIG-A é essencial para a biossíntese da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo esta âncora responsável pela ligação de proteínas que regulam a ativação do Sistema Complemento (CD55 e CD59) (KORKAMA et al., 2018).

A ausência desta âncora na superfície das células hematopoiéticas leva ao surgimento de hemólise intravascular, anemia hemolítica, hematúria, citopenias, trombose, dor abdominal e fadiga (BRODSKY, 2018). A tríade anemia hemolítica, pancitopenia e trombose é típica da HPN (KORKAMA et al., 2018).

Os principais agravantes na HPN são a anemia aplásica (43,5%), Síndrome mielodisplásica (5,8%), mielofibrose (1,4%), eventos trombóticos (15,5%) e comprometimento na função renal (13,9%) (SCHREZENMEIER et al., 2014). As principais causas de morte em pacientes com HPN estão associadas a quadros de trombose, infecções, neoplasias, e hemorragia fatal em pacientes com trombocitopenia (HILL et al., 2017).

O diagnóstico laboratorial padrão ouro da HPN é realizado através da citometria de fluxo (CORREIA et al., 2016). A principal forma de tratamento consiste na utilização do anticorpo monoclonal Eculizumab, que inibe a via terminal do Sistema Complemento, impedindo a formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) (FONTBRUNE, LATOUR, 2018).

EPIDEMIOLOGIA

Nos Estados Unidos da América do Norte estima-se que ocorram de um a cinco casos a cada um milhão de habitantes (NOMURA et al., 2004). Acredita-se que seja mais frequente no sul da Ásia e dentre os indivíduos orientais. A HPN pode ocorrer em qualquer idade, embora a maioria dos pacientes apresente diagnóstico definitivo somente entre a quarta e a quinta década de vida. Crianças e adolescentes constituem 10% dos casos e frequentemente apresentam bicytopenia ou pancitopenia, enquanto a trombose ocorre com igual frequência em todos os grupos etários. A HPN afeta homens e mulheres na mesma proporção, não sendo observada predisposição familiar (SOCIE et al., 1996; NOMURA et al., 2004; PARKER et al., 2016).

As manifestações de falência medular em pacientes com HPN são mais comuns em asiáticos, enquanto trombose e infecção são mais frequentes em europeus e americanos (SOCIE et al., 1996; PARKER et al., 2016).

Um estudo publicado em 2012 pelo Registro Internacional de HPN, apontou 1610 pacientes com a doença, oriundos de 25 países. Neste mesmo estudo, foi verificada uma idade média da doença de 42 anos, sendo 53,2% dos pacientes do sexo feminino (SUTHERLAND, KEENEY, LINGTON, 2012).

BASES GENÉTICAS

A HPN do tipo 1 (HPN1) (Mendelian inheritance in man/MIM número 300818) é causada pela expansão clonal não maligna de uma ou mais células-tronco hematopoiéticas que apresentam mutação somática no gene PIG-A que codifica a fosfatidilinositol

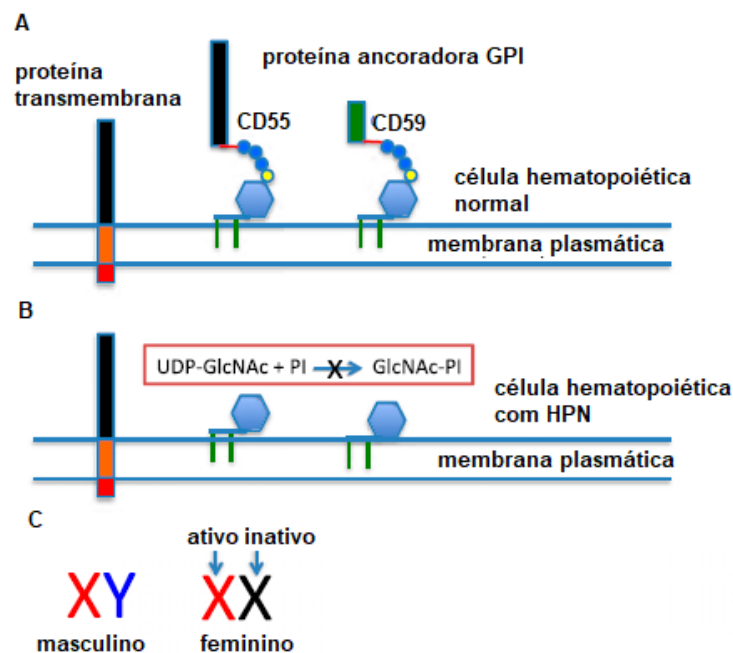
glicana classe-A (phosphatidyl inositol glycan-class A), localizado no braço curto do cromossomo Xp22.2 (gene/lócus MIM número 311770) (Figura 1A, 1B) (HILL et al., 2017).

O gene PIG-A está ligado ao cromossomo X, permitindo que uma mutação somática nas células hematopoiéticas seja suficiente para produzir o fenótipo de HPN. A maior parte das mutações de PIG-A estão localizadas na região de codificação do gene (BRODSKY, 2014).

Como consequência desta mutação são afetados diferentes tipos de células da linhagem hematopoiética como eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e linfócitos (ARRUDA et al., 2010).

Uma heterogeneidade genética da HPN pode ser observada na HPN do tipo 2 (HPN2) (Mendelian inheritance in man/MIM número 615399) causada por mutações somáticas que envolvem o gene PIG-T localizado no cromossomo 20q13 (gene/lócus MIM número 610272) (KRAWITZ et al., 2013).

Figura 1. Base molecular da PNH.



A. Célula hematopoiética normal expressando proteínas transmembrana ancoradas pela GPI.

B. Célula hematopoiética com fenótipo PNH expressa proteína transmembrana, mas não expressa GPI, pois o gene PIG-A codifica a enzima necessária para a transferência do UDP-GlcNAc para o PI, que leva a biossíntese da âncora de GPI.

