

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Giseli Megue Pagliarini

**Análise do perfil laboratorial de portadores de clones de hemoglobinúria
paroxística noturna (HPN) no Hospital Universitário Professor Polydoro
Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH**

Florianópolis

2021

Gisieli Megue Pagliarini

**Análise do perfil laboratorial de portadores de clones de hemoglobinúria
paroxística noturna (HPN) no Hospital Universitário Professor Polydoro
Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Farmacêutica.
Orientador: Profa. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.
Coorientador: Farmacêutica Chandra Chiappin Cardoso, Dra.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pagliariini, Gisieli Megue
Análise do perfil laboratorial de portadores de clones
de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) no Hospital
Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago -
HU/UFSC/EBSERH / Gisieli Megue Pagliarini ; orientador,
Ana Carolina Rabello de Moraes, coorientador, Chandra
Chiappin Cardoso, 2021.
57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. hemoglobinúria paroxística noturna. 3.
perfil laboratorial. 4. hematologia . 5. clones HPN. I.
Moraes, Ana Carolina Rabello de. II. Cardoso, Chandra
Chiappin. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Farmácia. IV. Título.

Gisieli Megue Pagliarini

**Análise do perfil laboratorial de portadores de clones de hemoglobinúria
paroxística noturna (HPN) no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani
de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Farmacêutico” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia

Florianópolis, 20 de setembro de 2021.

Profa. Liliete Canes Souza Cordeiro, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.
Orientadora
ACL/UFSC

Profa. Beatriz Garcia Mendes Borba, Dra.
Avaliadora
ACL/UFSC

Profa. Maria Cláudia Santos da Silva, Dra.
Avaliadora
ACL/UFSC

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, por todo apoio, compreensão e incentivo ao longo desses anos de graduação.

Ao meu namorado, Andrey, por todo amor, paciência, carinho, compreensão e companheirismo. Obrigada por sempre me ouvir, me aconselhar e me incentivar.

Aos meus amigos de graduação, em especial, Beatriz, Bruna, Déborah e Franchesco, por todo companheirismo e parceria ao longo desses anos.

Aos meus amigos desde o ensino médio, Diego, Gabriel e Manassés, por todas as risadas e jogos online.

Às minhas amigas que considero irmãs Beatriz e Marina (futura colega de profissão), por todos os desabafos, conselhos, reflexões e parceria.

À minha orientadora Prof. Dra. Ana Carolina, por todos ensinamentos, dedicação e disponibilidade. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de ser orientada por uma professora que eu sempre admirei. Obrigada por tudo!

À minha coorientadora Dra. Chandra Cardoso, por todas contribuições feitas a este trabalho, a sua ajuda foi fundamental. Obrigada!

Aos membros da banca, por terem aceitado meu convite para avaliar este trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e minha jornada durante a graduação.

RESUMO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença rara de células-tronco hematopoiéticas, causada por uma mutação genética que leva a uma deficiência da proteína glicosil fosfatidilinositol (GPI), que tem como função ancorar uma série de outras proteínas à membrana celular. Com a deficiência de GPI, há um impedimento das proteínas em se ancorar, o que leva ao aparecimento das manifestações clínicas variadas e que dependem da gravidade da HPN. Por ser uma doença rara e de difícil diagnóstico, sua incidência não é totalmente conhecida, mas se estima que seja de 1,3 casos novos por milhão de pessoas a cada ano. O diagnóstico e a classificação da HPN são feitos com base nas características clínicas e laboratoriais do paciente. A citometria de fluxo é a metodologia padrão para identificação e quantificação dos clones HPN. Somente o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas pode curar a HPN, entretanto, existem alguns medicamentos que podem ser utilizados no tratamento dela. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil laboratorial de portadores de clones HPN no HU/UFSC/EBSERH, além de correlacionar os resultados laboratoriais com o tamanho dos clones HPN evidenciados pelo exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Foram coletados resultados laboratoriais de quatro indivíduos que realizaram exames no HU/UFSC/EBSERH no período de 2014 à 2021. A análise dos dados demonstrou que existem correlações diretamente proporcionais entre o tamanho dos clones HPN e os resultados laboratoriais dos exames de bilirrubina total e frações, reticulócitos e hemograma, além disso, a idade apresentou correlação diretamente proporcional com o tamanho do clone HPN de hemácias. Com a realização do presente estudo, foi possível observar correlações significativas entre resultados laboratoriais e o tamanho dos clones HPN, que foram de acordo com o esperado. Contudo, ocorreram também correlações que não foram de acordo com o esperado, reforçando a necessidade da realização de novos estudos com um número maior de participantes a fim de confirmar os resultados obtidos no presente estudo.

Palavras-chave: hemoglobinúria paroxística noturna, perfil laboratorial, hematologia, clones HPN.

Analysis of the laboratory profile of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clone carriers at the University Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare disease of hematopoietic stem cells, caused by a genetic mutation that leads to a deficiency of the protein glycosyl phosphatidylinositol (GPI), which has the function of anchoring a series of other proteins to the cell membrane. With GPI deficiency, there is an impediment of proteins to anchor, which leads to the appearance of miscellaneous clinical manifestations that depend on the severity of PNH. As it is a rare disease and difficult to diagnose, its incidence is not fully known, but it is estimated that it is 1.3 new cases per million people each year. The diagnosis and classification of PNH are based on the patient's clinical and laboratory characteristics. Flow cytometry is the standard methodology for identifying and quantifying HPN clones. Only allogeneic hematopoietic stem cell transplantation can cure PNH, however, there are some drugs that can be used to treat it. Thus, the aim of this study was to evaluate the laboratory profile of carriers of HPN clones at the HU/UFSC/EBSERH, in addition to correlating the laboratory results with the size of the HPN clones evidenced by immunophenotyping by flow cytometry. Laboratory results were collected from four individuals who underwent tests at the HU/UFSC/EBSERH from 2014 to 2021. Data analysis showed that there are directly proportional correlations between the size of the HPN clones and the laboratory results of bilirubin and bilirubin fractions, reticulocytes count and complete blood count, in addition, age was directly proportional to the size of the red blood cell clone. With this study, it was possible to observe significant correlations between laboratory results and the size of the HPN clones, which were as expected. However, there were also correlations that were not as expected, reinforcing the need to carry out new studies with a larger number of participants in order to confirm the results obtained in the present study.

Keywords: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, laboratory profile, hematology, HPN clones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura da âncora glicosil fosfatidilinositol (GPI).....	14
Figura 2 - Proteínas ancoradas pela proteína glicosil fosfatidilinositol (GPI).....	15
Figura 3 - Relação das proteínas CD55 e CD59 com o sistema complemento.....	16
Figura 4 - Fluxograma de diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN)	18
Figura 5 - Manifestações clínicas na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).....	19
Figura 6 - Catabolismo da hemoglobina após hemólise intravascular.....	21
Figura 7 - Imunofenotipagem para hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) por citometria de fluxo.....	25
Figura 8 - Esquema representando o mecanismo de ação do eculizumab.....	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).	24
Quadro 2 - Critérios para a definição de alta atividade da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).	28
Quadro 3 - Interpretação do coeficiente de correlação.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho dos clones de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).....	32
Tabela 2 - Resultados laboratoriais dos exames realizados no setor de bioquímica	34
Tabela 3 - Resultados laboratoriais dos exames de bilirrubina indireta e imunofenoti- pagem para hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).....	34
Tabela 4 - Resultados laboratoriais de exames realizados no setor de hematologia.	36
Tabela 5 - Correlação entre o tamanho dos clones de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e demais parâmetros.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACHE	Acetilcolinesterase
AHAI	Anemia hemolítica autoimune
BD	Bilirrubina direta
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
CD	Cluster de diferenciação (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FLAER	Aerolisina fluorescente (do inglês, <i>fluorescent Labeled AERolysin</i>)
GPI	Glicosil fosfatidilinositol (do inglês, <i>glycosyl phosphatidylinositol</i>)
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HB	Hemoglobina
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hemácias
HPF	Hemoglobinúria paroxística ao frio
HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna
HT	Hematócrito
HU	Hospital Universitário
IMF	Imunofenotipagem
LAP	Fosfatase alcalina de leucócitos
LDH	Lactato desidrogenase
MO	Medula óssea
MS	Ministério da Saúde
NK	do inglês, <i>Natural killer</i>
PIG-A	Fosfatidilinositol glicana classe A (do inglês, <i>phosphatidylinositol glycan, class A</i>)

PMN	Polimorfonucleares
PRPC	Proteína príon
PSAP	Pressão sistólica em artéria pulmonar
SUS	Sistema Único de Saúde
TAD	Teste direto de antiglobulina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TFG	Taxa de filtração glomerular
TP	Tempo e atividade da protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
ULAC	Unidade de Laboratório de Análises Clínicas
VCM	Volume corpuscular médio
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VPM	Volume plaquetário médio
VR	Valores de referência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	FISIOPATOLOGIA	14
3.2	DIAGNÓSTICO	17
3.2.1	Aspectos clínicos	18
3.2.2	Aspectos laboratoriais	19
3.3	CLASSIFICAÇÃO.....	24
3.4	TRATAMENTO.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	29
4.1.1	Critérios de inclusão	29
4.2	COLETA DE DADOS	30
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	PERFIL DOS RESULTADOS LABORATORIAIS DOS PRINCIPAIS EXAMES SOLICITADOS JUNTO À IMUNOFENOTIPAGEM PARA HPN.....	32
5.2	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS LABORATORIAIS E TAMANHO DOS CLONES HPN.....	37
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXO A – PARECER CEPESH UFSC.....	49

1 INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença rara, causada por uma mutação somática em um gene localizado no cromossomo X. Essa doença apresenta diversas manifestações clínicas, o que torna o seu diagnóstico difícil (PARKER, 2002; 2011).

