

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**

LILIANNE BRITO DA SILVA

**HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA: ASPECTOS CLÍNICO-
LABORATORIAIS**

**FORTALEZA
2007**

LILIANNE BRITO DA SILVA

HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA: ASPECTOS CLÍNICO-
LABORATORIAIS

Monografia submetida à Coordenação do Curso de
Especialização em Hematologia e Hemoterapia, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para conclusão da Especialização em
Hematologia e Hemoterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro
Gonçalves

FORTALEZA
2007

LILIANNE BRITO DA SILVA

HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA: ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS

Esta monografia foi apresentada ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para conclusão da Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves(Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

100

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Todo Poderoso, por sempre estar presente na minha vida e no meu coração.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, pela sua orientação tão sábia e eficiente.

A todos os professores que participaram do curso, pelo conhecimento e experiência transmitidos.

Aos meus irmãos, que sempre estiveram presentes na minha vida, tornando-a mais feliz.

Agradeço à minha família e aos meus amigos pelo apoio, companheirismo e dedicação que sempre me ofereceram.

Aos meus novos amigos do curso, por vivenciarem comigo este momento tão importante da minha vida.

Ao meu namorado, Francisco Daniel Rocha Veras, pelo amor e companheirismo que me deu ao longo dessa nova conquista.

Aos meus pais, Geraldo Holanda e Maria de Fátima de Brito, a quem devo tudo o que sou hoje e todas as coisas boas que aconteceram na minha vida. Prometo que vocês sempre terão muito orgulho da sua filha. O meu amor e a minha admiração por vocês são eternos.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

RESUMO

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença clonal e adquirida da célula-tronco hematopoética causada por uma mutação somática no gene *PIG-A*, ligado ao cromossomo X, que codifica uma proteína envolvida na síntese do glicosilfosfatidilinositol (GPI), o qual funciona como âncora a muitas proteínas da membrana celular. Este trabalho tem como objetivo analisar as características clínico-laboratoriais em portadores de HPN. Foram coletadas informações de quatorze pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC/UFC), no período de janeiro de 2006 a janeiro de 2007, através de prontuários médicos. A análise dos dados obtidos foi feita por testes não paramétricos, utilizando-se o teste do χ^2 qui-quadrado. Dentre os pacientes estudados, 57% eram do sexo feminino, com idade média de 35 anos. Os principais sintomas apresentados foram: episódios de urina escura (100%), edema nos membros inferiores (86%), icterícia (57%), palidez (57%), dor nos membros inferiores (50%), gengivorragia (50%), epistaxe (50%), hipermenorréia (50%), cefaléia (43%), petéquias (43%), infecções frequentes (43%), esplenomegalia (28%), sonolência (28%), tonturas (28%), hepatomegalia (28%), dor lombar (22%), hemorróida (14%) e episódios de trombose (7%). Houve associação entre HPN e Anemia Aplástica em 38% dos pacientes. Dos pacientes, 57% eram politransfundidos antes do diagnóstico de HPN. Em relação ao hemograma, os resultados mais frequentes foram: anemia (100%), com dosagem de hemoglobina $< 7\text{g/dl}$ (50%), morfologia das hemácias: macrocíticas e hipocrômicas (44%), leucopenia (57%) e número de plaquetas normais em número (50%). Em relação ao número de reticulócitos, 79% apresentaram reticulocitose. No laudo do mielograma, 58% dos pacientes apresentaram uma hiperplasia eritróide. No laudo da biópsia óssea, 72% dos pacientes apresentaram uma hiperplasia eritróide. O resultado do teste de Coombs foi positivo em 80% dos pacientes. Dentre os pacientes; 78% apresentaram um resultado de VHS $>$ que os valores de referência; 58% LDH $> 480\text{U/L}$; 86% BI $> 0,6\text{mg/dl}$; 79% e 64% apresentaram elevação de AST e ALT, respectivamente; e 100% apresentaram TAP e TPTa normais. Em relação ao metabolismo do ferro, 64% dos pacientes apresentaram ferro sérico diminuído, 50% CTLFe aumentada, 57% IST diminuído e 50% apresentaram ferritina diminuída. Todos os pacientes apresentaram episódios de hemoglobinúria. O teste de Ham teve resultado positivo em todos os pacientes. A citometria de fluxo foi realizada em apenas 36% dos pacientes como método diagnóstico, dentre estes foi observada ausência de CD55 e CD59 em 70% dos granulócitos e em 40% dos eritrócitos, ausência de CD14 em 94% dos monócitos. O tempo de diagnóstico foi de 1,5 ano. O tratamento com prednisona e ácido fólico foi utilizado em 71% dos pacientes. Concluiu-se que os resultados estão de acordo com os dados da literatura e que a maioria dos pacientes obteve conclusão diagnóstica apenas com o resultado do teste de Ham.

Palavras-chave: Hemoglobinúria Paroxística Noturna, clínica, laboratório.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	23
4 RESULTADOS.....	24
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	45
7 REFERÊNCIAS.....	46
8 ANEXO.....	50

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1- Valores de referência para alguns parâmetros laboratoriais utilizados no trabalho.....	23
TABELA 2-Perfil clínico-laboratorial do paciente HPN do HUWC em relação à média dos parâmetros abordados.....	39
FIGURA 1-Estrutura da GPI (Diagnóstico das Américas).....	13
FIGURA 2-Avaliação por citometria de fluxo dos receptores CD16; CD14 e CD24 em granulócitos e monócitos de indivíduos normais e de portadores de HPN (Laboratório Médico Santa Luzia).....	19
FIGURA 3-Avaliação por citometria de fluxo dos receptores CD55 e CD59 em granulócitos de indivíduos normais e de portadores de HPN (Laboratório Médico Santa Luzia).....	19
FIGURA 4-Avaliação por citometria de fluxo do receptor CD59 em eritrócitos de indivíduos normais e de portadores de HPN (Laboratório Médico Santa Luzia).....	20

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-Distribuição da amostra quanto à idade.....	24
GRÁFICO 2-Distribuição da amostra quanto ao sexo.....	25
GRÁFICO 3-Sintomas mais frequentes entre os pacientes.....	25
GRÁFICO 4-Patologias anteriores ao diagnóstico de HPN.....	26
GRÁFICO 5-Distribuição da amostra quanto à realização de transfusão de hemocomponentes anterior ao diagnóstico de HPN.....	26
GRÁFICO 6-Classificação da amostra quanto à presença de anemia.....	27
GRÁFICO 7-Distribuição dos pacientes quanto à dosagem de hemoglobina.....	27
GRÁFICO 8-Distribuição da amostra quanto à morfologia das hemácias.....	28
GRÁFICO 9-Distribuição dos pacientes quanto ao número de leucócitos.....	29
GRÁFICO 10-Distribuição dos pacientes quanto ao número de plaquetas.....	29
GRÁFICO 11-Distribuição dos pacientes quanto ao número de reticulócitos.....	30
GRÁFICO 12-Classificação da amostra quanto ao laudo do mielograma.....	31
GRÁFICO 13-Classificação da amostra quanto ao laudo da biópsia óssea.....	31
GRÁFICO 14-Distribuição da amostra quanto à positividade do Coombs-direto.....	32
GRÁFICO 15-Distribuição da amostra quanto ao resultado do VHS.....	32
GRÁFICO 16-Distribuição da amostra quanto ao resultado do LDH.....	33
GRÁFICO 17-Distribuição da amostra quanto ao resultado de TAP e TPTa.....	33
GRÁFICO 18-Distribuição da amostra quanto ao resultado de BI.....	34
GRÁFICO 19-Distribuição da amostra quanto ao resultado de AST.....	34

GRÁFICO 20-Distribuição da amostra quanto ao resultado de ALT.....	35
GRÁFICO 21-Classificação da amostra quanto ao metabolismo do ferro.....	35
GRÁFICO 22-Distribuição da amostra quanto ao resultado do sumário de urina.....	36
GRÁFICO 23-Distribuição da amostra quanto ao resultado do teste de HAM.....	36
GRÁFICO 24-Distribuição da amostra quanto à realização da citometria de fluxo.....	37
GRÁFICO 25-Classificação da amostra quanto ao resultado da citometria de fluxo.....	38
GRÁFICO 26-Classificação da amostra quanto ao tratamento.....	38

1 INTRODUÇÃO

A HPN também é conhecida como síndrome de Marchiafava-Micheli¹. É uma doença clonal e adquirida da célula-tronco hematopoética com a conseqüente produção de células sanguíneas defeituosas². É caracterizada por apresentar hemólise intravascular que é a manifestação clínica primária; tendência à trombose, que é a maior causa de morbimortalidade e hipoplasia medular, devido à falência da medula óssea³.

Esta doença teve uma descrição inicial como uma entidade clínica distinta em 1882, por Strubing, ficando reconhecida, diagnosticada e nomeada de acordo com o seguinte aspecto clínico: hemólise intravascular acompanhada por episódios recorrentes de emissão de urina escura no período da manhã. Em 1928, Enneking deu o nome atual à doença. Em 1930, Ham mostrou que as células vermelhas da HPN eram anormais, pois quando o plasma era acidificado in vitro ocorria hemólise, concluindo que o defeito das hemácias do paciente HPN era devido à sua grande sensibilidade à ação lítica do complemento. Em 1949, Dacie descobriu que há duas populações de células, sendo uma normal. Em 1956, descobriu-se a deficiência da enzima acetilcolinesterase nos eritrócitos dos pacientes; depois disso, muitas outras moléculas, como a fosfatase alcalina, também foram identificadas como ausentes na membrana plasmática de vários tipos de células HPN⁴.

Em 1974, Rosse descobriu que há três populações de células: HPN I que são aparentemente normais, HPN II que possuem sensibilidade intermediária à ação do complemento e HPN III que possuem sensibilidade intensa à ação do complemento. Em 1980, descobriu-se que todas aquelas proteínas deficientes na superfície das células eram ancoradas por uma glicoproteína, sendo resolvida a peculiaridade das células HPN. Em 1993, com a clonagem do PIG-A (Phosphatidylinositol glycan class A), o defeito molecular da doença foi elucidado. Recentemente, a investigação de células GPI-presentes e GPI-deficientes foi desenvolvida. Após o entendimento do defeito molecular, o controle de uma hematopoese normal por uma stem-cell hematopoética PIG-mutante tem sido um dilema⁴.

A HPN é causada por uma mutação somática que inativa o gene PIG-(A) (Phosphatidylinositol glycan class A), localizado no final do braço curto do cromossomo X (Xp22.1), que codifica uma proteína que participa da formação de uma molécula glicolípídica complexa, a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esta molécula funciona como âncora a um grande número de proteínas, sendo algumas destas, proteínas de membrana celular. A síntese de GPI

na HPN é deficiente nas células hematopoéticas e, como consequência, as proteínas ligadas à GPI poderão ter sua expressão diminuída ou ausente³.

A GPI consiste em uma molécula de fosfatidilinositol que está unida a um núcleo glicano, formado por quatro açúcares: uma molécula de N-glucosamina e três moléculas de manose; a última manose está unida a carboxila terminal da proteína, através de uma fosfatoetanolamina(Figura 1)⁵.

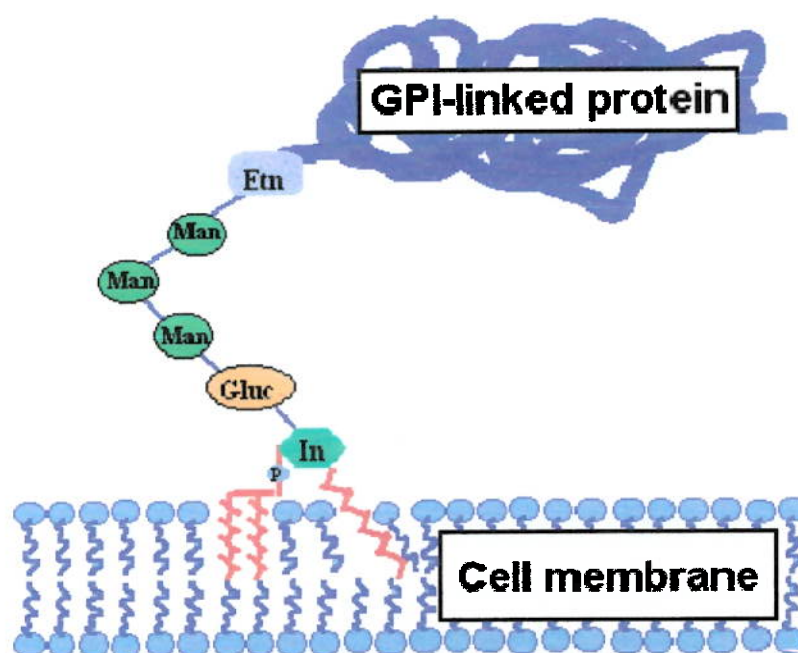


Figura 1 - Estrutura da GPI

Fonte: Diagnóstico das Américas

O passo inicial da biossíntese da GPI é a construção do núcleo glicano, para o qual há a adição enzimática da molécula de N-acetilglucosamina proveniente do uridifosfato N-acetilglucosamina (UDP-N acetil glucosamina) com a molécula de fosfatidilinositol. Nas células anormais da HPN, este primeiro passo é defeituoso, devido a mutação somática no gene PIG-A⁶. Este gene codifica a enzima 1-6-N-acetil-glucosamina-transferase necessária para a incorporação da N-acetilglucosamina ao fosfatidilinositol⁷. Em um mesmo paciente podem existir dois ou mais clones como resultado de diferentes mutações do gene PIG-A. Mais de 100 mutações do gene PIG-A têm sido descritas em pacientes afetados de HPN, a maioria das quais são pequenas deleções ou inserções⁸.