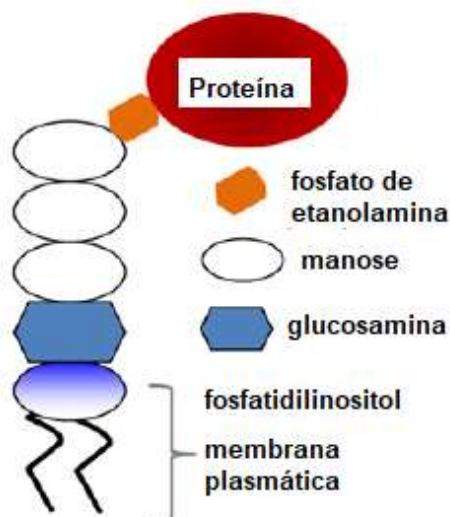
C. Como pacientes do sexo masculino têm 1 cromossomo X e feminino 2 cromossomos em células somáticas, a inativação de 1 alelo é suficiente para levar ao fenótipo de HPN.

UDP=di fosfato de uridina; GlcNAc=di fosfato de uridina N-acetilglicosamina; PI=fosfatidilinositol glicana classe A.

Fonte=PARKER, 2016.

Dos mais de 25 genes envolvidos na síntese da âncora GPI, somente o PIG-A está localizado no cromossomo X (todos os outros são autossômicos), sendo necessário apenas um evento mutacional para produzir o fenótipo, uma vez que homens possuem apenas 1 cromossomo X, e mulheres 2 cromossomos X em células somáticas (Figura 1C). Uma vez que todos os outros genes envolvidos na síntese da GPI são autossômicos, são necessários dois eventos mutacionais para impedir a síntese da âncora de GPI e fenótipo HPN (PARKER, 2016). Assim, as mutações que envolvem o gene PIG-A são consideradas as causas mais comuns que impedem a síntese da âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Figura 2) e surgimento do fenótipo de HPN.

Figura 2. Estrutura da âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI).



O fosfatidilinositol (PI) é ancorado a bicamada fosfolipídica da membrana plasmática. O núcleo de glicano consiste de uma molécula de N-glucosamina, três moléculas de manose e uma molécula de fosfato de etanolamina. A proteína é covalentemente ligada através de uma ligação amida a uma etanolamina no terminal manose.

Fonte: BRODSKY, 2008; ARRUDA et al., 2010.

A ausência de uma molécula madura de GPI leva a ausência de proteínas de superfície ancoradas por esta molécula. Em pacientes com HPN, as células sanguíneas oriundas do clone afetado possuem algum grau de deficiência, que pode ser parcial (com 10% da expressão normal da GPI) ou total (ausência completa da expressão de GPI) (DEVALET et al., 2015). Dentre as proteínas ancoradas pela GPI estão CD55 e CD59, que controlam a ativação da cascata do Sistema Complemento (FONTBRUNE, LATOUR, 2018).

A proteína CD55 (decay accelerating factor ou fator acelerador de decaimento/DAF) inibe a ativação do Sistema Complemento em C3, acelerando a taxa de destruição de C3-convertase ligada à membrana, reduzindo a quantidade de C3 dissociada a C3a e C3b (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2017).

A proteína CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis ou inibidor de membrana de lise reativa/MIRL) é uma glicoproteína que interage com o complexo de ataque à membrana (MAC ou C5b-9) impedindo a formação do poro lítico a partir da agregação de C9. A ausência de CD59 na superfície dos eritrócitos torna-os susceptíveis a lise mediada pelo MAC, levando a hemólise intravascular crônica. A proteína CD59 é a mais importante na proteção contra lise celular mediada pelo Sistema Complemento (DEVALET et al., 2015).

SI SISTEMA COMPLEMENTO

O Sistema Complemento é formado por mais de 30 proteínas séricas, fazendo parte da resposta imune inata (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001; UTIYAMA et al., 2004).

O Sistema Complemento não destrói células autólogas, uma vez que existem fatores reguladores de superfície celular e plasmáticos. Estas proteínas são conhecidas como proteínas reguladoras do Sistema Complemento, e são responsáveis pela defesa das células do hospedeiro contra a ativação inadvertida do Sistema Complemento (BRODSKY, 2008).

A alteração funcional ou quantitativa em uma ou mais proteínas reguladoras tem relevância no desenvolvimento de várias doenças, como tromboembolismo, insuficiência renal, hemólises intravasculares e extravasculares (ITURRY-YAMAMOTO, PORTINHO, 2001).

A ativação do Sistema Complemento ocorre através de três vias: Via Clássica (dependente de anticorpos IgG ou IgM), Via Alternativa (ativação espontânea de C3 a amplificação via H₂O tickover), e Via das Lectinas (ativação após deposição da proteína ligadora de manose/MBL sobre resíduos terminais de manose). Cada uma delas é iniciada a partir da junção de um componente sérico do Sistema Complemento com a superfície de um patógeno distinto, ou dependente de anticorpo (BRODSKY, 2008; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2017).

A ativação do Sistema Complemento é realizada em forma de cascata, onde a ativação de um componente induz ativação no componente seguinte. Deste modo, as três vias do Sistema Complemento se iniciam por caminhos distintos, mas se convergem para a clivagem de C3 que auxilia na formação de C3b (BRODSKY, 2008).

A via clássica é ativada na presença de anticorpos IgG ou IgM ligados a uma superfície celular. C1 é o primeiro componente a ser ativado, sendo uma proteína formada por subunidades de C1r, C1q e C1s. Esta sequência ocorre por meio de uma atividade serino-protease produzida pela ligação de C1 aos anticorpos IgG e/ou IgM. A ativação de C1s exibe um sítio catalítico, permitindo a clivagem de C4, formando C4a e C4b. Depois C2 é clivado produzindo C2a e C2b, C2a se liga na C4b formando a C4b2a ou C3 convertase da via clássica. A C3 convertase se liga C3b, formando C4b2a3b, ou C5 convertase da via clássica. A seguir ocorre a ligação de C6, C7, C8 e C9, formando o complexo de ataque a membrana (MAC) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

A proteína C3b é uma opsonina, responsável pela produção de fragmentos proteicos que facilitaram a fagocitose de microrganismos, uma vez que os fagócitos possuem receptores específicos para C3b. A clivagem de C3 também produz C3a, uma anafilatoxina, que induz os eventos vasculares da resposta inflamatória aguda (RICKLIN et al., 2016).