A primeira descrição da HPN como uma síndrome foi realizada por Paul Strubing em 1882. Antes disso, em 1866, o médico William Gull havia descrito o caso de um paciente com clínica compatível com HPN, porém, em sua descrição, ele não reconheceu a HPN como uma doença distinta da hemoglobinúria paroxística ao frio (HPF) (CROSBY, 1951; PARKER, 2008), que é um subtipo de anemia hemolítica autoimune (AHAI) também caracterizada por hemólise intravascular, icterícia e hemoglobinúria (BORDIN; BARROS, 2013).

Posteriormente, várias descrições clínicas da HPN foram publicadas, incluindo as de Marchiafava e Micheli, então, a síndrome de Marchiafava-Micheli foi um epônimo para a HPN durante décadas. O termo hemoglobinúria paroxística noturna foi introduzido pela primeira vez em 1925, pelo médico holandês J. Enneking que publicou um caso sugerindo que a doença fosse chamada assim (BRODSKY, 2014; CROSBY, 1951; PARKER, 2008).

Devido a sua raridade e dificuldade diagnóstica, sua incidência não é totalmente conhecida (ARRUDA *et al.*, 2010), mas se estima que a incidência mundial seja de 1,3 novos casos por um milhão de pessoas a cada ano (BOROWITZ *et al.*, 2010), afetando homens e mulheres igualmente (PARKER, 2002). Ainda, sugere-se uma maior frequência da doença no sudeste asiático e no extremo oriente (ORPHANET, 2017).

A HPN é uma doença que causa grande impacto na qualidade de vida e sobrevida dos seus portadores (BOROWITZ *et al.*, 2010) e a trombofilia é a principal causa de morbimortalidade dos pacientes (PARKER *et al.*, 2005).

Por ser uma doença rara, de perfil laboratorial heterogêneo e de grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, a caracterização do perfil laboratorial de portadores de clones HPN atendidos pelo Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH) terá importância para o diagnóstico

clínico, pois permitirá conhecer melhor esses indivíduos com clones HPN, observando quais parâmetros laboratoriais estão alterados e verificando a relação entre o tamanho do clone HPN com esses resultados laboratoriais. Essas informações são importantes, pois poderão auxiliar a melhorar o processo de diagnóstico dos casos suspeitos e o atendimento dos pacientes.

Sendo assim, este trabalho visou avaliar o perfil laboratorial de indivíduos com clones HPN que realizaram exames no HU/UFSC/EBSERH, o que poderá contribuir no processo de diagnóstico e acompanhamento desta doença rara.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil laboratorial de indivíduos portadores de clones HPN que fizeram exames no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH no período de 2014 à 2021.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

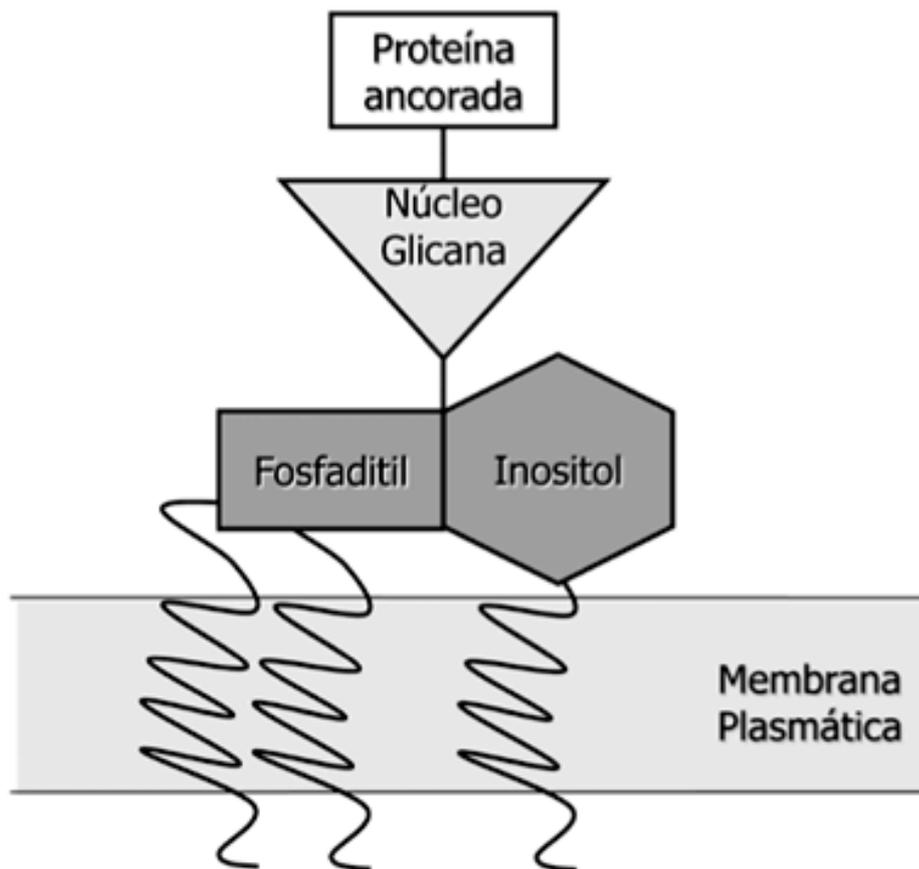
- Levantar quais exames laboratoriais foram solicitados juntamente à imunofenotipagem para HPN no HU/UFSC/EBSERH;
- Verificar a presença e o tamanho dos clones HPN identificados nos exames;
- Caracterizar o perfil dos resultados laboratoriais dos principais exames solicitados junto à imunofenotipagem para HPN;
- Relacionar os resultados laboratoriais com o tamanho dos clones HPN.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FISIOPATOLOGIA

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença clonal adquirida de células-tronco hematopoiéticas (PARKER *et al.*, 2005), causada por uma mutação em um gene localizado no cromossomo X (PARKER, 2002). Esse gene, denominado fosfatidilinositol glicana classe A (*PIG-A*), é responsável pela síntese de glicosil fosfatidilinositol (GPI), uma proteína de membrana que tem como função ancorar uma série de outras proteínas à membrana celular (Figura 1) (DEVALET *et al.*, 2015).

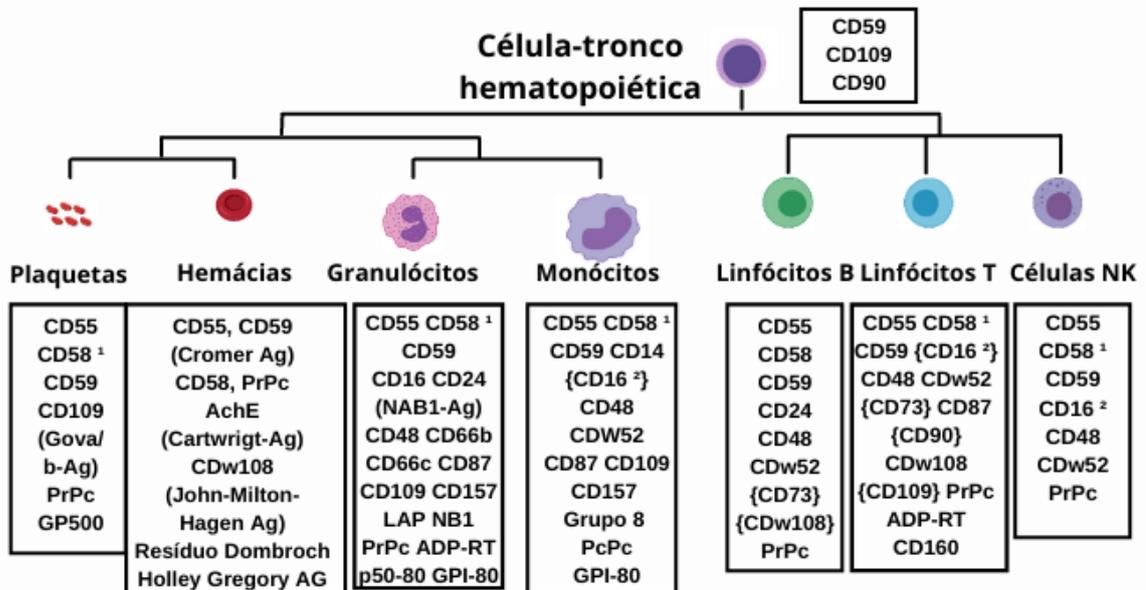
Figura 1 - Esquema da estrutura da âncora glicosil fosfatidilinositol (GPI).



GPI é responsável por manter aderida à membrana plasmática uma série de proteínas com funções específicas. Fonte: ARRUDA *et al.*, 2010.

Com a mutação do gene *PIG-A*, há uma deficiência da âncora GPI e, conseqüentemente, um impedimento das proteínas em se ancorar à membrana celular (Figura 2).

Figura 2 - Proteínas ancoradas pela proteína glicosil fosfatidilinositol (GPI).