Este defeito bioquímico na síntese desta molécula é a causa da diminuição ou ausência da expressão de proteínas de membrana em todas as células hematopoéticas anormais, o que torna as células muito sensíveis à ação lítica do complemento⁹. Entretanto, dentre estas múltiplas proteínas, somente as seguintes possuem importância clínica e são mais estudadas no diagnóstico da HPN:

1. Fator acelerador de degradação (DAF, CD55) que é uma proteína de membrana que intervém no controle da ativação do complemento na superfície celular. Une-se com os fragmentos C3b e C4b que recobrem a membrana, impedindo a ligação destes aos fragmentos Bb e C2a respectivamente, inibindo assim a ativação dos complexos C3 convertase (C4b2a e C3bBb). Sua deficiência ou ausência favorece a ação citolítica da fração C3b e C4b, além de acarretar uma maior fixação do complemento pelas células. Portanto, o DAF protege as células autólogas normais do ataque do sistema complemento⁴.
2. Inibidor de membrana de lise reativa (MIRL, CD59) é outro fator deficiente ou ausente na HPN. Bloqueia o complexo de ataque à membrana (C5b-9), inibindo sua ação. A neutralização do MIRL com anticorpos gera células que se assemelham às células HPN, o que sugere que esta proteína de controle do complemento é muito importante na patogenia da doença. A deficiência desta proteína também é responsável pelos efeitos trombóticos da doença⁴.
3. CD16 (receptor para a porção Fc da IgG nos neutrófilos) é uma proteína que se expressa na superfície dos neutrófilos, se une com a porção Fc da molécula de IgG, preparando-os para a fagocitose. Nos neutrófilos, este receptor de IgG está unido à membrana pela GPI, o qual está ausente na HPN, o que pode contribuir pela susceptibilidade destes pacientes às infecções¹⁰.
4. Receptor ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR) que é uma proteína que une-se com a enzima proteolítica uroquinase, que ativa o plasminogênio a plasmina e inicia a fibrinólise, a qual se vê seriamente afetada quando esta proteína se encontra diminuída ou ausente, favorecendo os fenômenos trombóticos¹¹.

5. CDw52 (Campath-1) está localizado em linfócitos, monócitos e neutrófilos, sendo responsável pela ativação linfocitária T pela via CD2. A reação deste antígeno, que é uma proteína de membrana, com anticorpo anti-CD52, resulta na ativação do complemento, portanto, na lise da célula. Isto tem permitido o uso deste anticorpo para a depleção linfocitária nas enfermidades auto-imunes, nos linfomas e na enfermidade enxerto contra hospedeiro. Esta molécula está deficiente ou ausente nas células HPN¹⁰.
6. Fator de restrição homóloga/C8bp é uma proteína de membrana que interfere na ligação C8 e C9 prevenindo a formação do complexo de ataque à membrana em células homólogas. Na HPN este bloqueio desaparece, ficando as células mais expostas à ação do complemento¹².

O que foi anteriormente exposto indica que a expressão clínica da enfermidade depende do tipo de proteína de membrana que está ausente ou deficiente e do grau da alteração de sua função.

A sensibilidade de todos os glóbulos vermelhos não é igual. Por meio de testes especiais *in vitro* (Ham e Sacarose) que quantificam a sensibilidade do eritrócito a lise mediada por complemento, podem ser identificados três fenótipos diferentes de eritrócitos HPN: um dos fenótipos (HPN I) está caracterizado por sensibilidade normal ou quase normal ao complemento, o fenótipo HPN III é de 15 a 20 vezes mais susceptível à lise, e um terceiro fenótipo (HPN II) é de sensibilidade intermediária, de 3 a 5 vezes maior que nas células normais. Os eritrócitos HPN III podem dividir-se em dois grupos, IIIa e IIIb, dos quais o primeiro é o mais sensível à lise por complemento¹³. Um total de 78 % dos pacientes com HPN exibe uma mistura de células HPN I e III. Isto constitui o que se denomina mosaico fenotípico, descrito por Rosse e Dacie, como citado anteriormente¹⁴.

As proporções entre as células HPN I, HPN II e HPN III se mantêm estáveis durante muito tempo, porém no começo da enfermidade e na recuperação espontânea se observam quantidades proporcionais. Nas células HPN III existe maior susceptibilidade à lise pelo complexo de ataque à membrana (C₅b-9). Este defeito adicional explica porque as células HPN III são ainda mais propensas à destruição que as HPN II¹⁵. Esta variedade na sensibilidade à lise entre os diferentes fenótipos, também se explica pelas diferenças

quantitativas na expressão do DAF e IRLM. As células HPN III são completamente deficientes do DAF e IRLM, as células HPN II são parcialmente deficientes, e as células HPN I não têm deficiência em nenhuma das duas proteínas reguladoras⁴.

A evolução da HPN tende a ser prolongada e variável. Essencialmente todos os pacientes com HPN clássico relatam episódios de hemólise intravascular associados à hemoglobinúria em algum ponto durante a doença, mas este sintoma pode ser ausente nos pacientes com HPN/Anemia Aplástica ou HPN/Síndrome Mielodisplásica, pois o tamanho do clone é frequentemente pequeno¹⁶. Os episódios de hemólise estão associados a infecções, menstruação, administração de medicamentos (como os sais de ferro), transfusões, operações, exercícios físicos intensos e vacinações. A anemia aparece de forma brusca, com dor lombar, icterícia e hemoglobinúria, sendo acompanhada de neutropenia e trombocitopenia em torno de 15 % dos pacientes, o que constitui o padrão "hipoplástico" da HPN. Fenômenos trombóticos estão presentes entre 12 e 40 % dos casos, sendo em sua maioria intra-abdominais, principalmente das veias hepática e mesentérica. A trombose da veia hepática ou síndrome de Budd-Chiari é o fenômeno mais grave, o qual se apresenta entre 15 e 30 % dos pacientes, ocorrendo frequentemente durante uma crise hemolítica. As infecções são frequentes. Pode ocorrer trombocitopenia severa e complicações hemorrágicas¹. Aproximadamente 3% dos pacientes apresentam insuficiência renal aguda associada com as crises hemolíticas, o que explica a hematúria, proteinúria, hipertensão e perda da capacidade de concentração da urina. Também são verificados sintomas como disfagia, impotência e sensação de fadiga, os quais geralmente ocorrem durante os episódios de hemólise intravascular e hemoglobinúria. Palidez, icterícia, astenia, esplenomegalia moderada e hepatomegalia podem apresentar-se no exame físico do paciente HPN¹⁴.

A identificação correta da enfermidade demora em média entre 2,5 e 3 anos. As crises leves podem passar despercebidas, porém as mais sérias podem provocar dor subesternal, lombar ou abdominal, sonolência, mal-estar geral, febre e cefaléias, que podem ser intensas e persistir por vários dias¹.

Há relatos na literatura que a HPN pode estar associada a outras enfermidades hematológicas como as Síndromes Mielodisplásicas, as Síndromes Mieloproliferativas, as Leucemias agudas e, principalmente, com a Anemia Aplástica. Entre 10 e 25 % dos pacientes com HPN podem desenvolver uma Anemia Aplástica secundária. Em torno de 50 % das aplasias tem uma prova de Ham positiva e em alguns pacientes os precursores hematopoéticos

são anormalmente sensíveis à lise mediada por complemento. Se tem demonstrado a presença de células deficientes de proteínas ligadas a GPI entre 10 e 75 % dos pacientes com AA o que nos faz pensar na existência de mecanismos patogênicos comuns entre estas duas doenças¹⁷.

A HPN é uma doença rara, com prevalência estimada entre 01 e 10 casos a cada 01 milhão de indivíduos, sendo sua frequência até então desconhecida⁴. Pode estar presente em todas as idades e em ambos os sexos, embora mais frequente em adultos do sexo feminino. O diagnóstico se realiza geralmente entre a terceira e quinta décadas de vida¹⁸. Está presente em todo mundo, com maior frequência em alguns países asiáticos como Tailândia e China, onde uma maior incidência de anemia aplástica também tem sido observada. A média de sobrevivência após o diagnóstico é aproximadamente 10 anos. Contudo, pode ocorrer remissão espontânea da doença, o que acontece em apenas 15% dos casos⁴.

Existem muitos exames conhecidos atualmente para um correto diagnóstico desta doença, embora isto não seja tarefa fácil. Em geral a anemia é grave, Coombs-negativo, com cifras de hemoglobina inferiores a 6g/dl, além de leucopenia e trombocitopenia associadas¹⁹. Como evidência clínica da hemólise intravenosa observa-se reticulocitose, concentração elevada de LDH e de bilirrubina indireta, além de uma concentração baixa de haptoglobulina¹⁶.

Existe ferropenia como consequência da hemossiderinúria crônica, com perdas diárias de aproximadamente 15,9 mg de ferro. A medula óssea apresenta uma hiperplasia eritróide, hipoplasia ou aplasia global, porém em muitos casos a celularidade é normal¹⁴.

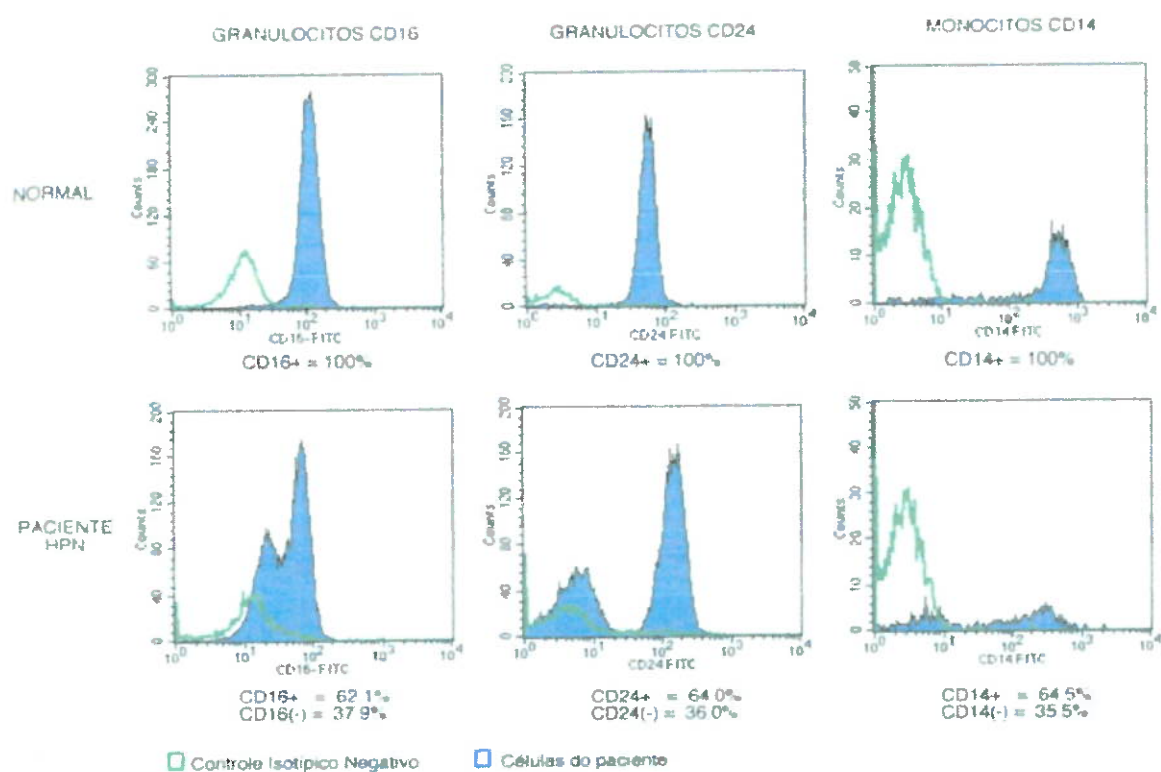
Alguns testes sorológicos ainda são utilizados, embora estejam sendo cada vez mais substituídos pela citometria de fluxo, pois apresenta uma menor sensibilidade. O teste do soro acidificado ou teste de Ham e o teste da sucrose são exemplos destes. O teste de Ham baseia-se na detecção de hemólise das células anormais quando o soro é acidificado, sendo este teste bastante específico, porém sua sensibilidade não é boa nos casos com pequeno número de células HPN. O teste da sacarose baseia-se no princípio da ativação do complemento, consistindo na mistura do soro com um meio de baixa força iônica, apresentando uma boa sensibilidade, porém baixa especificidade, pois pode ser positivo em outras doenças hematológicas, como na anemia hemolítica auto-imune e em leucemias³.

Como parte do processo do estudo do diagnóstico dos pacientes portadores desta doença, pode-se realizar imunohistoquímica para a avaliação da presença de acetilcolina nos eritrócitos e de fosfatase alcalina nos neutrófilos, estando ambos ausentes ou deficientes no caso de HPN¹⁶.

A análise morfológica do aspirado de medula óssea, a biópsia e a citogenética são usadas para a classificação apropriada da doença, pois a HPN pode estar associada com anemia aplástica, síndrome mielodisplásica (MSD), ou outra mielopatia (como a mielofibrose, por exemplo). Embora as anormalidades no cariótipo associadas com a HPN não sejam identificadas, a análise da citogenética é recomendada pelas seguintes razões: as anormalidades doença-específicas podem ser identificadas, além de analisar anormalidades no cariótipo associadas com outros processos subjacentes da doença, podendo ajudar na categorização de pacientes individuais¹⁶.