A ativação da via alternativa é realizada pela deposição de C3b na superfície de microrganismos; esta deposição permite a ligação do fator B que será clivado pelo fator D gerando o fragmento Bb. Depois desta clivagem ocorre uma alça de amplificação (tickover) envolvendo o componente C3, formando mais moléculas de C3b e C3bBb, que se ligam a superfície dos microrganismos até que formarem uma C5 convertase, que cliva C5 e inicia a formação do MAC (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2017).

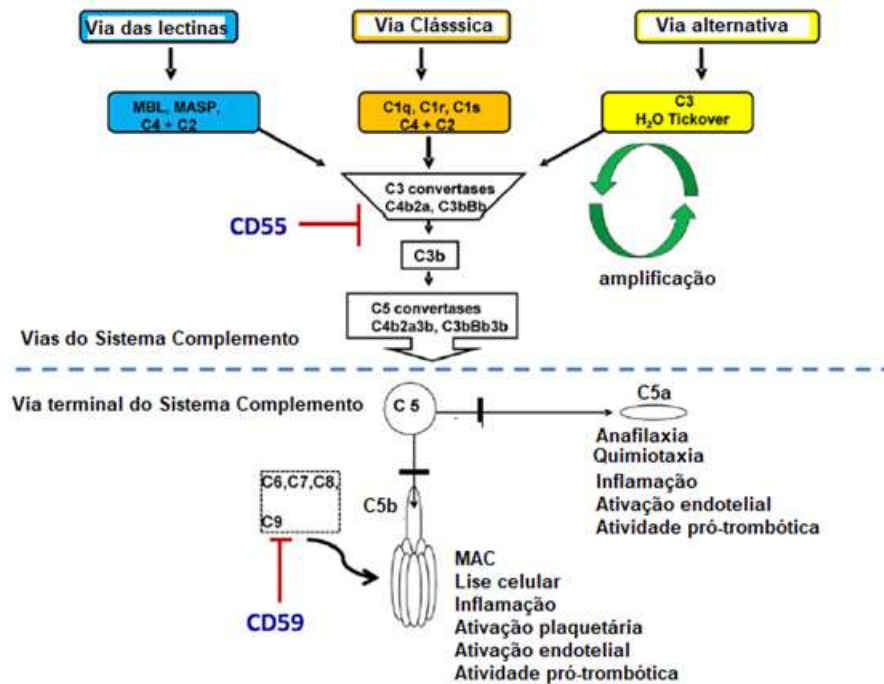
A via Alternativa conserva um modo de ativação baixo, mas de maneira contínua, explicando em parte a hemólise crônica contínua nos pacientes com HPN (ARRUDA et al., 2010).

A Ativação da via das Lectinas ocorre através da fixação da proteína ligadora de manose (mannose binding lectin/MBL) a superfície microbiana. A proteína MBL é caracterizada pela facilidade de ligar-se aos resíduos de manose e de N-acetilglicosamina encontradas na superfície dos microrganismos. A proteína MBL está associada a três serino-proteases: MASP-1, MASP-2, MASP-3, que são ativadas quando MBL se liga aos resíduos de manose e de N-acetilglicosamina dos microrganismos, levando a clivagem de C4 em C4a e C4b, e C2 gerando C2a e C2b. Como resultado da ação MBL-MASP ocorre a formação de C3 convertase e C5 convertase, e depois a formação do MAC (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

Dentre as proteínas do Sistema Complemento, existem duas proteínas reguladoras importantes na fisiopatogenia da HPN, CD55, que impede a formação de C3 convertase e C5 convertase; e CD59, que se liga a C5b-8 e C5b-9, bloqueando a formação do MAC (LISZEWSKI, ATKINSON, 2017).

O CD55 se encontra ancorado na superfície da membrana plasmática das células circulantes do sangue, endotélio vascular e células epiteliais, regulando a formação das convertases C3 e C5. O CD59 está localizado na superfície das células sanguíneas, células glomerulares, epiteliais, endoteliais e espermatozoides. Esta proteína impede a formação do poro lítico a partir da agregação de C9, impedindo a formação do MAC (Figura 3) (CORREIA et al., 2016).

Figura 3. Ativação do Sistema Complemento.



O Sistema Complemento é ativado pelas Vias Clássica, Alternativa e Lectinas, que geram C3 convertases e depois C5 convertases, culminando com a formação do complexo de ataque a membrana (MAC). Produtos da ativação do complemento, como C5a, e MAC são importantes na participação da resposta inflamatória e na fisiopatogenia da HPN.

Fonte: BRODSKY, 2008.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HPN

O termo hemoglobinúria paroxística noturna refere-se à destruição de eritrócitos com liberação de hemoglobina na urina, que possui coloração marrom-escura na primeira urina da manhã. O termo “noturna” se refere à crença inicial de que a hemólise seria desencadeada por acidose durante o sono que ativaria o Sistema Complemento, levando a destruição de eritrócitos com membrana celular desprotegida. A hemólise acontece durante todo o dia, mas a observação de hemoglobinúria ocorre pela manhã por causa do aumento da concentração urinária durante a noite (KORKAMA et al., 2018; MASTELLOS et al., 2018).

A HPN tem sido descrita na forma de três manifestações clínicas distintas, que influenciam a confiabilidade da classificação do diagnóstico clínico através da utilização da técnica de citometria de fluxo (BRODSKY, 2014; CORREIA et al., 2016).