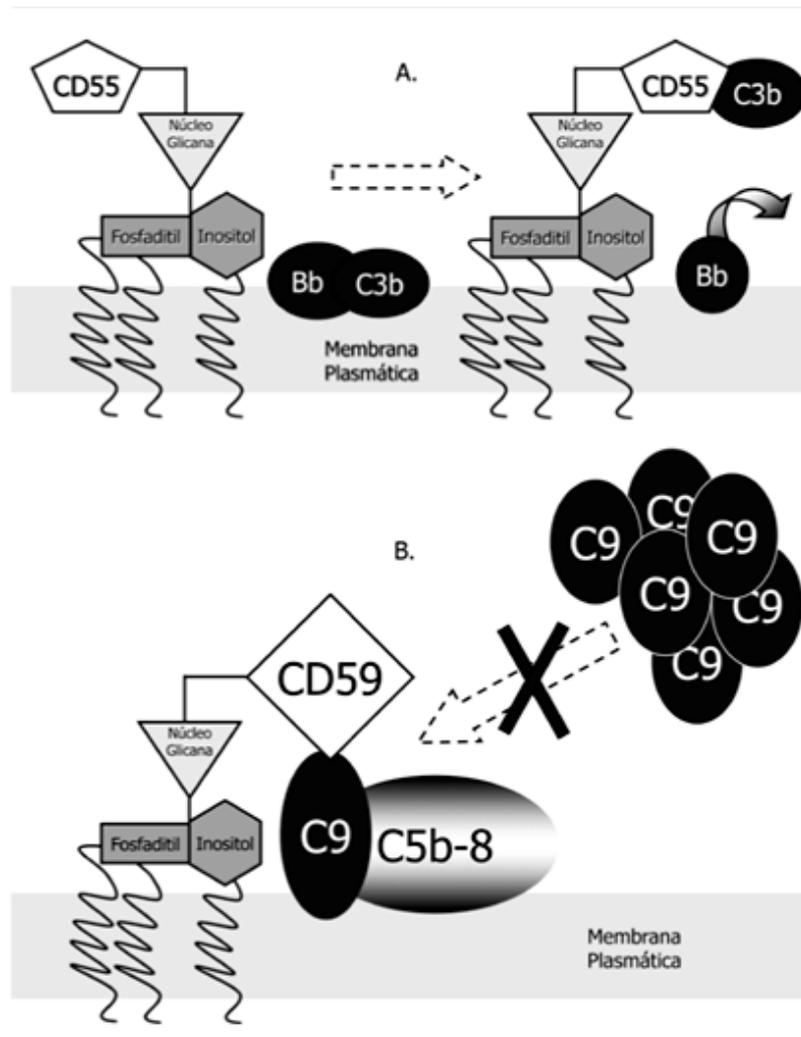
PrPc, proteína príon; AChE, acetilcolinesterase; LAP, fosfatase alcalina de leucócitos; ADP-RT, mono ADP-ribosil transferase; NK, natural killer. ¹Tanto a forma ancorada pelo GPI como a forma transmembrana; ²Isoforma ancorada pela transmembrana; (), Antígenos de grupo sanguíneo; { }, Expressão mediante ativação ou apenas em um subgrupo de células. Adaptado de: BLESSER; HIKEN, 2008.

Dentre as proteínas que são ancoradas pela GPI, pode-se citar a CD55 e a CD59. Essas proteínas são constitutivamente expressas na membrana das hemácias e são responsáveis por inibir o sistema complemento e, conseqüentemente, impedir que este destrua os eritrócitos e cause hemólise, a principal manifestação clínica da HPN (BRODSKY, 2014).

Como pode ser observado na Figura 3, a proteína CD55 se liga ao complexo C3bBb e gera a dissociação do Bb do C3b. A CD59 apresenta um mecanismo de ação diferente, ela se liga ao C5b-C9 e impede que outras proteínas C9 se conjuguem ao complexo, inibindo, desse modo, a formação do complexo de ataque à membrana e,

conseqüentemente, a lise celular. Considera-se que as deficiências da expressão membranar da CD55 e da CD59 são as principais responsáveis pelo aparecimento das manifestações clínicas da HPN (BRODSKY, 2014).

Figura 3 - Relação das proteínas CD55 e CD59 com o sistema complemento.



Painel A - Interação da CD55 com o complexo C3bBb: Ao se ligar ao complexo C3b, CD55 gera dissociação do Bb, prevenindo a lise da membrana do eritrócito. Painel B - Interação da CD59 com o complexo C5b-C9: Ao se ligar com o C5b-C9, CD59 impede que outras proteínas C9 se conjuguem ao complexo, inibindo a formação do complexo de ataque à membrana e, conseqüentemente, a lise celular. Fonte: ARRUDA *et al.*, 2010.

Clones HPN são definidos como uma população celular com deficiência de GPI (SCHREZENMEIER *et al.*, 2020). O sangue periférico de um portador de clones HPN pode possuir células normais e anormais, e as manifestações clínicas dessa

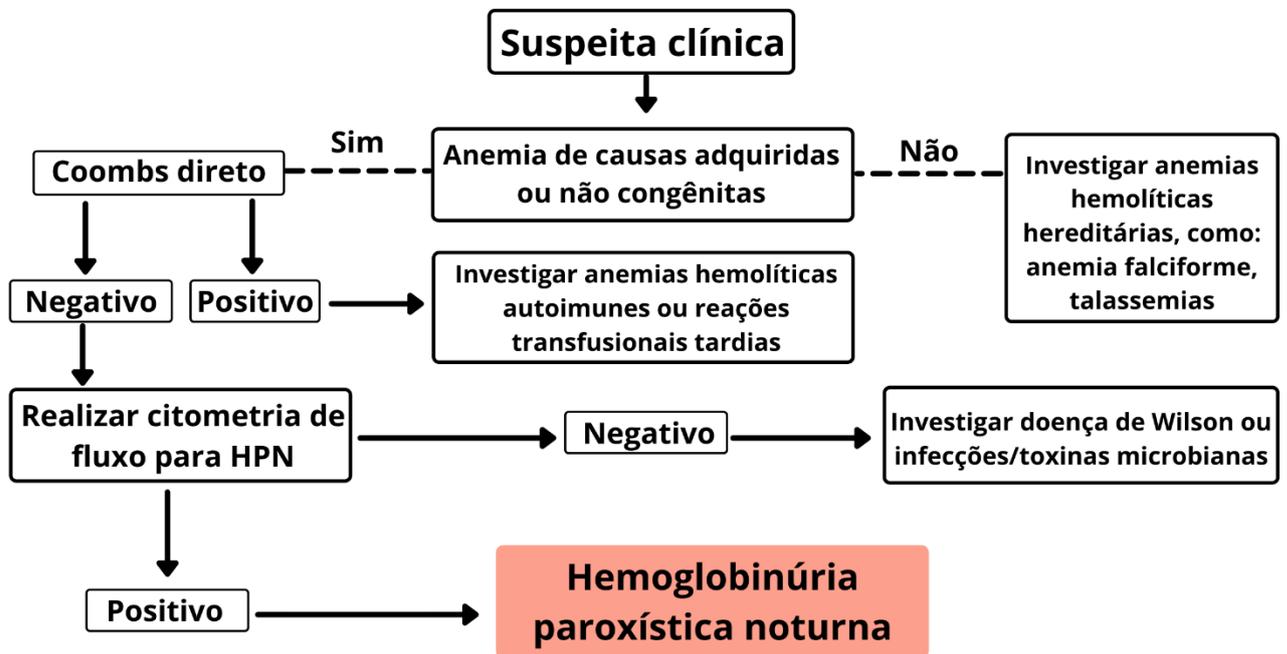
doença estão relacionadas ao tamanho da população celular com deficiência da âncora GPI e ao fenótipo dos eritrócitos. A existência dessa variabilidade de tamanho do clone faz com que haja indivíduos que não tenham sintomas e outros que apresentam graves sintomas. Em relação ao fenótipo dos eritrócitos, ele também pode variar entre os indivíduos, sendo que existem três tipos de eritrócitos (tipos I, II e III). Os eritrócitos do tipo III apresentam uma deficiência completa de GPI, os do tipo II tem geralmente 10% da expressão normal de GPI e os do tipo I possuem expressão normal da proteína. Por isso, os eritrócitos do tipo II são mais resistentes à hemólise, assim, indivíduos com mais células do tipo II tendem a ter um curso clínico benigno (PARKER, 2011).

Como mencionado, a hemólise intravascular que ocorre pela falta de GPI é a principal responsável pelas manifestações clínicas da doença. O aumento da concentração plasmática de hemoglobina livre é responsável por causar a depleção de óxido nítrico. Esta depleção, por sua vez, origina diversos sintomas nos pacientes com clone HPN como disfagia, dor abdominal e disfunção erétil (DEVALET *et al.*, 2015).

3.2 DIAGNÓSTICO

Para realizar o diagnóstico da HPN, é necessário estar atento aos sinais e sintomas clínicos da doença, juntamente com os dados laboratoriais. De acordo com Patriquin *et al.* (2019), devem ser rastreados para HPN pacientes que apresentam trombose, insuficiência medular, hemoglobinúria e citopenias inexplicadas. No entanto, devido à baixa incidência da HPN, as causas mais comuns de anemias hemolíticas e tromboembolismos devem ser investigadas primeiramente, ou seja, o processo de diagnóstico da HPN dá-se por um processo de exclusão de outras doenças mais comuns (Figura 4) (BRASIL, 2019).

Figura 4 - Fluxograma de diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).