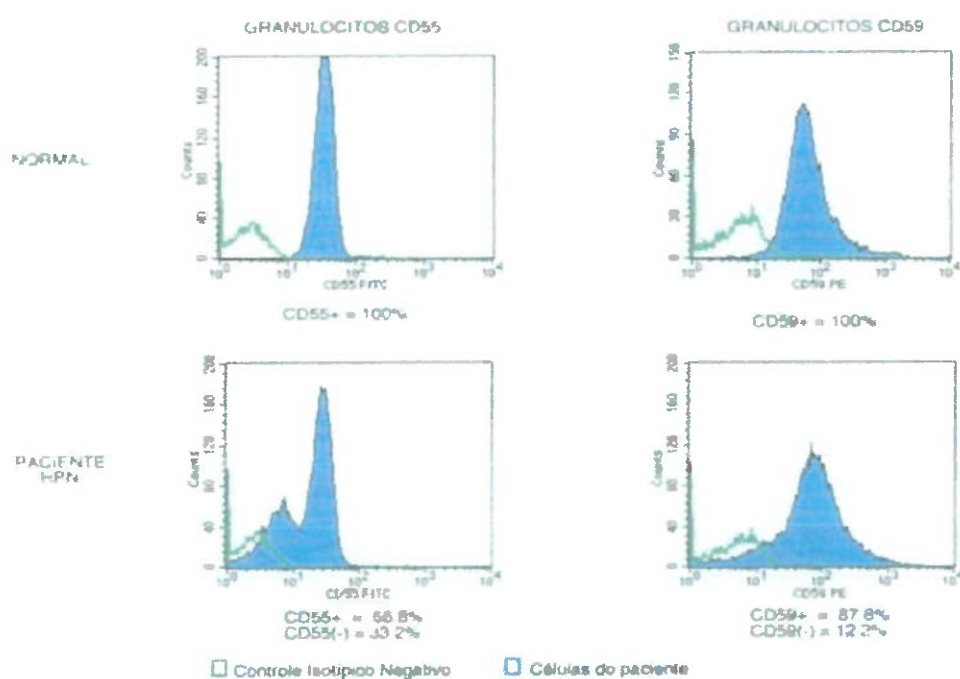
A análise da citometria de fluxo, que utiliza anticorpos monoclonais direcionados às proteínas ligadas ao GPI, é a técnica mais sensível e específica para o diagnóstico da HPN (Figura 01, 02 e 03). Esta técnica, além de identificar a população de células com deficiência ou ausência das proteínas ligadas a GPI, determina a porcentagem das células que são anormais e identifica as populações com graus diferentes de deficiência (particularmente os eritrócitos). Saber a porcentagem e o tipo de células vermelhas deficientes é útil para controlar a anemia da PNH¹⁶.

Figura 2 - Avaliação por citometria de fluxo dos receptores CD16; CD14 e CD24 em granulócitos e monócitos de indivíduos normais e de portadores de HPN



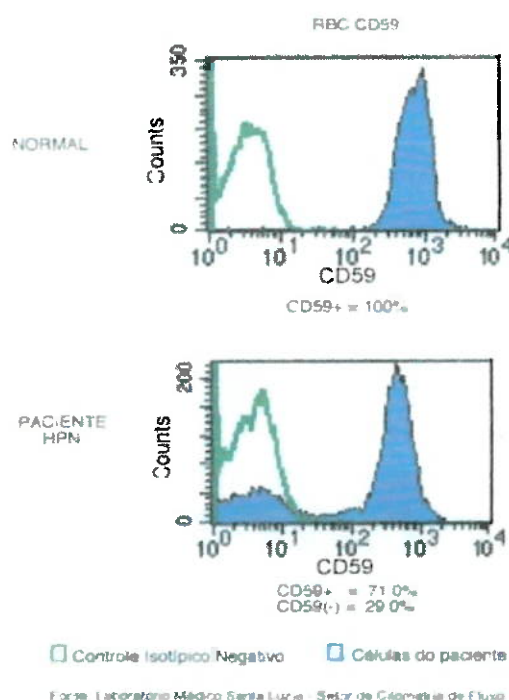
Fonte: Laboratório Médico Santa Luzia - Setor de Citometria de Fluxo

Figura 3 - Avaliação por citometria de fluxo dos receptores CD55 e CD59 em granulócitos de indivíduos normais e de portadores de HPN



Fonte: Laboratório Médico Santa Luzia - Setor de Citometria de Fluxo

Figura 4 - Avaliação por citometria de fluxo do receptor CD59 em eritrócitos de indivíduos normais e de portadores de HPN



A identificação da mutação do gene PIG-A confirmaria e facilitaria o diagnóstico mais rápido e preciso da HPN, mas devido a desafios técnicos esta identificação ainda está limitada à pesquisa¹⁶.

O tratamento é instituído de acordo com as manifestações clínicas da doença. A transfusão de hemocomponentes e a reposição de ácido fólico e ferro são freqüentemente necessárias, embora a reposição aguda de ferro possa resultar em aumento da hemólise devido à formação e liberação de um novo clone de eritrócitos sensíveis. O uso de corticóides em baixas doses diminui a taxa de hemólise em alguns pacientes²⁰. Devem ser administrados agentes como a estreptoquinase, a uroquinase e o ativador de plasminogênio tissular para prevenir a trombose. O paciente deve receber heparina em um episódio de trombose aguda e, logo após a passagem da crise, deve ser anticoagulado com derivados da warfarina por um período de no mínimo seis meses²¹. Os andrógenos podem ser utilizados nos pacientes com hipoplasia medular proeminente, pois estimulam a hematopoese em alguns casos, sendo os mais utilizados compostos como o danazol, a fluoximesterona e a oximetazona. Mais recentemente se tem

utilizado citocinas recombinantes como a eritropoetina e o fator estimulador de colônias granulocíticas (CSF-G) para a estimulação da hematopoese²². Tendo em vista o conceito de que os linfócitos T modificam a hematopoese podendo desempenhar um papel importante na sua diminuição, se tem administrado globulina antitimocítica (GAT) nestes pacientes, corrigindo a citopenia em até 70 % dos casos, principalmente a trombocitopenia²³. No entanto, o transplante alogênico de medula óssea é o único tratamento curativo disponível, embora esteja associado a altas taxas de morbi-mortalidade²⁰. O transplante singênico é o transplante de escolha, pois suas complicações são menores²⁴. O melhor entendimento acerca da fisiopatologia e monitoramento cuidadoso destes pacientes possibilitará a decisão terapêutica mais adequada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo é analisar as características clínico-laboratoriais em portadores de HPN, atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, no período de janeiro de 2006 a janeiro de 2007, com o propósito de traçar um perfil desses pacientes no diagnóstico.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil dos pacientes em estudo (sintomatologia, idade, sexo, dentre outros);
- Determinar o tempo entre primeira consulta e diagnóstico;
- Avaliar a sensibilidade dos testes utilizados no diagnóstico;
- Atualização do banco de Dados do Serviço de Hematologia – HPN do HUWC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

Através de uma análise minuciosa do perfil clínico-laboratorial realizado no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, foram estudados quatorze pacientes portadores de HPN atendidos no período de janeiro de 2006 a janeiro de 2007.

METODOLOGIA

Foram analisados os dados contidos nos prontuários médicos dos pacientes portadores de HPN e os livros de registro dos resultados dos hemogramas do laboratório de hematologia do HEMOCE.

As variáveis estudadas foram: sexo, idade, sintomas clínicos, análise dos resultados dos hemogramas e exames complementares, número de transfusões sanguíneas e tratamento medicamentoso.

Tabela 1- Valores de referência para alguns parâmetros laboratoriais utilizados no trabalho:

Parâmetro	Valor de referência	Parâmetro	Valor de referência
anemia	Hg<12g/dl(M)	ALT	11-39U/L(H)
	Hg<13g/dl(H)		10-37U/L(M)
VHS	<50anos:<15mm(H), <20mm(M)	Ferro sérico	45-160 microg/dl(H)
	50-85anos: <20mm(H), <30mm(M)		30-160 microg/dl(M)
LDH	240-480U/L	TIBC	250-410 microg/dl
BI	0,1-0,6mg/dl	IST	20-50%
AST	15-40U/L(H)	Ferritina	20-250 microg/L(H)
	13-35U/L(M)		10-120 microg/L(M)

4 RESULTADOS

Um total de quatorze pacientes com diagnóstico de HPN apresentou os resultados a seguir.

1. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À IDADE

A idade dos pacientes variou entre < 20 anos (8%), 20-30 anos (28%), 31-40 anos (28%), 41-50 anos (28%) e > 50 anos (8%).

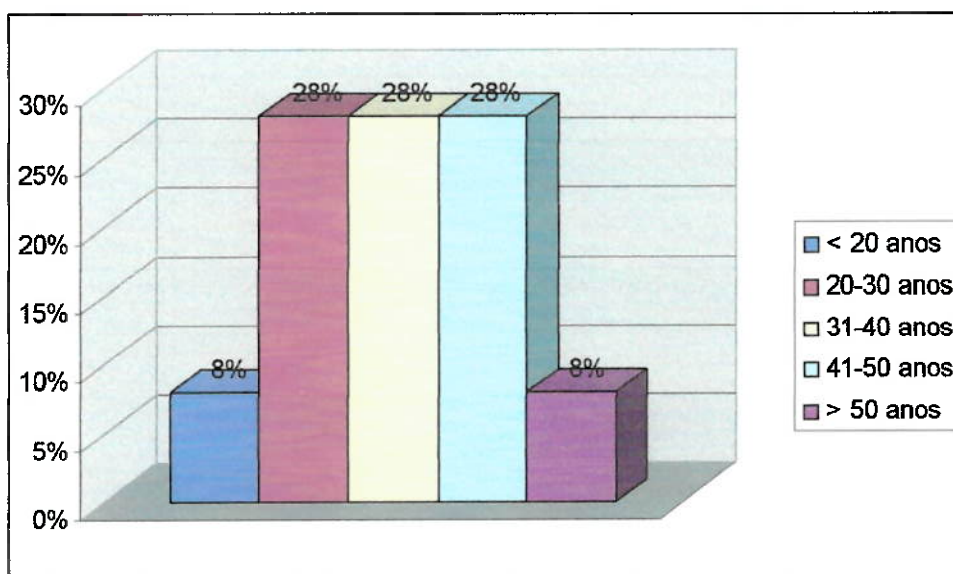


Gráfico 1-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À IDADE

2. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO SEXO

O número de pacientes do sexo feminino foi de 57% e os de sexo masculino 43%.

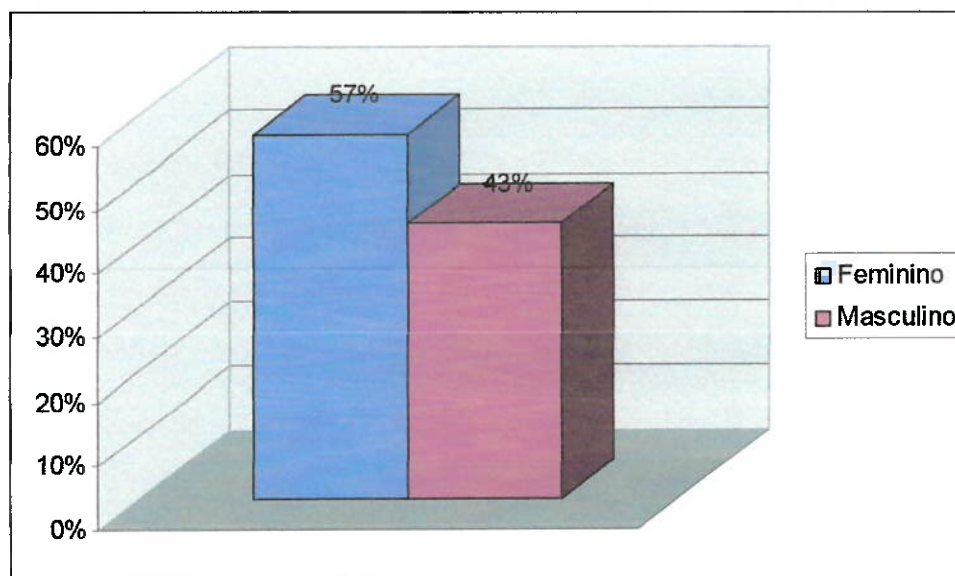


Gráfico 2-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO SEXO

3. SINTOMAS MAIS FREQUENTES ENTRE OS PACIENTES

Os pacientes apresentaram os seguintes sintomas: episódios de urina escura (100%), edema nos membros inferiores (86%), icterícia (57%), palidez (57%), dor nos membros inferiores (50%), gengivorragia (50%), epistaxe (50%), hipermenorréia (50%), cefaléia (43%), petéquias (43%), infecções frequentes (43%), esplenomegalia (28%), sonolência (28%), tonturas (28%), hepatomegalia (28%), dor lombar (22%), hemorróida (14%) e episódios de trombose (7%).

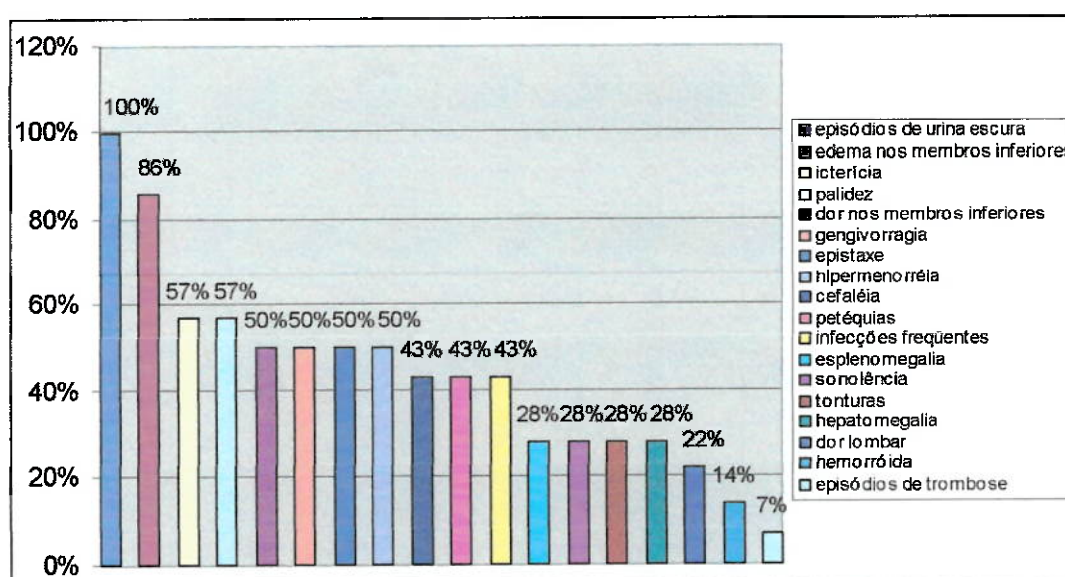


Gráfico 3-SINTOMAS MAIS FREQUENTES ENTRE OS PACIENTES

4. PATOLOGIAS ANTERIORES AO DIAGNÓSTICO DE HPN

Anterior ao diagnóstico de HPN, os pacientes apresentaram: anemia (42%), anemia aplástica (38%), anemia hemolítica auto-imune (20%).