As três manifestações clínicas da HPN são a HPN clássica, HPN associada a anemia aplásica e HPN subclínica (DEVALET et al., 2015). A HPN clássica é caracterizada pela presença de anemia hemolítica intravascular crônica, causada pela ativação contínua do Sistema Complemento (DEVALET et al., 2015). Na HPN clássica também ocorre trombose (BRODSKY, 2014), mas não existem relatos de falha da medula óssea, uma vez que a taxa de neutrófilos se encontrar superior a 1500/IL e plaquetas superior a 120.000/IL de sangue. Porém 35% dos pacientes apresentam disfagia, dor abdominal e disfunção erétil (DEVALET et al., 2015).

A HPN associada a anemia aplásica está associada a insuficiência da medula óssea. Neste tipo de HPN estão presentes sinais e sintomas de anemia aplásica e síndrome mielodisplásica (BRODSKY, 2014; DEVALET et al., 2015; FONTBRUNE, LATOUR, 2018). Os pacientes que se enquadram neste caso clínico possuem clones de células hematopoiéticas com tamanho celular < 10% em relação ao tamanho normal, e uma alta

probabilidade de apresentarem uma resposta imunossupressora durante o tratamento com o Eculizumab (DEVALET et al., 2015; FONTBRUNE, LATOUR, 2018).

Na HPN subclínica os primeiros clones hematopoiéticos gerados pela medula óssea apresentam tamanho celular inferior a 1%, tornando esta manifestação assintomática com um hemograma aparentemente normal ou quase normal, e ausência de hemólise (BRODSKY, 2014; DEVALET et al., 2015).

HEMÓLISE

A hemólise corresponde a destruição com consequente diminuição quantitativa dos eritrócitos. Esta diminuição geralmente é compensada por um processo medular reacional conhecido por hiperregeneração, que consiste na multiplicação dos eritrócitos, seis a oito vezes superior que o normal. Se esta sobrevida ainda permanecer baixa, ocorre a anemia hemolítica (ARRUDA et al., 2010).

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é um quantificador de hemólise nos pacientes com HPN. Geralmente encontra-se elevada e pode ultrapassar 20 vezes o valor normal durante os episódios de hemólise intensa. A HPN pode ser classificada de acordo com a taxa de hemólise (Tabela 1) (ARRUDA et al., 2010).

Tabela 1. Classificação da HPN conforme taxa de hemólise presente e consequentemente ação sobre a medula óssea.

Classificação	Taxa de hemólise	Medula óssea
HPN clássica	Alta (hemoglobinúria macroscópica)	Hiperplasia eritróide, morfologia celular normal
HPN associada a anemia aplástica	Leve a moderada (hemoglobinúria macroscópica ausente ou inconstante)	Concomitante falha medular
HPN subclínica	Ausência clínica ou laboratorial de hemólise	Concomitante falha medular

Fonte: ARRUDA et al., 2010.

HEMÓLISE INTRAVASCULAR

A ausência da proteína CD55 induz o mecanismo de hemólise intravascular por conta do aumento na atividade da C3 convertase na superfície dos eritrócitos, levando a formação do MAC (BRODSKY, 2014).

Na HPN a hemólise intravascular é considerada a manifestação mais comum da doença (MASTELLOS et al., 2018). Também existe hemólise intravascular mediada pelo Sistema Complemento devido à ausência de CD59 nos eritrócitos na HPN (BRODSKY, 2014).

HEMÓLISE EXTRAVASCULAR

Os fragmentos do componente de C3b responsáveis pela opsonização dos eritrócitos na HPN são responsáveis pela hemólise extravascular na doença. Esta enfermidade possui relação com a hemólise em pacientes com HPN tratados com Eculizumab (BRODSKY, 2014).

HEMOGLOBINÚRIA

A hemoglobinúria é um sintoma caracterizado pela presença de altas concentrações de hemoglobina na urina. A hemoglobina é uma proteína responsável pelo transporte de oxigênio no interior das hemácias pelo sangue. A hemoglobinúria muitas vezes está associada à anemia hemolítica, onde as hemácias são destruídas e liberam sua hemoglobina no plasma. Como o excesso de hemoglobina é filtrado pelos rins, a

hemoglobina em excesso passa a ser eliminada na urina, conferindo-lhe uma cor vermelha (ARRUDA et al., 2010).

ANEMIA HEMOLÍTICA

A anemia hemolítica é consequência da hemólise recorrente que sobrecarrega a medula óssea na produção de mais células. A presença de hemoglobina nos casos de anemia hemolítica ocorre por conta da oxidação da hemoglobina livre, onde a mesma se une a albumina formando um novo composto (ARRUDA et al., 2010).

ANEMIA APLÁSICA

Na HPN, a anemia aplásica é causada por danos diretos às células da medula óssea, que pode levar a atrofia do parênquima medular, acarretando pancitopenia (ARRUDA et al., 2010). A anemia aplásica está associada a presença de clones celulares com fenótipos de HPN. Cerca de 40 a 60 % dos pacientes com HPN apresentam duas manifestações concomitantemente, hemoglobinúria e anemia aplásica (GRIFFIN et al., 2018).

INSUFICIÊNCIA RENAL

A insuficiência renal presente em alguns pacientes ocorre através da redução dos níveis de óxido nítrico (NO) e deposição de ferro ocasionando trombose microvascular sucessiva e lesão trombolítica repetida dos rins, podendo levar a falência renal por dano tubular (BRODSKY, 2014).

A insuficiência renal aguda normalmente está associada a crises hemolíticas graves e microtrombose vascular renal acompanhada de febre e dores abdominais, podendo também estar acompanhada de hemoglobinúria, hematúria, proteínúria, hipertensão arterial sistêmica e alterações no sedimento urinário (KOKORIS et al., 2018).

Alguns pacientes com insuficiência renal aguda podem apresentar uma associação com quadro de choque hipovolêmico, septicemia e pielonefrite. Também a insuficiência renal aguda pode estar associada a casos de reação pós-transfusional (OLUTOGUN et al., 2015).