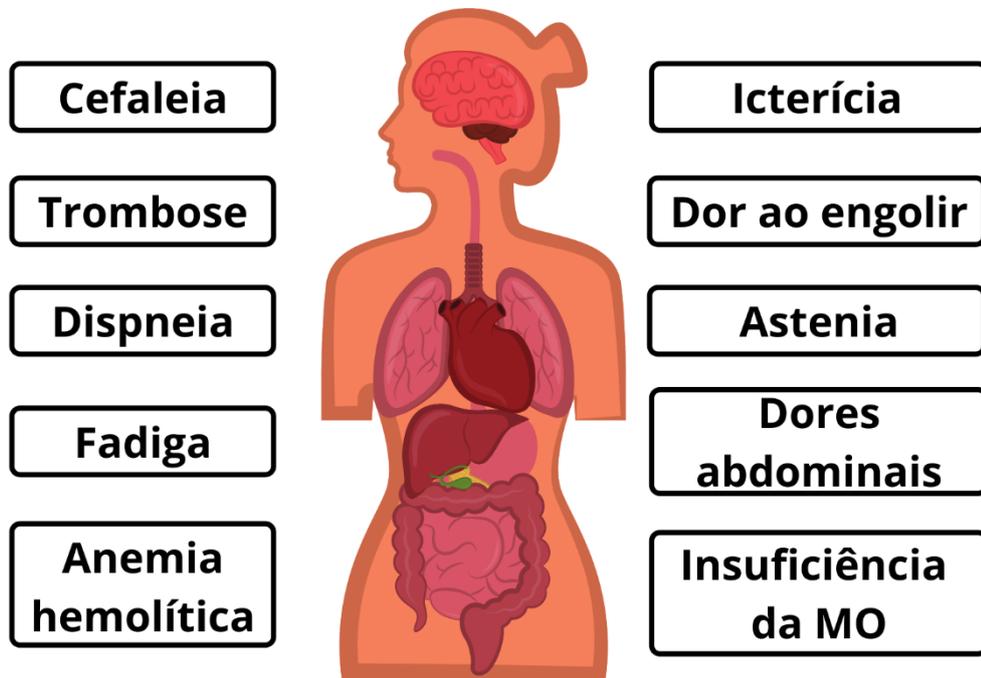
Adaptado de: Brasil, 2019.

Além dos aspectos clínicos, a avaliação inicial de indivíduos com suspeita de HPN inclui exames laboratoriais como hemograma, lactato desidrogenase (LDH), teste direto de antiglobulina (TAD ou coombs direto) e contagem de reticulócitos (DEZERN, BOROWITZ, 2018). Um dos exames mais importante para o diagnóstico da HPN é a imunofenotipagem por citometria de fluxo. (DEVALET *et al.*, 2015).

3.2.1 Aspectos clínicos

As principais manifestações clínicas da HPN incluem anemia hemolítica, insuficiência da medula óssea e trombose, principalmente em locais incomuns, como veias esplâncnicas. Alguns sintomas comuns são: cefaleia, dores abdominais e no peito, dispneia, fadiga, astenia, dor ao engolir, impotência sexual masculina e icterícia. (Figura 5). Ressalta-se que, inicialmente, nem todos os sintomas podem estar presentes e que o surgimento ou gravidade deles depende do tamanho do clone HPN (PARKER, 2016).

Figura 5 - Manifestações clínicas na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).



MO – Medula óssea. Fonte: A autora.

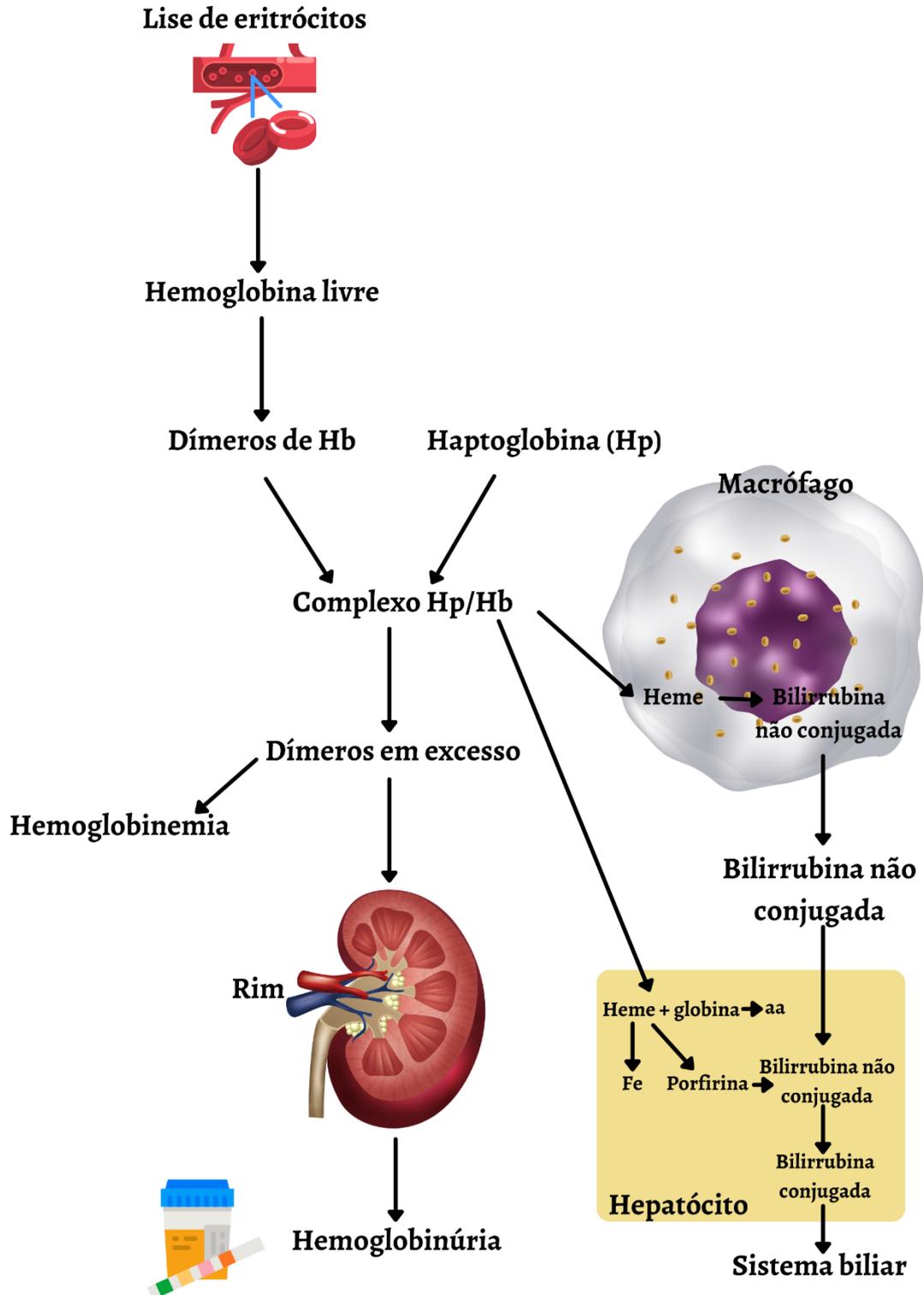
3.2.2 Aspectos laboratoriais

No diagnóstico da HPN, os exames laboratoriais são necessários, tanto na avaliação inicial para a exclusão de outras causas de trombose, insuficiência medular e hemoglobinúria, quanto para o diagnóstico confirmatório da doença.

Os exames comumente solicitados são o hemograma, contagem de reticulócitos, dosagem de bilirrubina e frações, de haptoglobina e de ferro, atividade de LDH, TAD e parcial de urina. Em pacientes com HPN, espera-se que os resultados do hemograma evidenciem uma anemia, em que observa-se uma diminuição da concentração de hemoglobina. No hemograma também podem estar presentes uma leucopenia e trombocitopenia. Em relação aos demais exames, a LDH frequentemente está elevada, bem como a bilirrubina indireta e a contagem de reticulócitos. A haptoglobina geralmente encontra-se diminuída. A hemoglobinúria e hemossiderinúria podem estar presentes. O TAD apresenta-se negativo e a deficiência de ferro é comum (BRODSKY, 2014; PARKER, 2016).

Os eritrócitos são células ricas em LDH e sua lise causará elevação da concentração sérica da enzima. Adicionalmente, com a lise dos eritrócitos, a hemoglobina livre liga-se à haptoglobina. O complexo hemoglobina-haptoglobina será retirado da circulação pelos macrófagos e hepatócitos que transformarão a fração heme da hemoglobina em bilirrubina conjugada e não conjugada, causando a diminuição da concentração sérica de haptoglobina e aumento da bilirrubina total e frações. Nem toda a hemoglobina liberada pela hemólise intravascular se complexa com a haptoglobina, o excesso de hemoglobina é filtrado pelos rins e excretado na urina de forma inalterada, causando a hemoglobinúria. A medula óssea tenta compensar a destruição exacerbada das hemácias acelerando a eritropoiese e originando uma reticulocitose em sangue periférico. No entanto, muitas vezes a destruição é mais rápida que a reposição dos eritrócitos, o que causa a diminuição da concentração de hemoglobina no hemograma. Por fim, a eritropoiese acelerada associada à perda de hemoglobina pela urina pode causar um caso de deficiência de ferro (Figura 6) (COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013). Apesar de a explicação para alguns achados laboratoriais em portadores de HPN já estarem bem definidos, isso não ocorre para outros. O motivo da leucopenia e plaquetopenia na HPN não estão completamente compreendidos, mas sugere-se que elas estejam relacionadas com uma disfunção das células-tronco hematopoiéticas (PARKER, 2016).