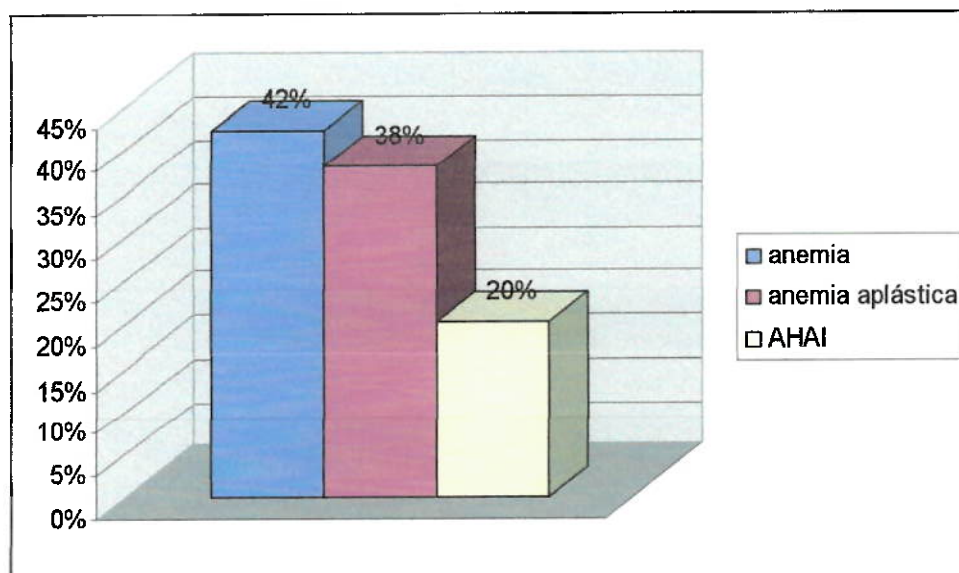


Gráfico 4-PATOLOGIAS ANTERIORES AO DIAGNÓSTICO DE HPN

5. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À REALIZAÇÃO DE TRANFUSÃO DE HEMOCOMPONENTES ANTERIOR AO DIAGNÓSTICO DE HPN

Dentre os pacientes: 57% foram politransfundidos, 35% não tinham realizado nenhuma transfusão e 7% tinham realizado uma única transfusão.

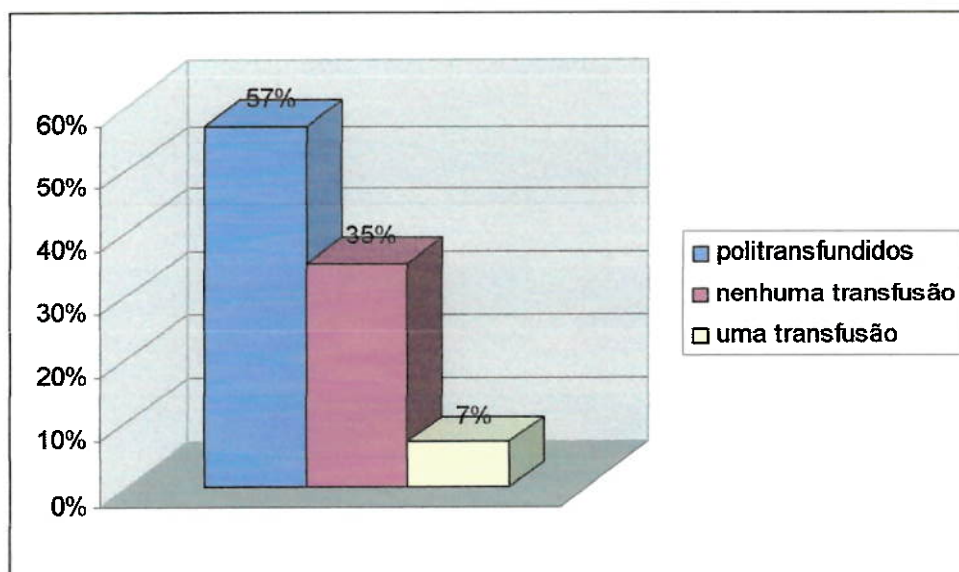


Gráfico 5-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À REALIZAÇÃO DE TRANFUSÃO DE HEMOCOMPONENTES ANTERIOR AO DIAGNÓSTICO DE HPN

6. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À PRESENÇA DE ANEMIA

Todos os pacientes (100%) apresentaram anemia.

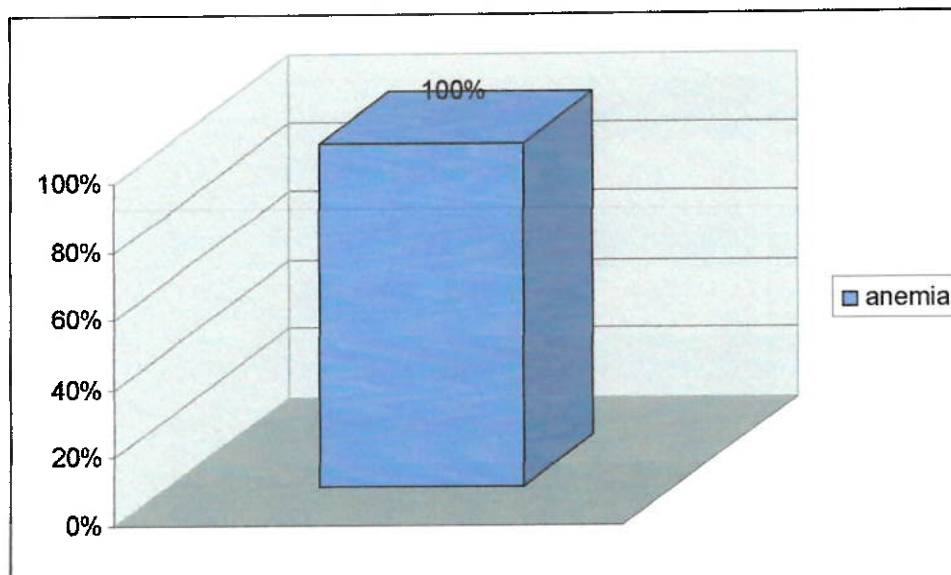


Gráfico 6-CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À PRESENÇA DE ANEMIA

7. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO À DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

A dosagem de hemoglobina estava distribuída entre os pacientes da seguinte forma: < 7g/dl (50%), de 7-10g/dl (38%) e > 10-12g/dl-M e >10-13g/dl-H (12%).

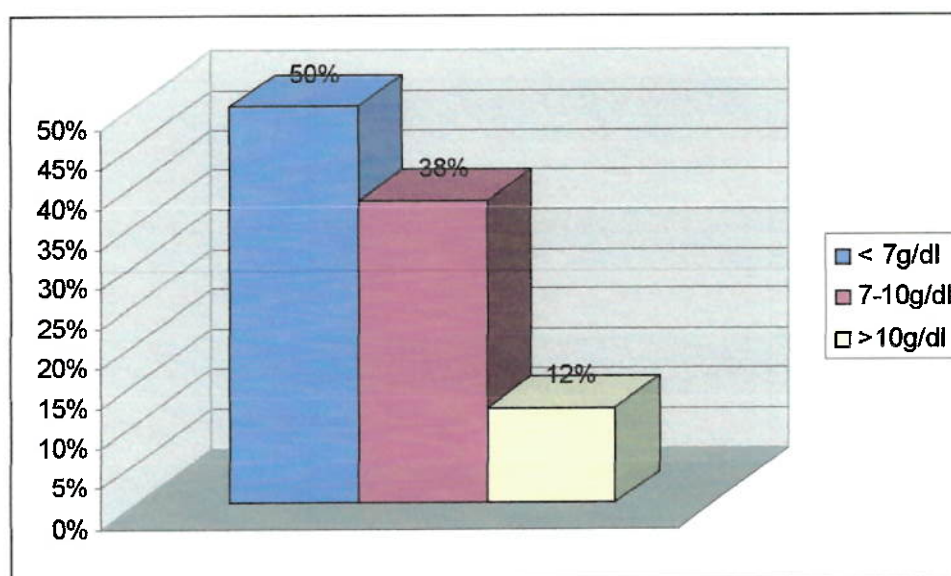


Gráfico 7-DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO À DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

8. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À MORFOLOGIA DAS HEMÁCIAS

Dentre os pacientes: 44% apresentaram hemácias macrocíticas hipocrômicas, 28% hemácias macrocíticas normocrômicas, 21% hemácias normocíticas normocrômicas e 7% hemácias microcíticas hipocrômicas.

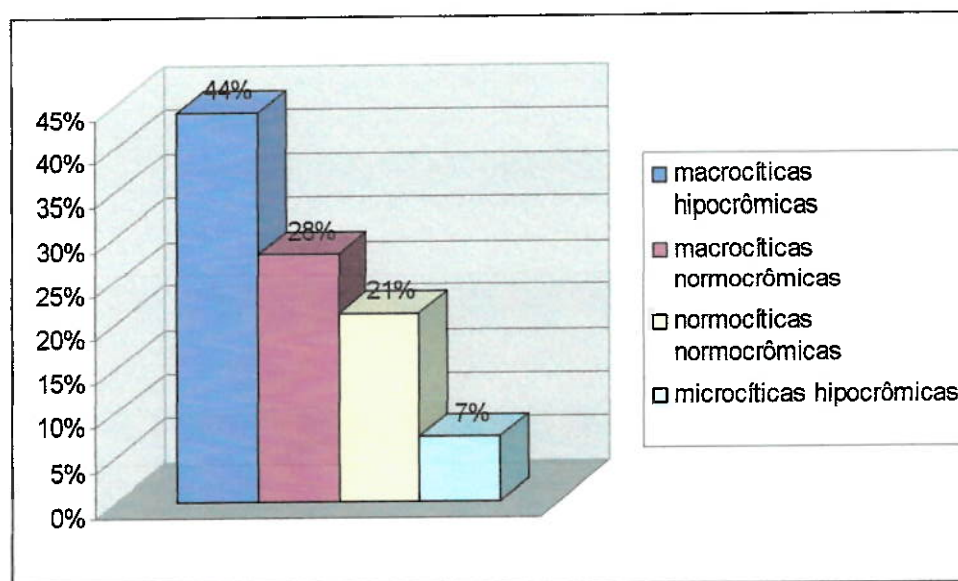


Gráfico 8-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À MORFOLOGIA DAS HEMÁCIAS

9. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO NÚMERO DE LEUCÓCITOS

O número de leucócitos estava distribuído entre os pacientes da seguinte forma: < 4.000/mm³ (57%), de 4.000-10.000/mm³ (38%) e > 10.000/mm³ (5%).

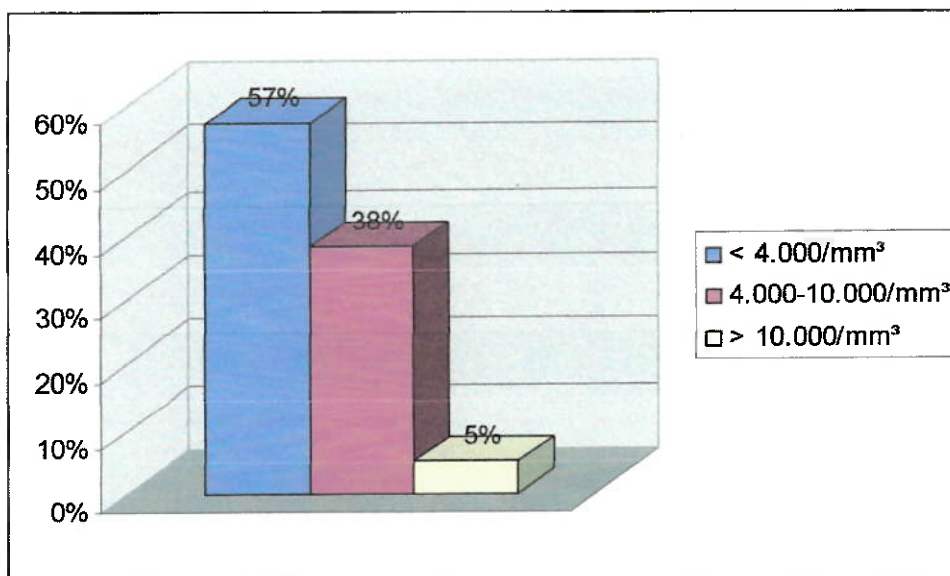


Gráfico 9-DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO NÚMERO DE LEUCÓCITOS

10. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO NÚMERO DE PLAQUETAS

O número de plaquetas estava distribuído entre os pacientes da seguinte forma: 150.000-450.000/ mm^3 (50%), de 60.000-100.000/ mm^3 (28%) e $< 10.000/\text{mm}^3$ (22%).