DISTÚRBIOS RELACIONADOS A REDUÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

O NO é um mediador da fisiologia vascular envolvido diretamente com manifestações clínicas da HPN como astenia, dor abdominal, disfunção erétil, espasmo esofágico, disfagia e trombose (BRODSKY, 2014; DEVALET et al., 2015).

Estas manifestações clínicas são consequência direta da hemólise intravascular, responsável por elevar os níveis de hemoglobina livre no plasma, responsável pela depleção do NO. A deficiência de NO contribui para desregulação do músculo liso, ativação plaquetária e comprometimento do sistema fibrinolítico, levando ao surgimento de eventos trombóticos (HILL, KELLY, HILLMEN, 2013).

O aumento do consumo de NO por conta da hemoglobina livre no plasma também influencia o desenvolvimento arterial, promovendo diminuição do fluxo sanguíneo renal, agravando a insuficiência renal, hipertensão pulmonar e hipertensão arterial (DEVALET et al., 2015).

TROMBOSE

A trombose é descrita como a principal causa de morte dos pacientes com HPN (DEVALET et al., 2015). Nestes pacientes pode ser observada a Síndrome de Budd-Chiari ou trombose venosa sub-hepática, que se manifesta na forma de dor abdominal,

hipertensão portal, hepatomegalia e ascite causados pela obstrução venosa do sistema venoso hepático. A enfermidade pode evoluir para varizes esofágicas, encefalopatia hepática e coagulopatia em função da insuficiência hepática (GRUS et al., 2017). Também pode ser observada trombose venosa cerebral (MEPPIEL et al., 2015).

Na HPN a lise das hemácias leva a liberação de hemoglobina livre e arginase eritrócitaria no plasma, que depletam o óxido nítrico (NO) e a arginina, um substrato para a síntese da enzima óxido nítrico sintetase endotelial, que utiliza oxigênio e arginina para a produção de NO (KAHN et al., 2013).

Os altos níveis de hemoglobina alteram a homeostase do NO, pois a hemoglobina livre possui grande afinidade pelo NO, levando a depleção do NO e acúmulo de plaquetas sobre as células endoteliais e formação de trombos (BRODSKY, 2014).

DIAGNÓSTICO

Até a metade do século XX a confirmação clínica de HPN era estabelecida através de ensaios laboratoriais capazes de identificar a presença de hemólise dos eritrócitos, como o teste de Ham e o de osmolaridade (ARRUDA et al., 2010; DEVALET et al., 2018).

A dificuldade no diagnóstico de HPN é recorrente, por conta da positividade do teste de hemoglobina na análise de urina. O correto neste procedimento é que não haja a presença de eritrócitos sedimentados, mas os analistas acabam deduzindo que este fato pode ser causado por uma hemólise *in vitro*, e descrevem o ocorrido no laudo como eritrócitos inexistentes no sedimento, tornando o diagnóstico final falso negativo (ARRUDA et al., 2010).

Atualmente o diagnóstico ouro da HPN é realizado através da utilização da técnica de citometria de fluxo, capaz de detectar a ausência de GPI e proteínas CD55 e CD59 na superfície das células sanguíneas (CORREIA et al., 2016).

TESTE DE HAM (HEMOLISE NA ÁCIDA)

O teste de Ham busca avaliar eritrócitos incubados com plasma levemente ácido, pH 6,2 (NOMURA et al., 2004; ARRUDA et al., 2010). Por conta da acidez do plasma, as células sofrem hemólise pela ativação do Sistema Complemento (ARRUDA et al., 2010). Muito utilizado no passado, o teste de Ham se tornou menos específico pois não consegue identificar clones pequenos com tamanho inferior a <5% em relação ao tamanho normal (NOMURA et al., 2004; ARRUDA et al., 2010).

TESTE DE OSMOLARIDADE (LISE POR SACAROSE)

No teste de osmolaridade ou lise por sacarose, quando a sacarose é adicionada ao soro normal, induz a ativação da via Clássica do Sistema Complemento, causando a hemólise de eritrócitos. O teste de lise por sacarose possui mais sensibilidade que o teste de Ham, porém apresenta menor especificidade (ARRUDA et al., 2010).

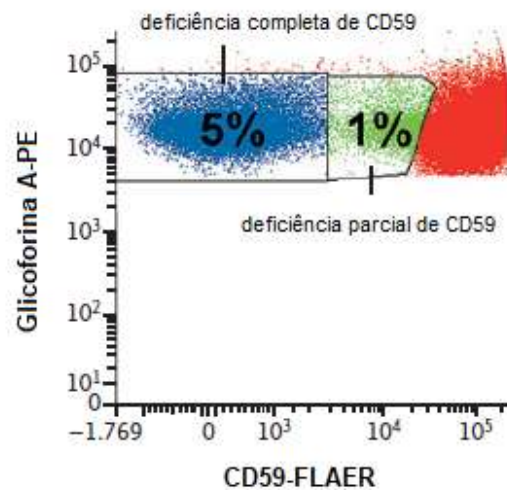
CITOMETRIA DE FLUXO

A Citometria de fluxo (CF) é considerado o teste padrão ouro para o diagnóstico de HPN. Esta técnica tem como princípio a contagem individual de células e identificação de biomarcadores acoplados a anticorpos monoclonais dirigidos contra proteínas de superfície celular (CORREIA et al.; 2016). A CF utiliza anticorpos monoclonais específicos que são dirigidos contra as proteínas CD55 e CD59 ancoradas na superfície de células sanguíneas como eritrócitos, leucócitos e plaquetas (MODESTO et al., 2006).

O teste de CF possui alta sensibilidade e especificidade, com alta capacidade de detectar clones menores que 0,1% em relação ao tamanho normal, através da análise quantitativa das proteínas ancoradas pelo GPI (CORREIA et al., 2016).