Figura 6 – Catabolismo da hemoglobina após hemólise intravascular.



Hb – Hemoglobina; Hp – Haptoglobina Fe – Ferro. Fonte: A autora.

Apesar dos exames laboratoriais encontrarem-se frequentemente alterados na HPN, eles não são específicos e resultados laboratoriais semelhantes podem ser encontrados em outras condições. Por isso, quando existe uma forte suspeita de HPN com base na clínica e nos resultados laboratoriais, deve-se fazer o diagnóstico confirmatório utilizando-se metodologias de alta complexidade e elevado custo (DEVOS *et al.*, 2018).

Inicialmente, o diagnóstico da HPN era realizado por meio de dois testes, o da hemolisina ácida (teste de HAM) e o da sacarose, porém, atualmente, esses testes estão em desuso por serem menos sensíveis e não quantificarem de forma segura o tamanho de cada clone HPN, uma vez que são testes realizados apenas em eritrócitos (BRODSKY, 2014; DEVALET *et al.*, 2015; PARKER *et al.*, 2005).

Atualmente, um dos exames mais importantes para o diagnóstico da HPN é a pesquisa dos clones HPN em sangue periférico por citometria de fluxo (DEVALET *et al.*, 2015). Por meio dessa metodologia, é possível detectar e quantificar os clones deficientes de GPI utilizando-se anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes (fluorocromos). Dessa forma, o diagnóstico de HPN é dado quando é confirmada a presença de células deficientes de GPI no sangue periférico do indivíduo. Uma característica importante do processo de diagnóstico da HPN é que, apesar da GPI ancorar proteínas na membrana de todas as células sanguíneas, a investigação da HPN inicia-se com a avaliação de polimorfonucleares (PMN) e de monócitos. A identificação de eritrócitos deficientes de GPI não é empregada para diagnóstico, pois os eritrócitos são constantemente destruídos pela lise mediada pelo sistema complemento e, por isso, sua quantificação não é confiável. Além disso, as transfusões sanguíneas, que são frequentemente realizadas em portadores de HPN para tratar as citopenias, também podem afetar a estimativa do clone se apenas eritrócitos forem analisados (PARKER, 2016). Devido a isso, para que não ocorram falsos negativos, é importante que a imunofenotipagem para HPN seja realizada em pelo menos duas linhagens de células (DEVALET *et al.*, 2015) e que, apenas quando se evidencia a presença de clones de HPN de PMN ou de monócitos, complementa-se o estudo imunofenotípico nas hemácias (ORFAO, 2010).

A amostra de preferência para a imunofenotipagem para HPN é a de sangue periférico e o anticoagulante mais utilizado é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A análise da medula óssea deve ser utilizada apenas no âmbito da pesquisa,

pois a interpretação dos seus resultados é mais difícil. Os primeiros marcadores utilizados para detecção de clones HPN foram o CD55 e CD59. Porém, o CD55 separa menos as células positivas e negativas para HPN e, por isso, atualmente não é considerado o melhor marcador para ser empregado. O CD59 continua sendo utilizado na rotina laboratorial e auxilia na detecção dos clones HPN em hemácias, inclusive esse marcador ajuda na separação dos eritrócitos tipo I, II e III (BOROWITZ *et al.*, 2010).

Atualmente, existe uma grande variedade de marcadores ligados à GPI descritos para granulócitos, dentre eles, pode-se citar CD16, CD24 e CD66b. Já para a pesquisa em monócitos pode-se citar o CD14. Utilizado em conjunto a esses, um marcador considerado muito útil para detectar clones de HPN em leucócitos é a aerolisina fluorescente (FLAER), pois ele se liga de forma específica à GPI. Portanto, nos clones HPN de granulócitos e monócitos, que apresentem deficiência da âncora GPI, o FLAER estará negativo (BOROWITZ *et al.*, 2010).

No Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH, o exame de imunofenotipagem para HPN é realizado no setor de marcadores celulares e, segundo o que foi estabelecido no setor, são utilizados os seguintes marcadores para pesquisa de clones HPN em leucócitos: FLAER, CD157, CD33, CD16, CD24, CD15, CD14 e CD45. Para a pesquisa de clones em hemácias, são utilizados: CD235a, CD59, CD61 e CD45.

Além de identificar a presença dos clones HPN por citometria de fluxo, é imprescindível que no momento do diagnóstico realize-se a determinação do tamanho do clone pela quantificação de polimorfonucleares (PMN) e de monócitos deficientes de GPI. A quantificação dos clones é útil para classificar e determinar a gravidade e o prognóstico da doença. Adicionalmente, a quantificação também auxilia no acompanhamento do paciente que, caso haja um aumento do tamanho do clone em exames subsequentes, pode sugerir um agravamento da doença com piora clínica (DEVOS *et al.*, 2018).

3.3 CLASSIFICAÇÃO

A classificação dos portadores de HPN é útil para definir a conduta terapêutica (BRASIL, 2019). A doença pode ser dividida em três classes: HPN clássica, HPN associada a outros distúrbios primários da medula óssea e HPN subclínica. A classificação se baseia em aspectos clínicos e em resultados laboratoriais dos pacientes (Quadro 1) (PARKER *et al.*, 2005).

Quadro 1 - Classificação da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).

HPN clássica	Os pacientes apresentam evidências clínicas e laboratoriais de hemólise intravascular, reticulocitose, lactato desidrogenase sérica e bilirrubina indireta aumentadas, e haptoglobina sérica diminuída. Nestes indivíduos, não há evidência de anormalidades na medula óssea.
HPN associada a outros distúrbios primários da medula óssea	Os pacientes também apresentam evidências clínicas e laboratoriais de hemólise, mas, dessa vez, associadas há algum distúrbio medular já definido como anemia aplásica ou síndrome mielodisplásica.
HPN subclínica	Não há evidências clínicas ou laboratoriais de hemólise ou trombose, mas há indícios de insuficiência medular.

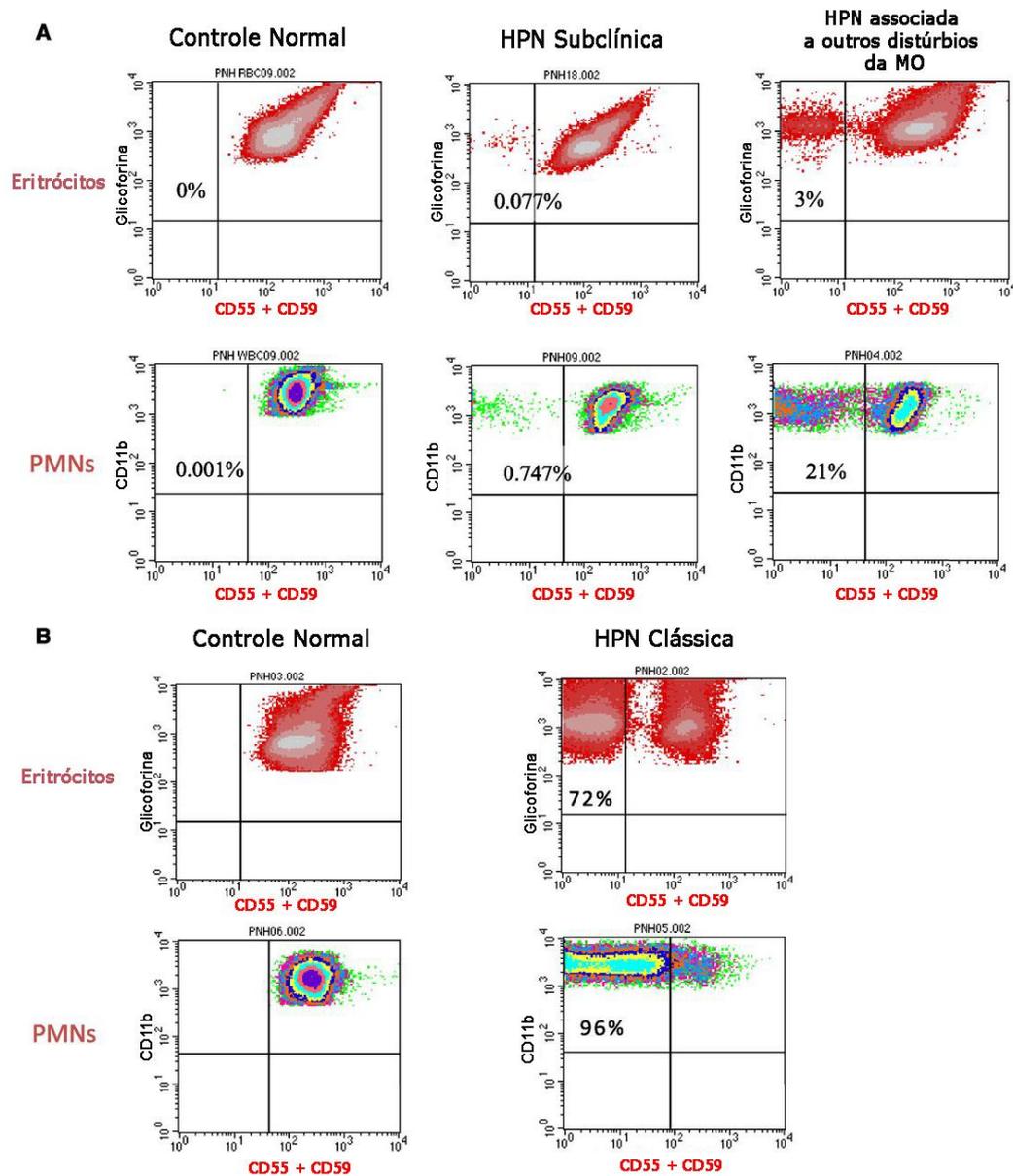
Fonte: PARKER *et al.*, 2005

Geralmente, a classificação da doença costuma correlacionar-se com o tamanho do clone HPN. Em pacientes com HPN clássica, é detectada uma grande população de clone deficiente de GPI; na HPN associada a outros distúrbios primários da medula óssea, a porcentagem do clone deficiente de GPI é variável, mas normalmente pequena (<50%); e, na HPN subclínica, observa-se um clone deficiente de GPI pequeno, normalmente menor que 0,1% (Figura 7) (PARKER, 2016).