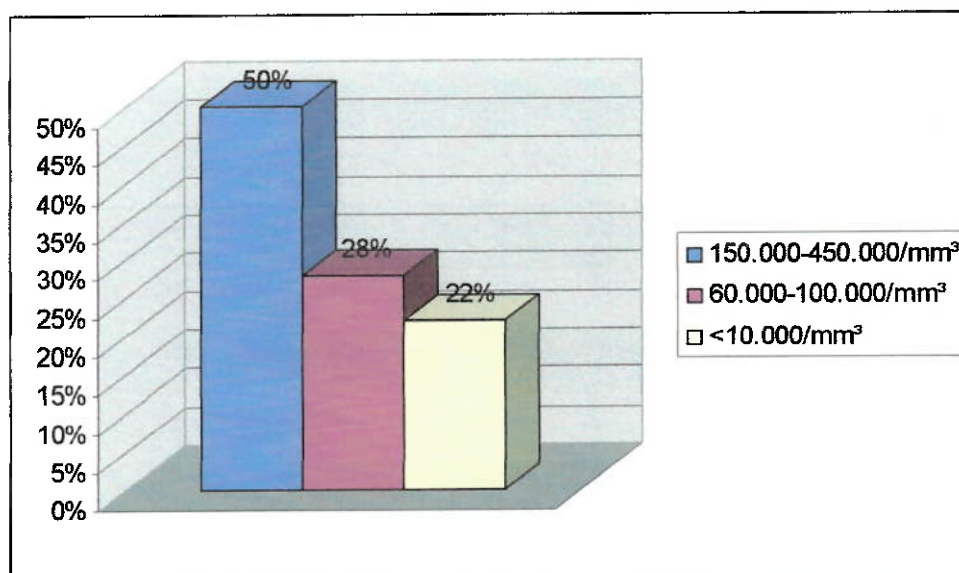


Gráfico 10-DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO NÚMERO DE PLAQUETAS

11. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO NÚMERO DE RETICULÓCITOS

Entre os pacientes: 79% apresentaram reticulocitose, 14% tinham reticulócitos normais e 7% apresentaram reticulocitopenia.

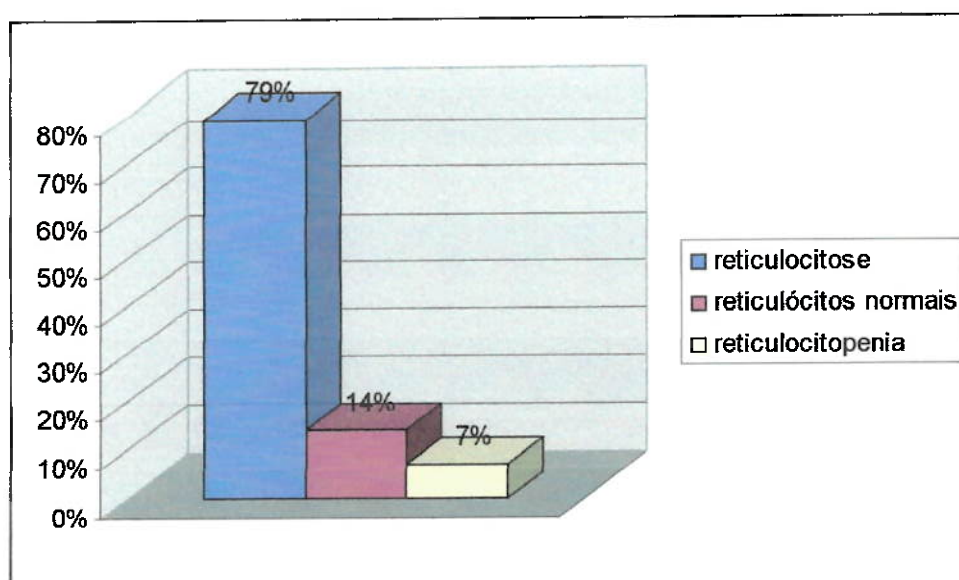


Gráfico 11-DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES QUANTO AO NÚMERO DE RETICULÓCITOS

12. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO LAUDO DO MIELOGRAMA

Em relação ao laudo do mielograma: 58% dos pacientes apresentaram uma hiperplasia eritróide, 21% um aspirado medular hipocelular, 7% um aspirado medular hipocelular com leve deseritropoese, 7% uma hipoplasia megacariocítica e 7% um aspirado medular normoplástico.

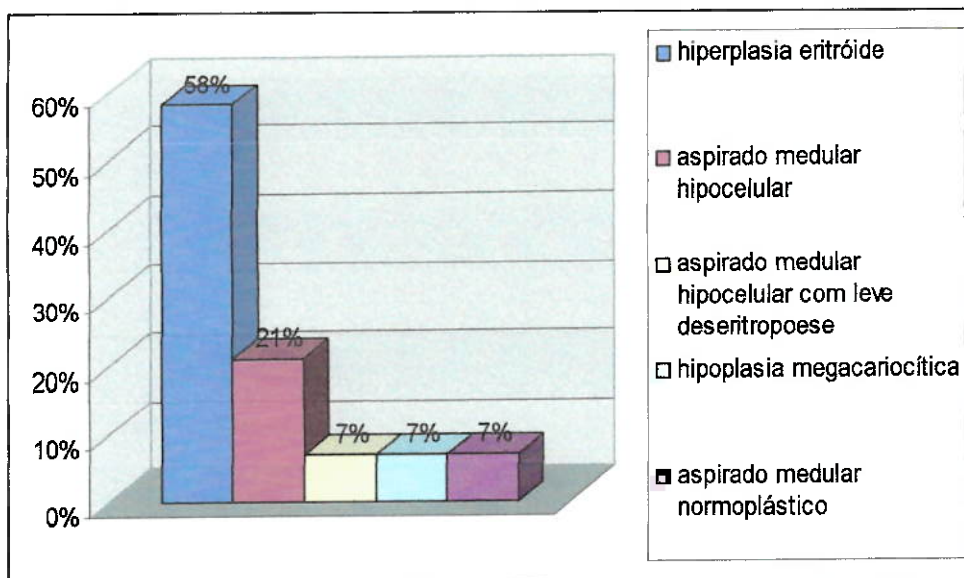


Gráfico 12-CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO LAUDO DO MIELOGRAMA

13. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO LAUDO DA BIÓPSIA ÓSSEA

Em relação ao laudo da biópsia óssea: 72% dos pacientes apresentaram uma hiperplasia eritróide, 21% apresentaram uma medula hematopoética hipocelular e 7% não realizaram o exame.

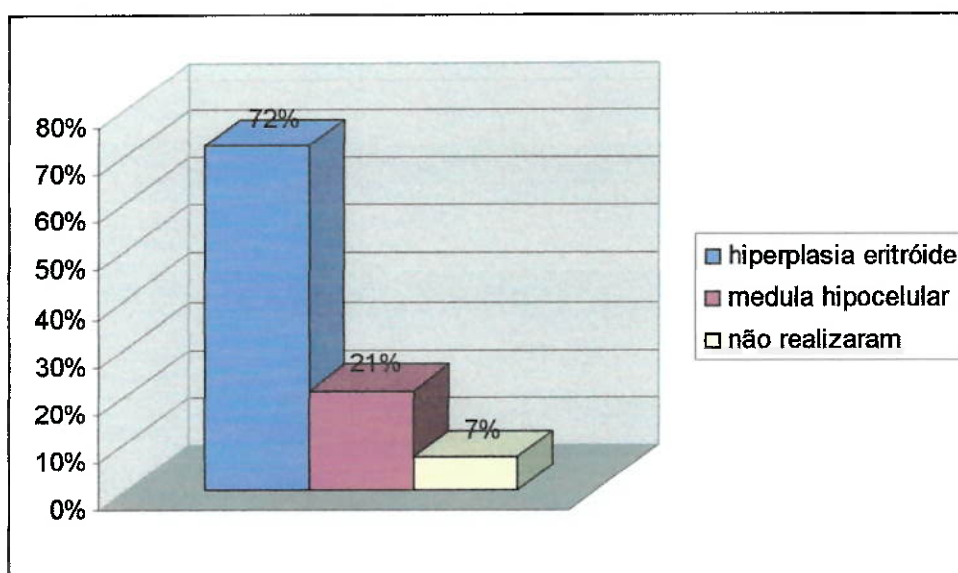


Gráfico 13-CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO LAUDO DA BIÓPSIA ÓSSEA

14. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À POSTIVIDADE DO COOMBS – DIRETO

Dentre os pacientes: 80% apresentaram Coombs-negativo e 20% Coombs-positivo.

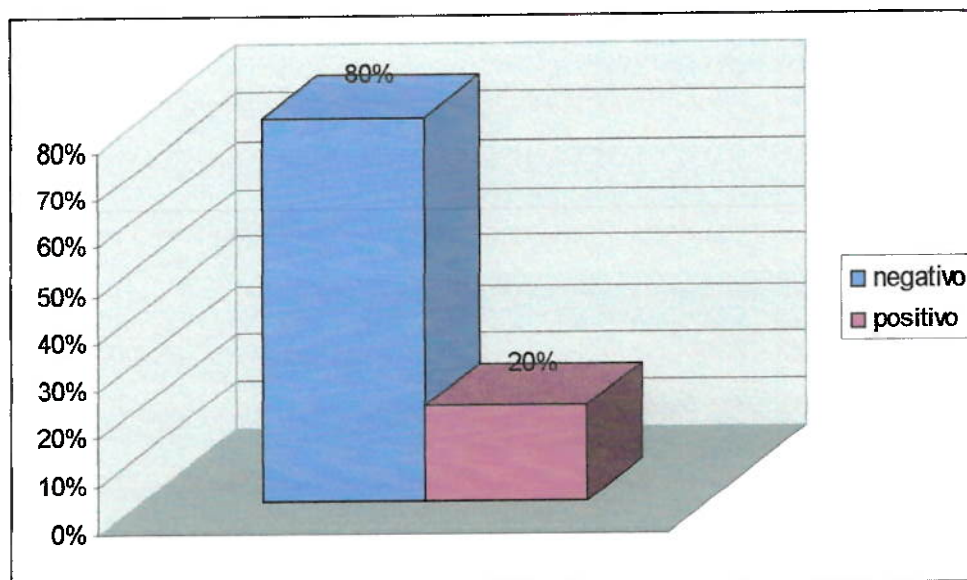


Gráfico 14-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À POSTIVIDADE DO COOMBS –DIRETO

15. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO VHS

Dentre os pacientes: 78% apresentaram um resultado > que os valores de referência e 22% um resultado dentro dos valores de referência.

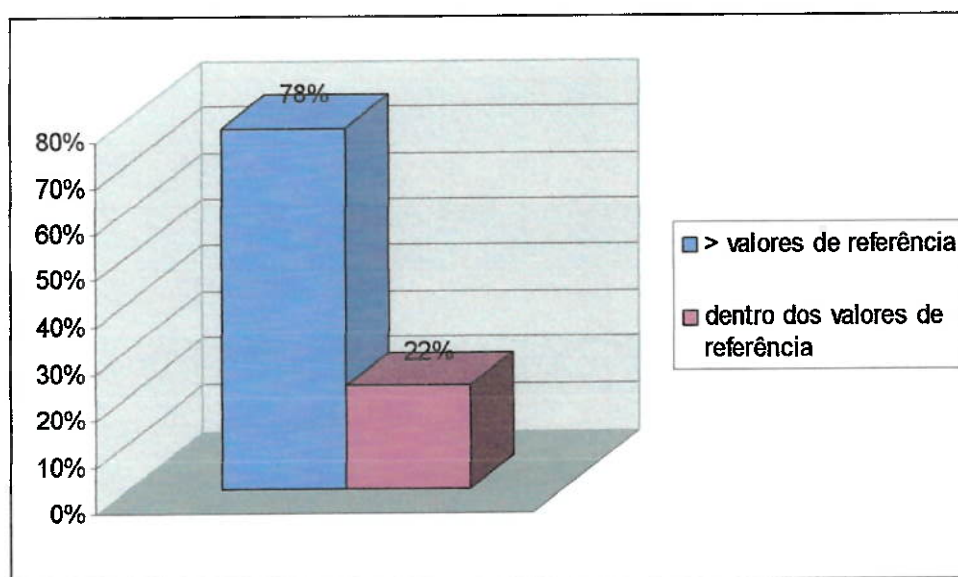


Gráfico 15-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO VHS

16. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO LDH

Dentre os pacientes: 58% apresentaram um resultado aumentado e 42% um resultado dentro do valor de referência.

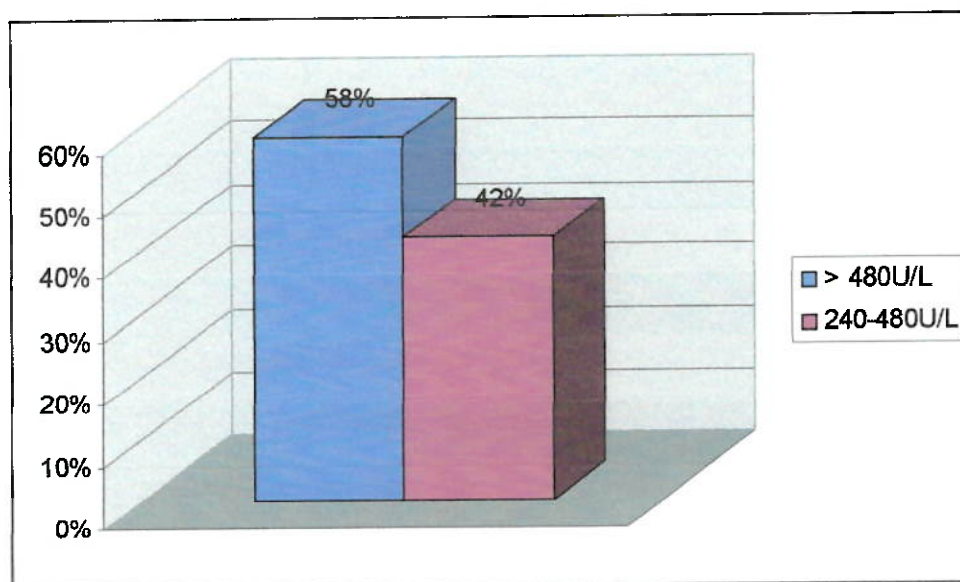


Gráfico 16-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO LDH

17. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE TAP E TPTa

Todos os pacientes (100%) apresentaram TAP e TPTa normais.