Os marcadores utilizados para o diagnóstico são dirigidos contra as moléculas de superfície CD55 e CD59. Na CF pode ser utilizada a proaerolisi na marcada com fluoresceína (FLAER) que tem se mostrado específica para o diagnóstico de HPN, pois se liga a porção glicosami na do GPI (Figura 4) (SYKES et al., 2017).

Figura 4. Citometria de fluxo para CD59 utilizando FLAER.



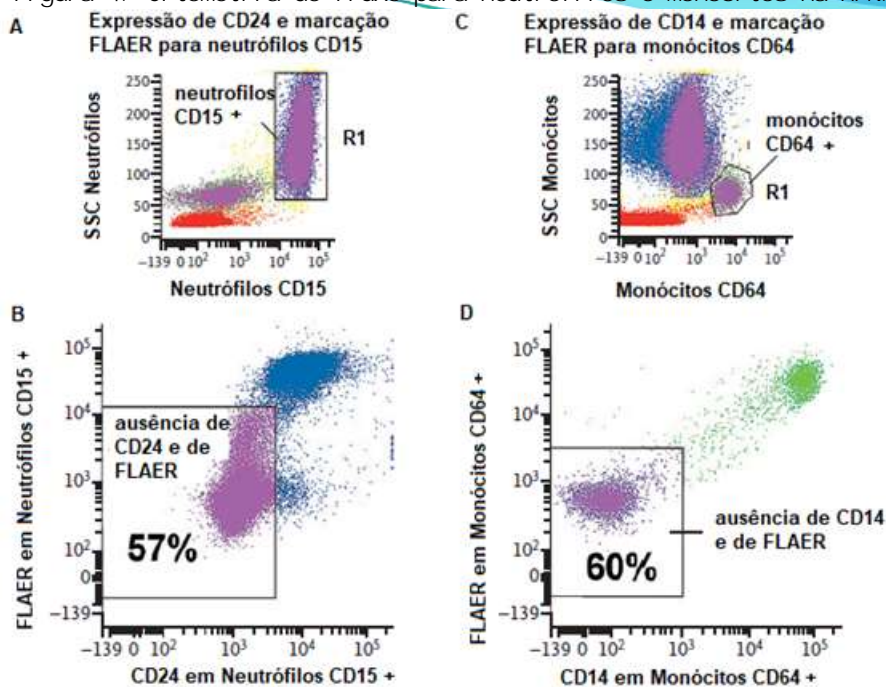
O dot plot representa a marcação de eritrócitos com glicoforina A (si alo glicoproteína de membrana de eritrócitos) marcados com PE (fi coeritri na), e CD59 marcado com FLAER (proaerolisi na marcada com fluoresceína), com células apresentando deficiência completa de CD59 em azul (5%, células do tipo II), e deficiência parcial de CD59 em verde (1%, células do tipo III).

Fonte: SYKES et al., 2017.

A retirada de sangue periférico deve ser realizada em tubo para coleta de sangue contendo com ácido etilendiaminotetracético (EDTA), para evitar possíveis falso-negativos por conta do estado de maturação das células. Análises mais adequadas são feitas em populações celulares que permitem a identificação da ausência das proteínas ancoradas, como neutrófilos, monócitos e eritrócitos (ROCHA et al., 2014; CORREIA et al., 2016).

Não se deve utilizar o reagente FLAER na avaliação dos clones de HPN apenas para a avaliação da linhagem de eritrócitos, sendo indicada também a marcação de neutrófilos e monócitos (Figura 5) (CORREIA et al., 2016; SYKES et al., 2017).

Figura 4. Citometria de fluxo para neutrófilos e monócitos na HPN.



A. Dot plot para expressão de SSC (marcador de complexidade e granulocidade plasmática) em neutrófilos CD15+, e criação de janela R1.

B. A partir da janela R1, visualização da marcação FLAER e CD24 em neutrófilos CD15+, onde 57% dos neutrófilos (roxo) apresentam ausência de CD24 e de marcação FLAER, confirmando a presença de clone de HPN.

C. Dot plot para expressão de SSC (marcador de complexidade e granulocidade plasmática) em monócitos CD64+, e criação da janela R1.

D. A partir da janela R1, visualização da marcação FLAER e CD64 em monócitos CD14+, onde 60% dos monócitos (roxo) apresentam ausência de CD14 e de marcação com FLAER, confirmando a presença de clone de HPN.

CD14=Marcador de monócitos; CD15=Marcador de granulócitos maduros; CD24=Marcador de neutrófilos; CD64=Receptor para a porção Fc da IgG (FcγRI) presente na superfície de monócitos, eosinófilos e neutrófilos.

Fonte: SYKES et al., 2017.

Os linfócitos e plaquetas não são células indicadas para a realização de FC na HPN por conta do tamanho celular, e também porque as plaquetas expressam constitutivamente baixas quantidades de CD55 e CD59 (CORREIA et al., 2016).

TRATAMENTO

O tratamento da HPN é baseado nas perdas hematológicas que o paciente apresenta durante o curso da doença, onde podem ser realizadas transfusões sanguíneas, suplementação de ferro e ácido fólico, e profilaxia para a trombose pelo uso de anti-coagulantes. Pacientes com HPN com manifestação clínica e laboratorial de anemia aplásica recebem indicação da utilização de fármacos imunossupressores de primeira linha (ARRUDA et al., 2010; DEVALET et al., 2015).

A maioria dos pacientes com HPN são ferropênicos, devido a perda contínua de ferro na urina (hemossiderinúria), sendo importante a reposição de ferro para o processo de eritropoiese. Contudo a administração de ferro pode induzir um aumento de hemólise relacionado com a produção de hemácias novas (ARRUDA et al., 2010). Também é recomendada a reposição de folatos, que são privados pelo aumento da eritropoiese secundária a hemólise crônica (HILL et al., 2017).