Como a classificação dos portadores de HPN é dependente dos parâmetros clínicos e laboratoriais e, como esses podem variar com a evolução da doença e aumento do clone HPN, é importante que o paciente seja acompanhado e

constantemente avaliado, pois a classificação pode alterar com o tempo e, conseqüentemente, a conduta terapêutica (BRASIL, 2019).

Figura 7 – Imunofenotipagem para hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) por citometria de fluxo.



Painel A - Gráficos de citometria de fluxo demonstrando um controle normal, HPN subclínica e HPN associada a outros distúrbios primários da medula óssea, em eritrócitos e polimorfonucleares. Painel B - Gráficos de citometria de fluxo demonstrando um controle normal e a HPN do tipo clássica, em eritrócitos e polimorfonucleares. Fonte: PARKER, 2016.

3.4 TRATAMENTO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é a única terapia capaz de curar a HPN, porém esta forma de tratamento está relacionada com significativas taxas de morbimortalidade (BRODSKY, 2009). Com isso, na maioria dos casos, o tratamento da HPN é realizado com base na sintomatologia do paciente, com abordagens farmacológicas e não farmacológicas. O objetivo do tratamento é causar uma redução nos sintomas ocasionados pela doença, assim como prevenir possíveis complicações decorrentes da mesma (BRASIL, 2019).

Transfusões de concentrados de hemácias podem ser realizadas nos pacientes, pois aumentam a concentração de hemoglobina e podem diminuir a hemólise devido à supressão da eritropoiese (PARKER *et al.*, 2005). Porém, deve-se sempre considerar o risco de complicações transfusionais, por isso, o recomendado é que as transfusões sejam restringidas ao mínimo necessário para o paciente (ARRUDA *et al.*, 2010).

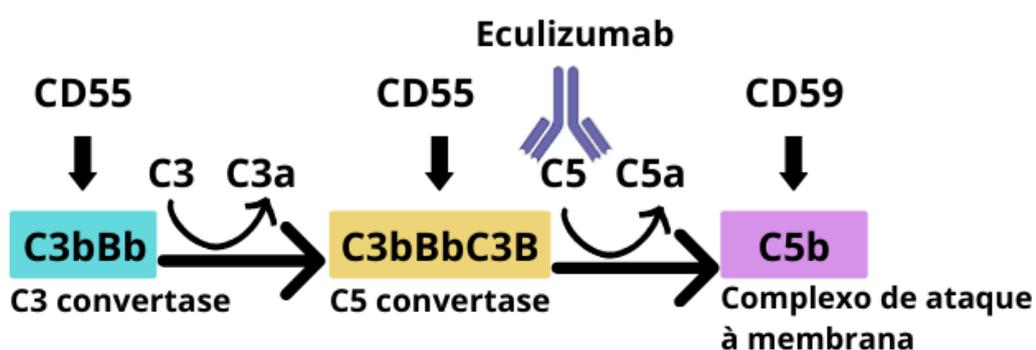
A hemoglobinúria faz com que os pacientes percam grandes quantidades de ferro, causando uma ferropenia que não pode ser compensada apenas com a dieta. Devido a isso, para muitos indivíduos é necessário a suplementação com ferro (ROSSE, 1982). Recomenda-se a suplementação com sais ferrosos, por via oral, sendo que a suplementação por via intravenosa deve ser reservada como tratamento de segunda linha para evitar rápidos aumentos na eritropoiese e, conseqüentemente, agravamento da hemólise (ORFAO, 2010). Além da suplementação de ferro, a suplementação de folato também pode ser considerada, pois há um aumento na sua utilização devido a eritropoiese aumentada em consequência da hemólise (PARKER *et al.*, 2005).

A terapia profilática com anticoagulantes em pacientes com risco de complicações tromboembólicas pode ser considerada para os portadores de HPN, entretanto, existem algumas restrições, por exemplo, paciente apresentando trombocitopenia significativa, portanto, a utilização dessa terapia deve ser avaliada com cautela, levando em consideração as condições clínicas do paciente (HALL; RICHARDS; HILLMEN, 2003).

O eculizumab é um anticorpo monoclonal cuja ação inibe a ativação dos componentes terminais do sistema complemento, mais especificamente a C5 (Figura

6) (HILLMEN *et al.*, 2004). Alguns estudos demonstraram a eficácia do eculizumab no tratamento de pacientes com HPN (HILL *et al.*, 2005; HILLMEN *et al.*, 2004, 2006, 2007). Os resultados do estudo conduzido por Hillmen *et al.* (2006) demonstraram que, com o uso do eculizumab, houve uma redução da hemólise intravascular, redução ou eliminação da necessidade de transfusões sanguíneas, melhora na anemia e fadiga apresentada por esses pacientes e, conseqüentemente, uma melhora na qualidade de vida dos mesmos.

Figura 8 - Esquema representando o mecanismo de ação do eculizumab.



O eculizumab é um anticorpo monoclonal anti-C5 humanizado que impede a ativação de C5 pela C5 convertase e, conseqüentemente, o complexo de ataque à membrana não pode se formar (o C5a não é gerado), inibindo, dessa forma, a hemólise intravascular da hemoglobinúria paroxística noturna.

Adaptado de: PARKER, 2016.

No Brasil, o eculizumab foi incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 2018 para tratamento de pacientes portadores da HPN com alta atividade da doença (BRASIL, 2018), ou seja, o medicamento é indicado para pacientes com LDH sérica de 1,5 vezes ou mais o limite superior de referência e com tamanho do clone HPN maior do que 10%, além disso, eles devem apresentar pelo menos um dos critérios elencados no Quadro 2 (BRASIL, 2019).

Quadro 2 - Critérios para a definição de alta atividade da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).

Critério	Forma de comprovação
Evento trombótico	Comprovado por imagem, com necessidade de terapia anticoagulante
Anemia crônica	Duas dosagens de HB \leq 7 mg/dL ou sintomas de anemia junto com duas dosagens de Hb \leq 10 mg/dL
Hipertensão arterial pulmonar (HAP)	Demonstrada em ecocardiograma com PSAP $>$ 35
História de insuficiência renal	Evidenciada por TFG \leq 60 mL/min/1,73 m ²
Gestação em curso	Beta-HCG $>$ 6 mUI/mL, com história prévia de complicação gestacional

Hb – hemoglobina; PSAP - pressão sistólica em artéria pulmonar; TFG – taxa de filtração glomerular; HCG - gonadotrofina coriônica humana. Fonte: Brasil, 2019.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal Santa Catarina (UFSC) (ANEXO A), de acordo com o preconizado pela Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº466 de 2012. Os dados obtidos foram utilizados apenas para a realização deste trabalho e seu sigilo foi preservado.

Conforme previsto pelo OFÍCIO CIRCULAR Nº 2/2021/CONEP/SECNS/MS, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi apresentado aos pacientes de forma não presencial. Para a obtenção dos telefones de contato dos pacientes, foi solicitado a um funcionário da Unidade de laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH não vinculado ao projeto para levantar a lista de nomes e telefones dos possíveis participantes da pesquisa. Os contatos foram realizados via aplicativo de mensagens Whatsapp e atenderam às normas estipuladas no referido ofício. Todos os contatos foram realizados individualmente e a única informação coletada em ambiente virtual foi a resposta do participante à pergunta sobre consentimento, assegurando o sigilo e confidencialidade das informações dos pacientes. O indivíduo recebeu o convite para participar da pesquisa em forma de texto e o TCLE assinado pelos pesquisadores foi enviado em arquivo PDF para o paciente. Após o indivíduo ler e tirar quaisquer dúvidas, foi perguntado se ele aceitava ou não participar da pesquisa. As trocas de mensagem e gravações contendo a anuência ou não dos participantes foram salvas em computador e apagadas do dispositivo de celular.

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa os resultados laboratoriais dos indivíduos que aceitaram participar do estudo por meio do TCLE, maiores de 18 anos e que realizaram o exame de imunofenotipagem para HPN no setor de marcadores celulares da ULAC do HU/UFSC/EBSERH no período de janeiro de 2014 a julho de 2021.

4.2 COLETA DE DADOS

Este trabalho é um estudo quantitativo, transversal e retrospectivo em que foram utilizados os dados do sistema da ULAC e do registro interno do setor de marcadores celulares do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH no período de janeiro de 2014 a julho de 2021.