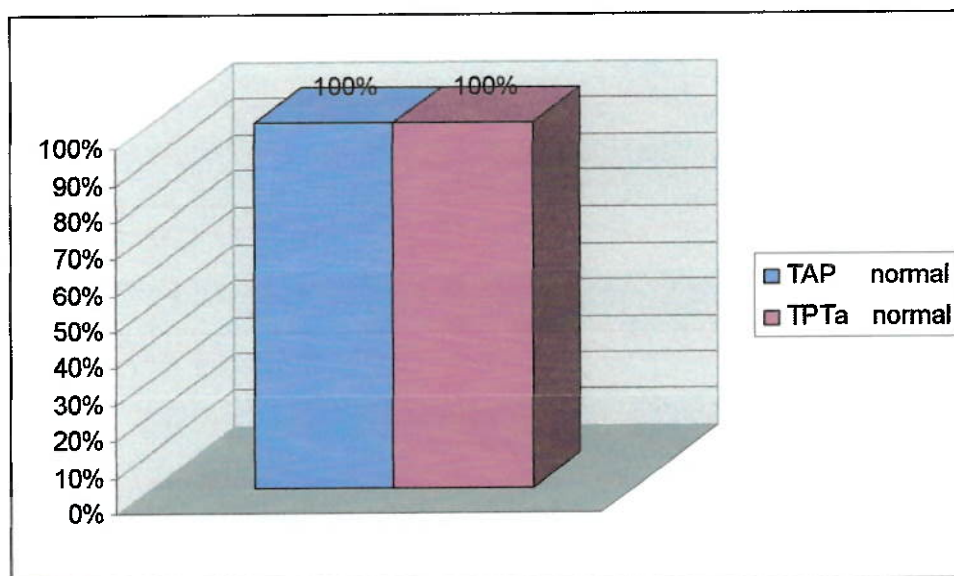


Gráfico 17-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE TAP E TPTa

18. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE BILIRRUBINA INDIRETA

Dentre os pacientes: 86% apresentaram BI aumentada e 14% apresentaram um resultado dentro do valor de referência.

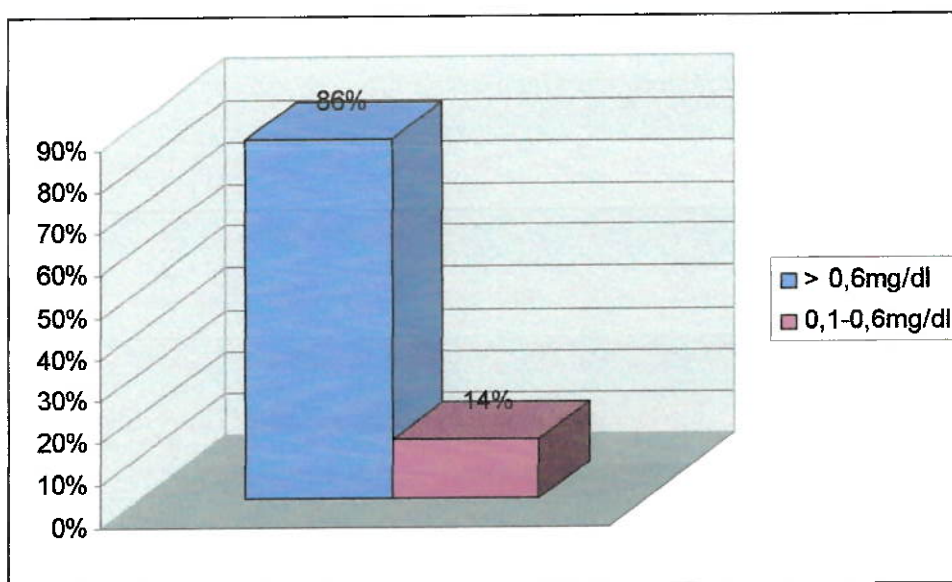


Gráfico 18-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE BI

19. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE AST

Dentre os pacientes: 79% apresentaram um resultado aumentado e 21% um resultado dentro do valor de referência.

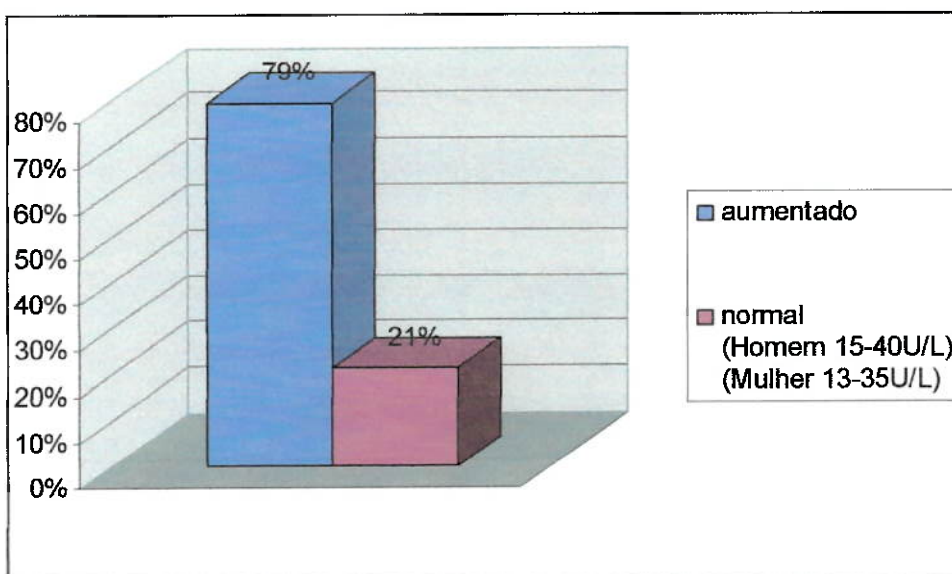


Gráfico 19-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE AST

20. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE ALT

Dentre os pacientes: 64% apresentaram um resultado aumentado e 38% um resultado dentro do valor de referência.

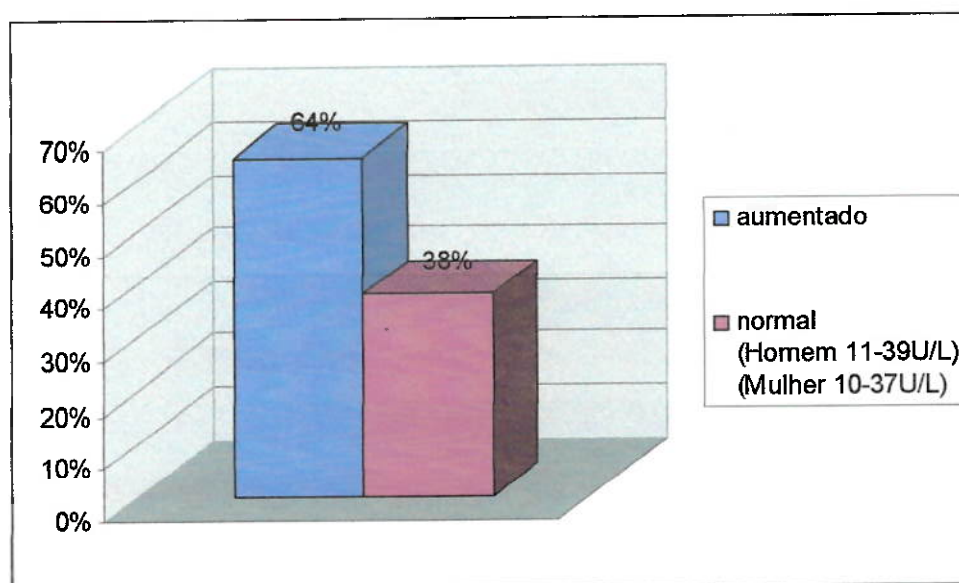


Gráfico 20-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DE ALT

21. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO METABOLISMO FERRO

Dentre os pacientes: 64% apresentaram ferro sérico diminuído, 50% apresentaram TIBC aumentada, 57% apresentaram IST diminuído e 50% apresentaram ferritina diminuída.

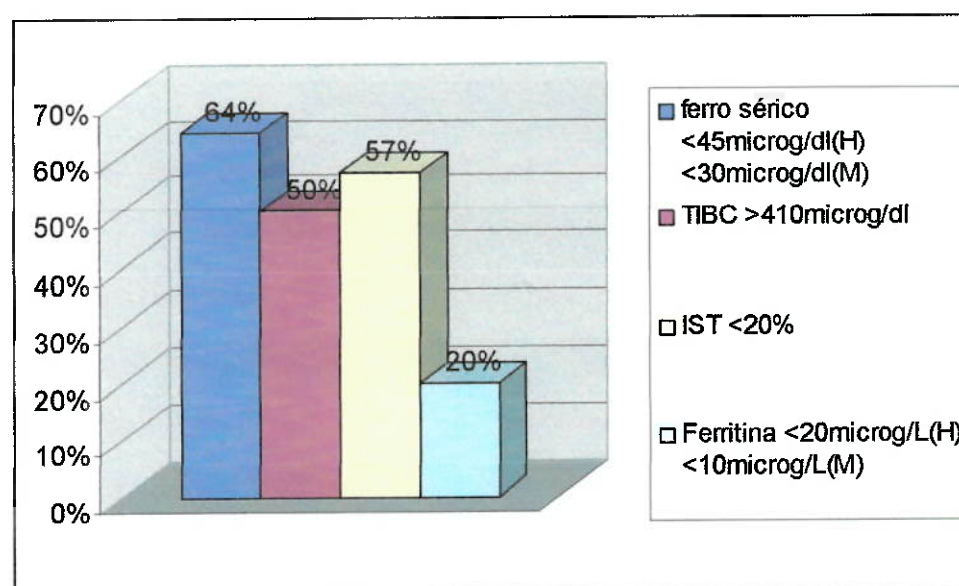


Gráfico 21-CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO METABOLISMO DO FERRO

22. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO SUMÁRIO DE URINA

Todos os pacientes (100%) apresentaram episódios de hemoglobinúria.

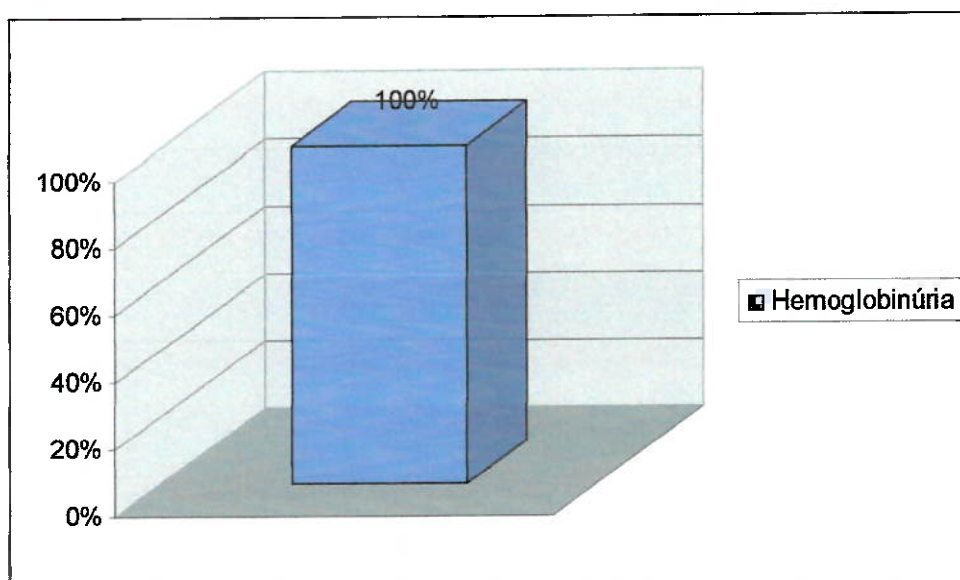


Gráfico 22-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO SUMÁRIO DE URINA

23. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO TESTE DE HAM

Todos os pacientes (100%) apresentaram teste de Ham positivo.

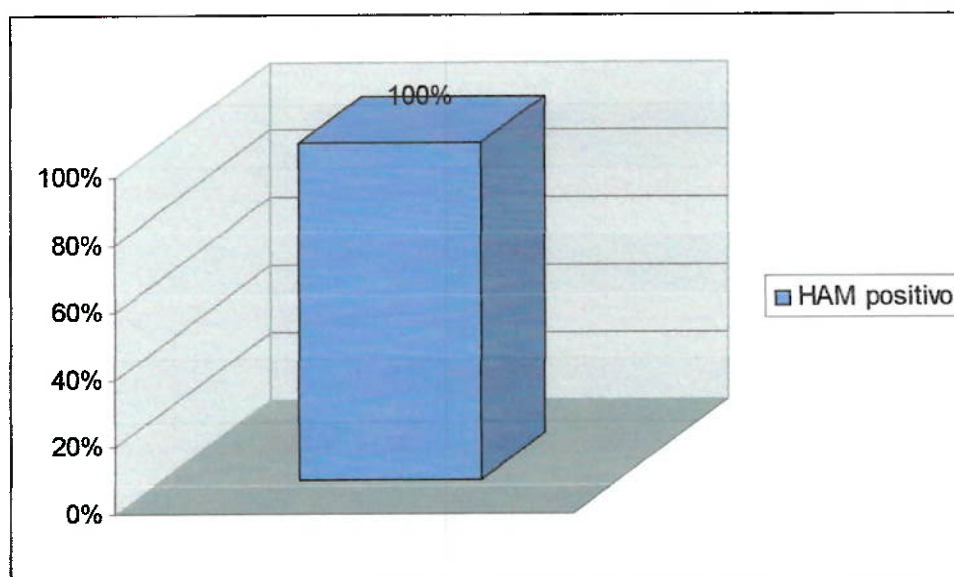


Gráfico 23-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DO TESTE DE HAM

24. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À REALIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO

Somente 36% dos pacientes realizaram citometria de fluxo como método diagnóstico, enquanto 33% só o fizeram após o tratamento e 31% não realizaram o exame, obtendo seu diagnóstico apenas com o resultado do teste de Ham.