A recorrente hemólise intravascular na HPN e a presença de grandes clones de células da HPN estão associados a trombose, sendo indicado tratamento profilático com varfarina ou acenocumarol (ARRUDA et al., 2010).

A utilização do anticorpo monoclonal Eculizumab no tratamento da HPN levou ao aumento na qualidade e expectativa de vida dos pacientes, modificando a taxa de mortalidade da doença (DEVALET et al., 2015).

ECULIZUMAB

O Eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante que bloqueia C5, prevenindo a formação do MAC (DEVALET et al., 2015; MASTELLOS, 2018), compensando a deficiência de CD59, mas não a deficiência de CD55 da superfície da membrana plasmática dos eritrócitos de pacientes com HPN (BRODSKY, 2014).

Esta compensação de CD59 ocorre quando a clivagem da proteína C5 em C5a e C5b é inibida, possibilitando a diminuição da permeabilidade dos vasos sanguíneos, pavimentação e diapedese de leucócitos em função da ausência de C5a. Com a ausência de C5b não ocorre a formação do MAC e hemólise intravascular (DUBOIS; COHEN, 2009).

A redução na atividade hemolítica leva a diminuição da hipertensão pulmonar, recuperação da função renal, melhora na distonia muscular e aumento nos níveis de ferro pela diminuição da hemólise intravascular nos pacientes com HPN (MCKEAGE, 2011).

O Eculizumab também promove a diminuição dos níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH), um indicador de hemólise intravascular, da anemia e fadiga, reduzindo a necessidade de transfusões (ARRUDA et al., 2010; BRODSKY, 2014).

Sua atividade não é influenciada pela idade, sexo, raça ou função renal do paciente (MCKEAGE, 2011).

O tratamento inicial para adultos é estabelecido com a utilização de uma dosagem de 600 mg por via intravenosa por semana durante quatro semanas, com duração de 25 a 45 minutos de tempo de infusão. Após este período, é estabelecida a fase de manutenção, onde deve-se aumentar a dose para 900 mg, com duração de 25 a 45 minutos de tempo de infusão.

Após a quinta semana, a dose de 900 mg deve ser mantida e aplicada a cada duas semanas, sob a forma de tratamento de longo prazo. Cada infusão deve acontecer no período de 25 a 45 minutos, e após o término o paciente deve ser monitorado por cerca de uma hora (MCKEAGE, 2011).

Durante as primeiras quatro semanas deve ser realizado hemograma completo, contagem de reticulócitos, dosagem sérica de lactato desidrogenase e avaliação do perfil bioquímico semanalmente (FONTBRUNE, LATOUR, 2018).

Com o tratamento, grande parte dos pacientes passam a ser independentes de transfusões, ocorrendo melhora significativa na incidência de quadros de fadiga (MCKEAGE, 2011).

O Eculizumab apresenta algumas reações adversas correspondentes a inibição de C5, ocasionando baixos níveis de hemólise residual e permitindo uma ativação das fases iniciais do Sistema Complemento, que leva a deposição de C3b na superfície dos eritrócitos, e uma leve hemólise extravascular. A inibição de C5 está associada ao aumento da susceptibilidade a infecções por *Neisseria meningitidis*; e dessa forma, todos os pacientes devem ser vacinados pelo menos 2 semanas antes ou no mesmo dia do início do tratamento com Eculizumab (BRODSKY, 2014; FONTBRUNE; LATOUR, 2018).

Pacientes com infecção por *N. meningitidis* sorogrupo B ou que não foram vacinados não podem fazer o uso desta medicação (MCKEAGE, 2011), uma vez que foram relatados casos de doença meningocócica invasiva em pacientes tratados com o Eculizumab (REHER et al., 2018). Como as vacinas disponíveis não incluem o antígeno do sorogrupo B, a profilaxia antibacteriana pode ser necessária. Outros efeitos indesejados incluem

a infecção por *Aspergillus* spp., artrite bacteriana, infecções de pele por herpes simples, infecções urinárias, trombocitopenia e leucopenia (MCKEAGE, 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 18/10/2017, estabeleceu o preço máximo do medicamento para venda ao Governo Federal no valor máximo de R\$ 11.942,60 reais, segundo menor preço internacional apurado pela Secretaria Executiva da Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED)/ANVISA. Mesmo assim, a terapêutica com Eculizumab resulta em elevados custos anuais, além de sua administração intravenosa ser restrita ao ambiente hospitalar com supervisão médica específica, dificultando uma maior adesão ao tratamento (MASTELLOS et al., 2018).

USO DO ECULIZUMAB NA GESTAÇÃO

Cerca de 16 a 18 % dos casos de HPN são diagnosticados durante a gravidez, e a gravidez na HPN é um fator de recorrência ou piora dos sinais e sintomas em determinados casos (NOMURA et al., 2004). Assim, o seu uso é considerado quando a vantagem justificar o risco potencial para o feto (MYASAKA et al., 2016).

O aumento da dose de Eculizumab para 1200 mg a cada duas semanas até o momento do parto, proporciona benefícios as gestantes com HPN, diminuindo a taxa de complicações maternas, e promovendo aumento da sobrevida fetal (FONTBRUNE, LATOUR, 2018).

Por conta dos níveis descompensados de hemólise crônica em pacientes com HPN que apresentam gestação, é necessária a reposição de folatos (ARRUDA et al., 2010).

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

O único tratamento curativo para a HPN é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TANIGUCHI et al., 2011), que não pode ser indicado como terapia inicial para os pacientes com HPN por conta dos altos riscos de mortalidade pós-operatório (PATRIQUIN et al., 2019). Os candidatos para esta terapêutica são pacientes que apresentam anemia aplásica grave com clones de HPN (HPN subclínica), jovens e que apresentem um doador adequado (BRODSKY, 2014).

A vantagem do transplante é que este procedimento leva a eliminação dos clones de HPN, com a introdução de células hematopoiéticas saudáveis. Estes fatores são fundamentais no prognóstico da doença quando a HPN está associada a anemia aplásica, falência medular e pancitopenia (TANIGUCHI et al., 2011; ALENCAR, GUI MARÃES, BRITO JUNIOR, 2016).