A obtenção dos resultados laboratoriais foi realizada utilizando-se o número de prontuário dos pacientes. Foram levantados dados dos setores de hematologia, bioquímica, uroanálise e marcadores celulares. Destes setores, foram coletados os dados dos seguintes exames: imunofenotipagem para hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), hemograma, tempo e atividade da protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), fibrinogênio, velocidade de hemossedimentação (VHS), reticulócitos, bilirrubina total e frações, ferro sérico, índice de saturação da transferrina pelo ferro, ferritina e parcial de urina, além de idade e sexo do paciente.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confecção do banco de dados e a análise estatística foi realizada com o auxílio do software MedCalc®.

As variáveis quantitativas foram expressas em mediana, menor e maior valor. Para as variáveis qualitativas, foram estimadas as frequências absolutas.

As variáveis numéricas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste de Mann-Whitney U. As frequências obtidas nas variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos pelo teste de qui-quadrado.

A correlação entre os parâmetros com o tamanho dos clones HPN foi realizada por meio do coeficiente de correlação de Spearman (ρ). O tamanho da correlação e sua interpretação encontram-se descritos no Quadro 3. Foi considerado significativo um $P \leq 0,05$.

Quadro 3 – Interpretação do coeficiente de correlação.

Correlação	Interpretação*
De 0,9 a 1,0	Correlação muito forte
De 0,7 a 0,9	Correlação forte
De 0,5 a 0,7	Correlação moderada
De 0,3 a 0,5	Correlação fraca
De 0,0 a 0,3	Correlação insignificante

*Sinais positivos ou negativos indicam o sentido da correlação, ou seja, diretamente ou inversamente proporcional, respectivamente. Fonte: Mukaka, 2012.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DOS RESULTADOS LABORATORIAIS DOS PRINCIPAIS EXAMES SOLICITADOS JUNTO À IMUNOFENOTIPAGEM PARA HPN

De sete indivíduos contactados, quatro aceitaram participar do estudo. A mediana de idade foi de 39,5 anos (21 - 65), todos do sexo masculino. Entre os anos de 2014 e 2021, juntos, os quatro indivíduos realizaram ao todo 10 exames de imunofenotipagem para HPN. Todas as imunofenotipagens realizadas apresentaram clones HPN em neutrófilos e monócitos e nove também tinham clones HPN em hemácias. Na Tabela 1, estão apresentadas as medianas, menor e maior valor de tamanho dos clones de HPN. Ressalta-se que o tamanho do clone é colocado no laudo em porcentagem considerando a população celular como 100%. Por exemplo, se 82% dos neutrófilos não expressaram FLAER, CD16 e CD24 então 18% expressaram de forma normal esses marcadores.

Tabela 1 – Tamanho dos clones de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).

Clones HPN	Mediana	Menor valor	Maior valor	N
Hemácias (%)	1,000	0,005	11,000	9
Neutrófilos (%)	14,000	0,200	82,000	10
Monócitos (%)	42,000	0,700	81,000	10

Fonte: A autora.

Como pode ser observado na Tabela 1, o tamanho dos clones HPN apresentou grande variação, desde um clone pequeno, em que 0,2% do total de neutrófilos não expressaram CD16, CD24, CD157 e FLAER, até um clone grande, em que 82% do total de neutrófilos não expressaram FLAER, CD16 e CD24.

Na época da realização dos exames de imunofenotipagem para HPN, os participantes também realizaram exames laboratoriais nos seguintes setores: bioquímica, hematologia e uroanálise.

No setor de bioquímica, os exames realizados com maior frequência foram as dosagens de bilirrubina total e frações. Dois participantes também realizaram dosagem de ferro e ferritina sérica e determinação do índice de saturação da

transferrina, mas esses resultados não foram apresentados no presente trabalho devido ao baixo tamanho da amostra e pouca representatividade.

Como mencionado, a hemólise intravascular é uma complicação frequente da existência de hemácias deficientes de GPI. Por isso, é importante realizar exames que avaliam a presença de hemólise intravascular no acompanhamento dos portadores de HPN. Nesse contexto, os exames laboratoriais que auxiliam a evidenciar a hemólise intravascular são as dosagens de LDH, bilirrubina indireta e haptoglobina (PARKER, 2016). Dessa forma, a frequente solicitação da dosagem de bilirrubina total e frações se justifica, mas seria interessante que a dosagem de LDH também fosse solicitada com a mesma frequência, já que, na HPN do tipo clássica, a LDH está sempre elevada de forma acentuada (PARKER, 2016). Em um estudo realizado por Schrezenmeier *et al.* (2014) foi observado que um valor de LDH maior ou igual a 1,5 vezes o limite superior de referência foi diretamente proporcional ao tamanho do clone HPN, além disso, a porcentagem de pacientes que relataram sintomas de HPN foi maior nos que tinham a LDH acima desse ponto de corte. Dessa forma, os autores concluíram que pacientes com LDH elevada possuem maior risco de apresentar complicações na HPN (SCHREZENMEIER *et al.*, 2014). Ressalta-se, também, que um dos critérios de elegibilidade para o tratamento com eculizumab é a alta atividade da doença, que, por sua vez, tem como critério uma concentração de LDH maior ou igual a 1,5 vezes o limite superior de referência e o tamanho do clone maior do que 10% (BRASIL, 2019).

No presente estudo, o exame do setor de bioquímica mais solicitado foi a dosagem da bilirrubina. Pode-se observar na Tabela 2 que as medianas de bilirrubina total e suas frações encontraram-se dentro dos valores de referência, o que não era esperado, uma vez que, como mencionado, portadores de HPN costumam apresentar bilirrubina indireta com valores acima do de referência. Em alguns casos menos graves de HPN, pode não haver evidência de hemólise.

Tabela 2 - Resultados laboratoriais dos exames realizados no setor de bioquímica.

Exame	Mediana	Menor valor	Maior valor	VR
Bilirrubina total (mg/dL)	0,950	0,300	1,500	0,200 - 1,00
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,150	0,000	0,300	0,00 - 0,200
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,750	0,200	1,200	0,8

VR – valores de referência. N = 10. Fonte: A autora.

Quando os resultados de bilirrubina indireta foram analisados individualmente, quatro, dos dez exames, apresentaram dosagens acima do valor de referência. Na Tabela 3, pode-se observar o resultado da dosagem de bilirrubina indireta e o tamanho de cada clone HPN na mesma época do exame. É possível observar que esses resultados acima do valor de referência eram de indivíduos com clones maiores, o que pode estar ligado a uma forma mais ativa da doença, evidenciada por hemólise.

Tabela 3 - Resultados laboratoriais dos exames de bilirrubina indireta e imunofenotipagem para hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).

Exame	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Resultado 4
BI (mg/dL)	1,2	1,0	1,2	1,1
IMF - hemácias (%)	-	7	7	9
IMF - neutrófilos (%)	76	80	82	18
IMF – monócitos (%)	78	80	81	55

BI – Bilirrubina indireta; IMF – imunofenotipagem. - Clone HPN em hemácias não identificado.

Fonte: A autora

No setor de hematologia, os principais exames realizados foram o hemograma e a contagem de reticulócitos. A solicitação desses dois exames é de extrema importância na HPN, pois, por meio deles, é possível avaliar o impacto que a doença causa na produção dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas (PARKER, 2016).

Três indivíduos também realizaram os exames de TP e TTPa e um realizou dosagem de fibrinogênio. Todos esses exames apresentaram resultados dentro dos valores de referência. Os ensaios que avaliam a coagulação, como o TP e TTPa, são sensíveis a diminuições na concentração dos fatores da coagulação, mas não são

capazes de indicar a existência de um aumento da atividade dos fatores pró-coagulantes ou avaliar alterações na função dos anticoagulantes naturais. Dessa forma, apesar da trombose ser uma das principais e mais letais manifestações clínicas da HPN, os exames de TP e TTPa não costumam encontrarem-se alterados nos portadores de HPN a não ser que um evento trombótico tenha de fato ocorrido (LOURENÇO; PASQUINI, OLIVEIRA, 2013).

Na Tabela 4, encontram-se os resultados do hemograma e da contagem de reticulócitos. Alguns hemogramas também reportaram alterações eritrocitárias: anisocitose (N = 3), microcitose (N = 4), macrocitose (N = 3), policromasia (N = 8), pecilocitose (N = 10), ovalócitos (N = 9), hemácias em lágrima (N = 9). Em três hemogramas foi relatada a presença de granulação tóxica nos neutrófilos.

Tabela 4 – Resultados laboratoriais de exames realizados no setor de hematologia.