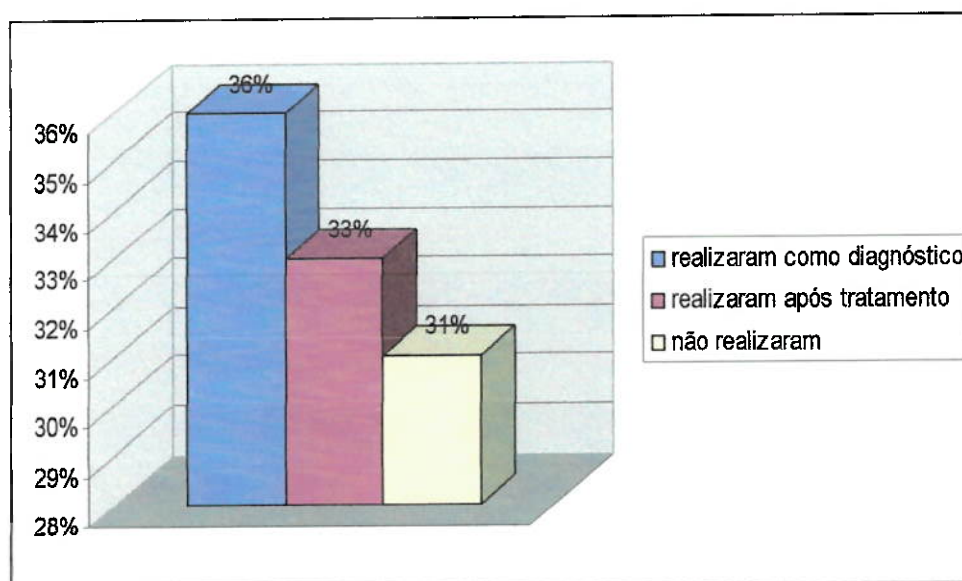


Gráfico 24-DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA QUANTO À REALIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO

25. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DA CITOMETRIA DE FLUXO

Nos pacientes que realizaram citometria de fluxo foi pesquisada a presença de receptores CD55 e CD59 em granulócitos e eritrócitos e CD14 em monócitos. Todos os pacientes (100%) que realizaram o exame após o tratamento obtiveram resultado negativo. Dentre os pacientes que realizaram o exame como método diagnóstico foi observado que os receptores CD55 e CD59 estavam ausentes em maior porcentagem nos granulócitos (média 70%) do que nos eritrócitos (média 40%) e que o receptor CD14 estava ausente em uma porcentagem > 90% nos monócitos de todos os pacientes (média 94%).

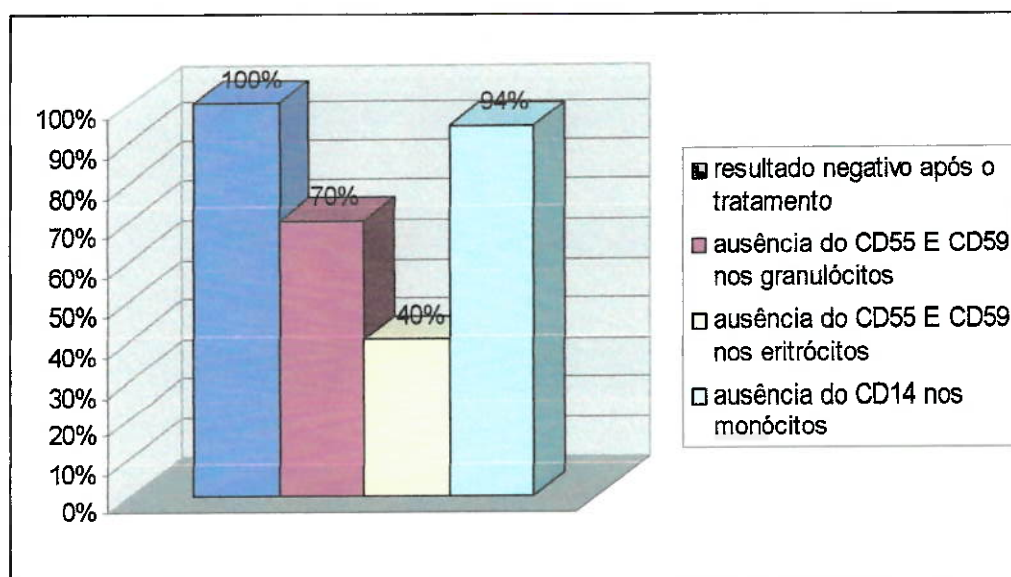


GRÁFICO 25-CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO RESULTADO DA CITOMETRIA DE FLUXO

26. CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO TRATAMENTO

Dentre os pacientes: 71% utilizaram prednisona e ácido fólico; 21% prednisona, ácido fólico e sulfato ferroso; 14% realizaram transplante de medula óssea e 7% utilizaram globulina anti-timocítica.

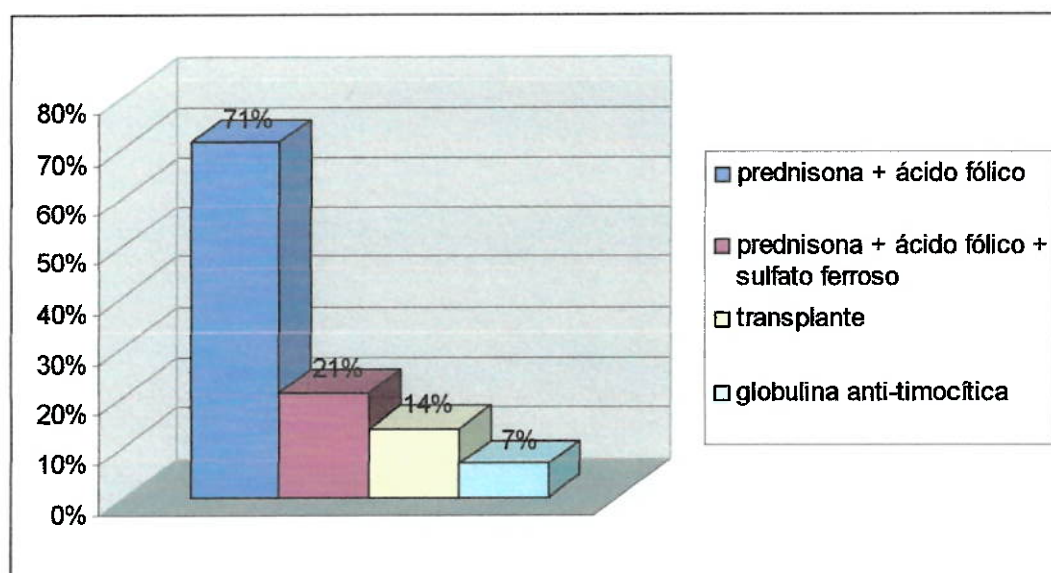


Gráfico 26-CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA QUANTO AO TRATAMENTO

O perfil clínico-laboratorial do paciente HPN do HUWC obteve o seguinte padrão em relação à média dos parâmetros abordados (tabela 2):

Tabela 2-Perfil clínico-laboratorial do paciente HPN do HUWC em relação à média dos parâmetros abordados

IDADE	SEXO	ANTECEDENTES	FREQUÊNCIA DE TRANSFUSÃO
35 anos	Feminino	anemia	politransfundido
SINTOMAS	SINTOMAS	SINTOMAS	SINTOMAS
episódios de urina escura	edema nos membros inferiores	dor nos membros inferiores	palidez
Icterícia	Gengivorragia	epistaxe	hipermenorréia
Petéquias	infecções frequentes	esplenomegalia	hepatomegalia
Tonturas	Cefaléia	dor lombar	Sonolência
Hemorróida	Trombose		
Hg	MORFOLOGIA DAS HEMÁCIAS	LEUCÓCITOS	PLAQUETAS
7,5g/dl	macrocíticas hipocrômicas	3.900/mm ³	145.000/mm ³
RETICULÓCITOS	MIELOGRAMA	BIÓPSIA ÓSSEA	COOMBS-DIRETO
Reticulocitose	hiperplasia eritróide	hiperplasia eritróide	negativo
VHS	LDH	TAP	TPT _a
Aumentado	Aumentado	normal	normal
BI	TGO	TGP	FERRO SÉRICO
Aumentada	Aumentado	aumentado	diminuído
TIBC	IST	FERRITINA	SUMÁRIO DE URINA
Aumentado	Diminuído	normal	hemoglobinúria
TESTE DE HAM	CITOMETRIA DE FLUXO		TEMPO DE DIAGNÓSTICO
Positivo	CD55 e CD59	CD14	1,5 ano
	Ausente em: 70% dos granulócitos e em 40% dos eritrócitos	Ausente em: 94% dos monócitos	prednisona + ácido fólico

5 DISCUSSÃO

A maioria dos pacientes é do sexo feminino (57%) e apresentou idade entre 20-50 anos (84%). Socié, et. al. 1996 demonstraram em um estudo com 220 pacientes com HPN uma frequência de 55% no sexo feminino e 79% com idade acima de 21 anos²⁵.

Os seguintes sintomas foram encontrados: episódios de urina escura (100%), edema nos membros inferiores (86%), icterícia (57%), palidez (57%), dor nos membros inferiores (50%), gengivorragia (50%), epistaxe (50%), hipermenorréia (50%), cefaléia (43%), petéquias (43%), infecções frequentes (43%), esplenomegalia (28%), sonolência (28%), tonturas (28%), hepatomegalia (28%), dor lombar (22%), hemorróida (14%) e episódios de trombose (7%). Rosenfeld, et. al. 1995 obtiveram um resultado diferente, com uma frequência de apenas 25% de episódios de urina escura nos pacientes estudados²⁶. A prevalência de hemoglobinúria na sintomatologia é devida à hemólise intravascular que ocorre na doença, o que também esclarece a icterícia dos pacientes, podendo ser desencadeada ou exacerbada por diversos fatores, tais como: infecções, transfusões sanguíneas, procedimentos cirúrgicos, menstruação, exposição ao frio e exercícios físicos extenuantes²⁷. Sonolência, tonturas e palidez são comuns em qualquer tipo de anemia, particularmente quando é severa. Manifestação como cefaléia é atribuída à trombose de microvasculatura cerebral. A hepatomegalia é causada pela trombose das veias hepáticas²⁸. A esplenomegalia é explicada pelo excesso de destruição de hemácias defeituosas. Infecções frequentes são devido à hipoplasia medular. Fenômenos hemorrágicos estão associados à plaquetopenia. A baixa frequência de fenômenos trombóticos é explicada pela moderada e não acentuada deficiência e/ou ausência dos antígenos CD55 e CD59, pois a sensibilidade das células do tecido hematopoético ao complemento é resultado da deficiência destes nas membranas celulares.

Os pacientes apresentaram a doença associada a outras patologias já diagnosticadas, entre as quais se encontra a Anemia Aplástica, que deve ser destacada devido à sua comum associação com HPN. Dentre eles, 38% apresentaram esta doença associada à HPN. Griscelli-Bennaceur, et. al. 1995 encontrou um resultado semelhante em um estudo em que 33% dos pacientes com HPN apresentaram associação com Anemia Aplástica²⁹.

O hemograma dos casos estudados obteve o seguinte padrão: anemia (100%), Hb < 7g/dl (50%), hemácias macrocíticas hipocrômicas (44%), número de leucócitos < 4.000/mm³ (57%) e número de plaquetas 150.000-450.000/mm³ (50%). Resultado semelhante foi demonstrado

em um estudo com 220 pacientes com HPN, onde 90% apresentaram anemia, 41% leucocitopenia e 49% plaquetas normais em número²⁵. O paciente HPN normalmente cursa com anemia macrocítica, podendo ser normocítica ou mesmo microcítica se ocorrer carência de ferro. Habitualmente também ocorrem plaquetopenia e neutropenia (pancitopenia)¹⁴. A maioria dos casos (79%) apresentou reticulocitose, o que pode ser esclarecido pela resposta da medula óssea frente às crises de hemólise. A conclusão do mielograma e da biópsia óssea, respectivamente, foi: hiperplasia eritróide (58%) e medula hematopoética com hiperplasia eritróide (72%), o que revela que a medula óssea dos pacientes é solicitada para suprir a destruição das hemácias pelo sistema complemento.

O resultado dos exames laboratoriais realizados foi compatível com o esperado para a doença. Em relação ao Coombs-direto, 80% apresentaram resultado negativo e 20% positivo. Todos os pacientes que obtiveram resultado positivo no teste, também apresentaram Anemia Hemolítica Auto-imune. A triagem com o teste de Coombs é útil para subdividir as anemias hemolíticas em dois grandes grupos: anemia hemolítica imune e não imune. Quando o teste é não reagente em fase de gel praticamente descarta anemia hemolítica auto-imune, apesar de raros casos serem Coombs-negativo, devendo-se considerar, portanto, a presença de anemia hemolítica não imune¹⁴. Como a HPN trata-se de anemia hemolítica não imune, espera-se que o resultado do exame seja negativo, o que foi compatível com o resultado de 80% dos pacientes.

Em relação ao VHS, 78% apresentaram resultado aumentado que os valores de referência (Homens < 50 anos: < 15mm; Mulheres < 50anos: < 20mm; Homens de 50-85 anos: <20mm e Mulheres de 50-85 anos: < 30mm) e 22% um resultado dentro dos valores de referência. Estes resultados podem variar de acordo com a condição clínica do paciente, como por exemplo, a presença ou não de anemia ou se o paciente apresenta ou não alguma doença auto-imune associada; isto porque o VHS é influenciado pelos níveis séricos de fibrinogênio, de imunoglobulinas, de outras proteínas de fase aguda, pela presença de anemia; além de fatores inespecíficos como a idade, o sexo, a cor e o eventual uso de contraceptivos orais, penicilina e outras drogas; sendo usado apenas como auxiliar no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de diversas condições clínicas por se tratar de um exame inespecífico³⁰.

Em relação ao LDH, 58% apresentaram resultado aumentado > 480U/L e 42% dentro do valor de referência (240-480U/L). É facilmente esclarecido o motivo pelo qual a maioria destes pacientes apresentou uma elevação deste exame, visto que as hemácias apresentam

uma grande quantidade desta enzima em seu interior e que os episódios de hemólise intravascular, comuns nesta doença, acarretam a liberação desta para o plasma³¹.

O TAP é utilizado na triagem para deficiência de fatores da via extrínseca e comum da coagulação [I (fibrinogênio), II (protrombina), V, X e VII], no controle da anticoagulação oral e avaliação pré-operatória. O TPTa é utilizado na triagem para deficiência de fatores da via intrínseca e comum da coagulação (I, II, V, X, VIII, IX, XI e XII), no controle do uso de heparina e na avaliação pré-operatória. Portanto, é justificado o fato de que todos os pacientes (100%) apresentaram TAP e TPTa normais no diagnóstico³².