CONSIDERAÇÕES

Os aprimoramentos realizados no método de citometria de fluxo para o diagnóstico e a inclusão terapêutica do Eculizumab no tratamento da HPN, estão associados a melhora no quadro clínico e aumento do tempo de sobrevida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. In: *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*. 5. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- ALENCAR, R. B. C.; GUI MARÃES, A. M.; BRITO JUNIOR, L. C. Report of case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with complex evolution and liver transplant. *J Bras Patol Med Lab*. v. 52, n. 5, p. 307-311, 2016.
- ARRUDA, M. M. A. S. et al., Hemoglobinúria Paroxística Noturna: da Fisiopatologia ao tratamento. *Rev Ass Med Bras*. v. 56, n. 2, p. 214-221, 2010.

- BRODSKY, R. A. Narrative review: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the physiology of complement-related hemolytic anemia. *Ann Intern Med.* v. 148, n. 8, p. 587-595, 2008.
- BRODSKY, R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* v. 124, n. 18, p. 2804-281, 2014.
- CORREIA, R. P.; et al., Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Einstein.* v. 14, n. 3, p. 366-373, 2016.
- DEVALET, B. et al., Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol.* v. 95, n. 3, p. 190-198, 2015.
- DUBOIS, E. A.; COHEN, A. F. Eculizumab. *Br J Clin Pharmacol.* v. 68, n. 3, p. 318-319, 2009.
- FONTBRUNE, F. S.; LATOUR, R. P. Ten years of clinical experience with eculizumab in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol.* v. 55, n. 3, p. 124-129, 2018.
- GRIFFIN, M. et al., Concurrent treatment of aplastic/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome with immunosuppressive therapy and eculizumab: a UK experience. *Haematologica,* v. 103, n. 8, p. e345-347, 2018.
- GRUS, T. et al., Budd-Chiari Syndrome. *Prague Med Rep.* v. 118, n. 2-3, p. 69-80, 2017.
- HILL, A. et al., Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Primers.* v. 3, p. 17028, 2017.
- HILL, A.; KELLY, R. J.; HILLMEN, P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood.* v. 121, n. 25, p. 4985-4986, 2013.
- ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema Complemento: Ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. *Rev Ass Med Bras.* v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.
- KAHN, M. J. et al., Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* v. 13, n. 1, p. 83-87, 2013.
- KOKORIS, S. I. et al., Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an update on clinical features, pathophysiology and treatment. *Hematology.* v. 23, n. 8, p. 558-566, 2018.
- KORKAMA, E. S. et al., Spontaneous remission in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - return to health or transition to malignancy. *Front Immunol.* v. 9, p. 1749, 2018.
- KRAWITZ, P. M. et al., A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood.* v. 122, n. 7, p. 1312-1315, 2013.
- LISZEWSKI, M. K.; ATKINSON, J. P. Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *J Intern Med.* v. 227, n. 3, p. 294-305, 2015.
- MASTELLOS, D. C. et al., Expanding complement therapeutics for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol.* v. 55, n. 3, p. 167-175, 2018.
- MCKEAGE, K. Eculizumab: A Review of its use in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Drugs.* v. 71, n. 71, p. 2327-2345, 2011.
- MEPPEL, E. et al., Cerebral venous thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a series of 15 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* v. 94, n. 1, p. e362, 2015.

MODESTO, T.M. et al., Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna. *Rev Bras Hematol Hemoter.* v. 28, n. 4, p. 275-279, 2006.

MYASAKA, N. et al., Pregnancy outcomes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab: a Japanese experience and updated review. *Int J Hematol.* v. 103, n. 6, p. 703-712, 2016.

NOMURA, L.M. et al., Hemoglobinúria paroxística noturna e gravidez. *Rev Bras Ginecol Obstet,* v. 26, n. 7, p. 579-589, 2004.

OLLUTOGUN, T. et al., Complement-mediated haemolysis and the role of blood transfusion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Transfus.* v. 13, n. 3, p. 363-369, 2015.

PARKER, C. et al., Update on diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* v. 2016, n. 1, p. 208-216, 2016.

PATRIQUIN, C.J. et al., How we treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A consensus statement of the Canadian PNH network and review of the national registry. *Eur J Haematol.* v. 102, n. 1, p. 36-52, 2019.

REHER, D. et al., A rare case of septic shock due to *Neisseria meningitidis* serogroup B infection despite prior vaccination in a young adult with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Vaccine.* v. 36, n. 19, p. 2507-2509, 2018.

RICKLIN, D. et al., Complement component C3-The “swiss army knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev.* v. 274, n. 1, p. 33-58, 2016.

ROCHA, J.M.C. et al., Detection of PNH cells by flow cytometry, using multi parameter analysis. *J Bras Patol Med Lab.* v. 50, n. 2, p. 105-114, 2014.

SCHREZENMEIER, H. et al., Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica.* v. 99, n. 5, p. 922-929, 2014.

SOCIE, G. et al., Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet.* v. 348, n. 9027, p. 573-577, 1996.

SUTHERLAND, D.R.; KEENEY, M.; ILLINGWORTH, A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* v. 82, n. 4, p. 195-208, 2012.

SYKES, D.B. et al., Case 40-2017. A 32-year-old woman with headache, abdominal pain, anemia, and thrombocytopenia. *N Engl J Med.* v. 337, n. 26, p. 2581-2590, 2017.

TANIGUCHI, K. et al., Strategy for bone marrow transplantation in eculizumab-treated paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol.* v. 94, n. 4, p. 403-407, 2011.

UTIYAMA, S.R.R. et al., O Sistema Complemento nas doenças: genética e patogênica. *Rev Bras Reumatol.* v. 44, n. 44, p. 277-286, 2004.