A bilirrubina é o principal produto do metabolismo do heme da hemoglobina. A hemoglobina é metabolizada no baço e no sistema reticuloendotelial dando origem à biliverdina, que é reduzida à bilirrubina pela enzima biliverdina redutase. A bilirrubina recém-formada circula no sangue ligada à albumina sérica, sendo chamada de bilirrubina indireta, encontrando-se elevada, dentre outros fatores, na anemia hemolítica³³. Isto evidencia porque os pacientes (86%) apresentaram aumento de bilirrubina indireta. As aminotransferases também apresentaram resultado aumentado, 79% dos pacientes tinham elevação de AST e 64% de ALT. Embora estas enzimas sejam mais utilizadas para o diagnóstico de outras alterações, como doença hepática e doença cardíaca, podem apresentar níveis séricos aumentados em crises de hemólise, pois também estão presentes no interior dos eritrócitos.

Um dado muito importante no diagnóstico da patologia é o estudo do metabolismo do ferro. Os pacientes apresentaram ferro sérico diminuído (64%), TIBC aumentada (50%), IST diminuído (57%) e ferritina diminuída (50%). A deficiência de ferro verificada é devido aos episódios de hemoglobinúria e hemossidenúria.

O teste de Ham é utilizado na rotina dos laboratórios para o diagnóstico de HPN embora não seja suficientemente sensível e nem demonstre a verdadeira proporção de células anormais³⁴. A citometria de fluxo é indiscutivelmente o método mais específico e sensível que os métodos tradicionais (teste de Ham e sacarose), pois além de revelar a deficiência ou ausência das proteínas ligadas a GPI, determina a porcentagem das células que são anormais e identifica as populações com graus diferentes de deficiência¹⁶. Outra vantagem oferecida pela citometria de fluxo é a possibilidade de se realizar o diagnóstico mesmo após crises hemolíticas severas ou após transfusões, através da análise de granulócitos e monócitos. Apenas 36% dos pacientes realizaram citometria de fluxo como método diagnóstico, enquanto

hemolíticas severas ou após transfusões, através da análise de granulócitos e monócitos. Apenas 36% dos pacientes realizaram citometria de fluxo como método diagnóstico, enquanto 33% só o fizeram após o tratamento e 31% não realizaram o exame, obtendo seu diagnóstico apenas com o resultado do teste de Ham. Todos os pacientes (100%) apresentaram teste de Ham positivo. Resultado semelhante foi encontrado em um trabalho em que 100% dos pacientes com HPN apresentaram teste de Ham positivo²⁵. Nos que realizaram citometria de fluxo foi pesquisada a presença de receptores CD55 e CD59 em granulócitos e eritrócitos e CD14 em monócitos. Todos (100%) que realizaram o exame após o tratamento obtiveram resultado negativo. Dentre os pacientes que realizaram o exame como método diagnóstico foi observado que os receptores CD55 e CD59 estavam ausentes em maior porcentagem nos granulócitos (média 70%) do que nos eritrócitos (média 40%) e que o receptor CD14 estava ausente em uma porcentagem > 90% nos monócitos de todos os pacientes (média 94%). Resultado semelhante foi encontrado por Hall e Rosse (1992) que compararam a proporção de granulócitos e eritrócitos anormais através de estudo de CD55 e CD59 por citometria de fluxo e demonstraram que: 23/35 (65,7%) apresentaram percentual de granulócitos anormais maior que percentual de eritrócitos anormais, 7/35 (20,0%) não apresentaram diferença significativa entre os dois tipos celulares e 5/35 (14,3%) apresentaram percentual de granulócitos anormais menor que o de eritrócitos anormais³⁵. Muitas vezes o percentual de eritrócitos anormais está reduzido devido a graus variáveis de hemólise, além da possibilidade de presença variável de hipoplasia medular. Já a sobrevida média dos granulócitos anormais é normal, portanto, o percentual de granulócitos anormais deve refletir melhor a proporção de células anormais liberadas para a circulação.

O tratamento desses pacientes era instituído de acordo com suas manifestações clínicas. Para a grande maioria, 71%, fora instituído o tratamento com prednisona e ácido fólico; 21%, com prednisona, ácido fólico e sulfato ferroso; 14% realizaram transplante de medula óssea e 7% realizaram tratamento com globulina anti-timocítica. O uso de prednisona proporcionou uma melhor qualidade de vida aos pacientes devido à sua capacidade de inibição e tratamento das crises hemolíticas, pois com o uso da droga as células dos pacientes ficavam menos susceptíveis à ação lítica do complemento. O ácido fólico foi utilizado como terapia de reposição. O sulfato ferroso era utilizado nos pacientes que estavam desenvolvendo anemia ferropriva devido à excessiva perda de ferro por hemoglobinúria³⁶. Os pacientes que realizaram transplante de medula óssea obtiveram bons resultados, sendo considerado como tratamento de cura²⁰. A utilização de globulina anti-timocítica proporcionou uma correção das

citopenias dos pacientes, visto que os linfócitos T modificam a hematopoese podendo desempenhar um papel importante na sua diminuição²³.

Quando o tratamento dos pacientes não tem sucesso ou é impossibilitada, podem precisar de uma transfusão. A transfusão de hemácias é a mais comum nesta patologia, pois como já explicado, as células dos pacientes ficam mais susceptíveis à ação do complemento³⁶. Na amostragem estudada 57% dos pacientes eram politransfundidos, 35% não receberam nenhuma transfusão e 7% havia recebido uma transfusão anterior ao diagnóstico de HPN. O que foi verificado era que muitas transfusões, além dos fatores já mencionados, foram realizadas devido a não conclusão diagnóstica, sendo usada como tratamento exclusivo.

6 CONCLUSÃO

A maioria dos pacientes estudados era do sexo feminino e tinham uma idade média de 35 anos. O tempo de diagnóstico foi de 1,5 ano;

Os sinais e sintomas mais prevalentes foram: episódios de urina escura, edema nos membros inferiores, icterícia, palidez, dor nos membros inferiores, gengivorragia, epistaxe, hipermenorréia;

Em relação aos parâmetros do hemograma e contagem de reticulócitos, os resultados mais freqüentes foram: anemia, dosagem de hemoglobina $< 7\text{g/dl}$, morfologia das hemácias: macrocíticas e hipocrômicas, leucopenia, número de plaquetas dentro dos valores de referência e reticulocitose;

O mielograma e a biópsia óssea foram caracterizados por hiperplasia eritróide na maioria dos casos;

Todos os pacientes apresentaram episódios de hemoglobinúria. O ferro circulante se apresentou diminuído, com CTLFe aumentada, IST diminuído e ferritina diminuída na maioria dos casos;

O teste de Ham teve resultado positivo em todos os pacientes. A citometria de fluxo foi realizada em apenas 36% dos pacientes como método diagnóstico, enquanto 33% só o fizeram após o tratamento e 31% não realizaram o exame. Portanto, não foi possível avaliar a sensibilidade dos dois testes (Ham e citometria de fluxo), pois a maioria dos pacientes obteve conclusão diagnóstica apenas com o resultado do teste de Ham;

O tratamento com prednisona e ácido fólico foi o mais utilizado pelos pacientes.

7 REFERÊNCIAS

1. PARKER, C.J.; RICHARD-LEE, G. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. In: RICHARD-LEE, G.; FOERST, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M. (Ed.). **Wintrobe's clinical hematology**. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. p. 1264-1286.
2. ENDO, M.; WARE, R.E.; VREEKE, T.M.; SINGH, S.P.; HOWARD, J.A.; TOMITA, A.; HOLGOIN, M.H.; PARKER, C.J. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2546-2557, Mar. 1996.
3. ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hemoglobinúria paroxística noturna. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 63-168.
4. BOCCUNI, P.; DEL VECCHIO, L.; DI NOTO, R.; ROTOLI, B. Glycosil phosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Crit. Rev. in Oncol. Hematology**, v. 33, n. 1, p. 25-43, Jan. 2000.
5. YOON, J.H.; CHO, H.I.; PARK, S.S.; CHANG, Y.H.; KIM, B.K. Mutation analysis of the PIG-A gene in Korean patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **J. Clin Pathol.**, v. 55, p. 410-413, 2002.
6. ROSSE, W.F.; WARE, R. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 86, n. 9, p. 3277-3286, Nov. 1995.
7. ROSTI, V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Haematologica**, v. 85, p. 82-95, 2000.
8. MURAKAMI, Y.; KINOSHITA, T.; MAEDA, Y. Different roles of glycosyl-phosphatidylinositol in various hematopoietic cells as revealed by a mouse model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 94, p. 2963-2970, 1999.
9. ENDO, M.; WARE, R.E.; VREEKE, T.M. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 87, p. 2546-2557, 1996.
10. WENDEL, F.R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. **Medicine**, v. 76, p. 63-85, 1997.

11. PLOUGH, M.; PLESNER, T.; RONE, E. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 79, p. 1447-1455, 1992.
12. ZALMAN, L.S. Homologous restriction factor. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 178, p. 87-89, 1992.
13. MELETIS, J.; TERPOS, E. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical presentation and association with other haematological disorders. **Haema**, v. 4, p. 79-88, 2001.
14. RICHARD-LEE, G. Hemoglobinuria paroxística nocturna. In: WINTROBE, M.M. **Wintrobe's hematología clínica**. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p. 1072-1083.
15. KINOSHITA, T.; INOUE, N.; TAKEDA, J. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor syntesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Adv. Immunol.**, n. 60, p. 57-102, 1995.
16. PARKER, C.; OMINE, M.; RICHARDS, S.; NISHIMURA, J.; BESSLER, M.; WARE, R. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3699-3709, Dec. 2005.
17. YOUNG NS. Acquired aplastic anemia. **JAMA**, v. 282, p. 271-278, 1999.
18. HILLMEN, P.; LEWIS, S.M.; BESSLER, M. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, p. 1253-1258, 1995.
19. GADNER, F.H.; MURPHY, S. Granulocyte and platelet functions in PNH. **Ser. Haematol.**, v. 5, p. 78-80, 1967.
20. ARAÚJO, C.J.; SOARES, F.V.M.; ROCHA, F.D.; SILVA, H.F.; NOGUEIRA, J.O.L.; CORREIA, J.W.; GUIMARÃES, M.P.G. Hemoglobinúria paroxística noturna: relato de dois casos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 24, n. 4, p. 286-290, out/dez. 2002.
21. MCMULLIN, M.F.; HILLMEN, P.; JACKSON, J. Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **J. Intern. Méd.**, v. 235, p. 85-87, 1994.
22. MACHÍN GARCIA, S.; SVARCH, E; DORTICÓS BALEA, E. Aplasia medular: Actualización. **Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.**, v. 15, n.2, p. 79-90, mayo/ago. 1999.
23. SÁNCHEZ VALLE, E.; MORALES POLANCO, M.R.; GÓMEZ MORALES, E.; GUTIERREZ ALAMILLO, L.I.; GUTIERREZ ESPINDOLA, G. PIZZUTO

- CHÁVEZ, J. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with antilymphocytic globulin. **Rev Invest Clin**, v. 45, n. 5, p. 457-461, sept/oct. 1993.
24. LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Hematology**, v. 18, p. 82-87, 2000.
25. SOCIÉ, G.; MARY, J.Y.; DE GRAMONT, A.; RIO, B.; LEPORRIER, M.; ROSE, C. et al. Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. **Lancet**, v. 348, p. 537-577, 1996.
26. ROSENFELD, S.I.; JENKINS, D.E.; LEDDY, J.P. Enhanced reactive lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes by C 5b9 does not involve increase C7 binding or cell-bound C3b. **J. Immunol.**, v. 134, p. 506-510, 1995.
27. NAKAKUMA, H.; NAGAKURA, S.; IWAMOTO, N.; HORIKAMA, K. KAWAGUCHI, T.; TAKATSURI, K. Migration to on inflammatory site in vivo of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria lymphocytes [Letter]. **Int. J. Hematol.**, v. 61, n. 4, p. 223-225, June. 1995.
28. VALLA, D.; DHUMEAUX, D.; BABANY, G.; HILLON, P.; RUEFF, B.; ROCHANT, H.; BENHAMOU, J.P. Hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a spectrum from asymptomatic occlusion of hepatic venules to fatal Budd-Chiari Syndrome. **Gastroenterology**, v. 93, n. 3, p. 569-575, Sept. 1987.
29. GRISCELLI-BENNACEUR, A.; GLUCKMAN, E.; SCROBOHACI, M.L.; JONVEAUX, P.; VU, T.; BAZARBACHI, A.; CAROSELLA, E.D.; SIGAUX, F.; SOCIÉ, G. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link. **Blood**, v. 85, n. 5, p. 1354-1363, Mar. 1995.
30. SANTOS, V.M.; CUNHA, S.F.C.; CUNHA, D.F. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p. 232-236, 2000.
31. HENRY JB. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996, p. 464-465.
32. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Avaliação laboratorial da hemostasia. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 749-755.
33. SHERLOCK, S.; DOOLEY, D. **Diseases of the liver and biliary system**. 11th ed. Oxford: Blackwell Science, 2002, p. 205-218.
34. WARE, R.E.; HALL, S.E.; ROSSE, W.F. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 991-996, 1991. 10.

35. HALL, S.E.; ROSSE, W.F. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Blood**, v. 87, p. 5332-5340, 1996.
36. ROSSE, W.F. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 60, p. 20-23, 1982.

ANEXO

Abreviaturas utilizadas no trabalho:

VHS- Velocidade de hemossedimentação

LDH- Lactato-desidrogenase

TAP- Tempo de protrombina

TPTa- Tempo parcial de tromboplastina ativado

BI- Bilirrubina indireta

AST- Aspartato-aminotransferase

ALT- Alanina-aminotransferase

TIBC- Capacidade total de ligação do ferro

IST- Índice de saturação da transferrina