Exame	Mediana	Menor valor	Maior valor	VR
He (milhão/mm ³)	2,4	1,31	4,90	4,30 - 5,70
Hb (g/dL)	6,7	4,2	16,0	13,2 - 18,0
Ht (%)	19,2	11,7	46,9	39,0 - 51,0
VCM (fL)	95,4	75,9	109,2	80 - 100
HCM (pg)	32,1	26,9	38,2	27,3 - 32,6
CHCM (g/dL)	34,4	32,8	36,2	31,6 - 34,9
RDW	14,1	11,1	20,0	9,9 - 15,5
Leucócitos (p/mm ³)	2.830	600	4.450	3.800 - 11.000
Segmentados (%)	27,5	5,0	69,2	45,5 - 74,0
(p/mm ³)	490,8	49,5	3.079,4	1.700 - 7.500
Bastonetes (%)	0,5	0,0	10,0	6 - 5
(p/mm ³)	4,9	0,0	60,0	
Linfócitos (%)	49,8	22,7	87,7	22,3 - 49,9
(p/mm ³)	935,0	300,0	2490,7	1.000 - 3.500
Monócitos (%)	10,7	2,1	19,7	0,7 - 7,5
(p/mm ³)	285,2	50,1	458,4	200 - 920
Eosinófilos (%)	0,5	0,0	1,1	0,5 - 4,0
(p/mm ³)	10,9	0,0	40,1	20 - 670
Basófilos (%)	0,0	0,0	0,3	0 - 2
(p/mm ³)	0,0	0,0	9,5	0 - 130
Plaquetas x 10 ³ (p/mm ³)	29	4	112	150 - 440
VPM (fL)	10,0	8,3	10,4	6,9 - 11,0
Reticulócitos (%)	3,4	1,0	6,9	0,8 - 2,5
(p/mm ³)	64.770	2.460	256.680	18.000 - 158.000

He – hemácias; Hb – hemoglobina; Ht – hematócrito; VCM - volume corpuscular médio; HCM - hemoglobina corpuscular média; CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média; VPM - volume plaquetário médio; VR – valores de referência. N = 10 com exceção de VPM em que N = 8.

Fonte: A autora.

Pode-se observar que as medianas de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e segmentados encontravam-se abaixo dos valores de referência, o que era o esperado, devido à hemólise e hematopoiese ineficaz presente na HPN.

Como citado anteriormente, a contagem de reticulócitos é importante na avaliação do indivíduo com HPN, pois, por meio dela, é possível observar a capacidade de resposta da medula óssea a um processo de anemia. Contudo, apesar de a reticulocitose estar presente em portadores de HPN, ela normalmente não é proporcional ao grau de anemia, demonstrando uma outra característica da doença, que é uma hematopoiese ineficaz (PARKER, 2016).

No setor de uroanálise, foram realizados apenas dois exames de parcial de urina. Devido ao pequeno número de exames, os resultados não foram apresentados no presente trabalho por não serem considerados representativos. Entretanto, evidenciou-se que apenas em uma das amostras foi reportada a presença de hemoglobinúria, com uma cruz de hemoglobina, enquanto a contagem de hemácias permaneceu dentro dos valores de referência. Apesar do nome da doença se referir a hemoglobinúria, essa manifestação não é frequente nos indivíduos, de acordo com Parker (2016) a hemoglobinúria é um sintoma que aparece em aproximadamente 25% dos casos de HPN (PARKER, 2016).

5.2 CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS LABORATORIAIS E TAMANHO DOS CLONES HPN

Na Tabela 5, estão apresentados os resultados da análise de correlação de Spearman. Como pode-se observar, diversos parâmetros correlacionaram-se significativamente com o tamanho dos diferentes clones HPN.

Tabela 5 – Correlação entre o tamanho dos clones de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e demais parâmetros.

Parâmetro	Coeficiente de correlação de Spearman (rho)		
	Clone neutrófilos	Clone monócitos	Clone hemácias
Idade (anos)	0,393	0,354	0,672*
BT (mg/dL)	0,915*	0,762*	0,849*
BD (mg/dL)	0,778*	0,506	0,561
BI (mg/dL)	0,909*	0,765*	0,854*
He (m/mm ³)	0,638*	0,748*	0,544
Hb (g/dL)	0,679*	0,765*	0,608
Ht (%)	0,669*	0,748*	0,611
VCM (fL)	0,638*	0,426	0,544
HCM (pg)	0,518	0,250	0,525
CHCM (g/dL)	- 0,888*	- 0,827*	- 0,725*
RDW	0,486	0,134	0,544
Leucócitos (p/mm ³)	0,675*	0,565	0,427
Segmentados (mm ³)	0,766*	0,565	0,611
Bastonetes (mm ³)	- 0,493	- 0,389	- 0,236
Linfócitos (mm ³)	- 0,403	- 0,243	0,067
Monócitos (mm ³)	0,681*	0,444	0,904*
Eosinófilos (mm ³)	0,640*	0,437	0,281
Basófilos (mm ³)	0,243	0,204	0,413
Plaquetas (p/mm ³)	0,661*	0,509	0,419
VPM (fL)	0,683	0,476	0,018
Reticulócitos (%)	0,869*	0,668*	0,678*
(p/mm ³)	0,954*	0,796*	0,812*

BT- Bilirrubina total; BD – Bilirrubina direta; BI – Bilirrubina indireta He – hemácias; Hb – hemoglobina; Ht – hematócrito; VCM - volume corpuscular médio; HCM - hemoglobina corpuscular média; CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média; VPM - volume plaquetário médio; VR – valores de referência. N = 10 com exceção de VPM em que N = 8. *Significativo (p ≤ 0,05).

Fonte: A autora.

A idade apresentou correlação diretamente proporcional e moderada com o tamanho do clone de hemácias. A HPN é uma doença progressiva em que o tamanho do clone HPN pode aumentar com o tempo (BRASIL, 2019), o que pode explicar o resultado encontrado.

Em relação aos exames realizados no setor de bioquímica, os resultados de bilirrubina total e bilirrubina indireta apresentaram correlação significativa e diretamente proporcional com os clones HPN de neutrófilos, monócitos e hemácias. Esses resultados de bilirrubina indireta demonstram mais uma vez a questão da hemólise intravascular, porém, como já comentado, isso seria mais bem evidenciado se a comparação fosse feita com os resultados do LDH. Interessantemente, os melhores coeficientes de correlação foram encontrados para o tamanho do clone de neutrófilos, o que sugere que, apesar da concentração de bilirrubina e frações ser considerada marcador de hemólise e de que a hemólise costuma estar relacionada com o clone de hemácias, os resultados de bilirrubina também podem auxiliar a avaliar a situação de outros clones HPN. A correlação inferior com o clone de hemácias também pode ter relação com o fato de que este clone sempre tem o seu tamanho subestimado devido à hemólise.

Em relação aos parâmetros avaliados no hemograma, as hemácias, hemoglobina e hematócrito apresentaram correlação significativa e diretamente proporcional ao tamanho dos clones de neutrófilos (correlação moderada) e monócitos (correlação forte). Já o volume corpuscular médio (VCM) correlacionou-se apenas com o clone de neutrófilos, tendo uma correlação diretamente proporcional e moderada. A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi inversamente proporcional com os clones de neutrófilos, monócitos e hemácias, tendo um coeficiente de correlação considerado alto.

Os resultados de hemácias, hemoglobina, hematócrito e VCM não foram de acordo com esperado para portadores de HPN, uma vez que se espera que esses resultados correlacionem-se com o tamanho do clone de hemácias e não dos leucócitos. Outro achado inesperado foi que as correlações foram diretamente proporcionais. Como os portadores de clones maiores tem, provavelmente, uma maior destruição de eritrócitos, acreditava-se que o quadro anêmico deles fosse mais grave e que eles apresentassem os parâmetros mais baixos do eritrograma. De fato,

um estudo de Gupta *et al.* (2010) encontrou uma correlação inversamente proporcional entre o clone HPN e a concentração de hemoglobina ($r = -0.523$, $p < 0.05$).

No presente estudo, não foram levantados dados de prontuário dos participantes, por isso, não se sabe se os indivíduos receberam algum tipo de intervenção terapêutica antes ou durante a realização dos exames de sangue, seja por meio de transfusões ou medicamentos. Como já citado, as intervenções tem impacto direto na qualidade de vida dos indivíduos e nos resultados de exames laboratoriais. Nesse contexto, uma possibilidade é que os momentos em que os indivíduos tinham os maiores clones HPN eram também os momentos em que eles sofreram alguma intervenção, o que pode ter melhorado os seus resultados de hemograma, justificando porque as correlações encontradas não estavam dentro do aguardado. Uma outra possibilidade é de que, no momento da coleta dos exames, os indivíduos estivessem com alguma outra condição clínica associada.

Diferentemente dos outros parâmetros do eritrograma, o CHCM apresentou-se como o esperado, ou seja, quanto maior o clone HPN menor o CHCM. O CHCM é um índice hematimétrico que se encontra alterado quando existe diminuição da síntese de hemoglobina e, por isso, as hemácias tornam-se hipocrômicas (COMAR; PASQUINI, 2013). A anemia da HPN é uma anemia complexa, apresentando-se como uma anemia hemolítica com TAD negativo, porém ela costuma ser multifatorial, com uma combinação de hemólise e falência da medula óssea (BRODSKY, 2014; PARKER, 2005). Em decorrência da hemólise intravascular, ocorre a hemoglobinúria que é responsável pela perda crônica de ferro na urina, fator que contribui para o CHCM diminuído (BORDIN; BARROS, 2013).

Da mesma forma que para as dosagens de bilirrubina, os melhores coeficientes de correlação com o CHCM foram para os clones de leucócitos e não eritrócitos, o que, mais uma vez, sugere que, apesar do CHCM estar relacionado com o desenvolvimento de anemia e, presumidamente com o clone de hemácias, a situação de outros clones HPN também pode ser acompanhada por este índice.

Em relação aos demais dados do hemograma, a contagem total de leucócitos foi significativa e diretamente proporcional com o clone de neutrófilos, assim como a contagem absoluta de segmentados, monócitos e eosinófilos e a contagem de plaquetas (correlação moderada). A contagem absoluta de monócitos também

apresentou uma correlação diretamente proporcional e forte com o tamanho do clone de hemácias. Assim como o que foi discutido para os parâmetros relacionados às hemácias, esperava-se que quanto maior o clone, menores seriam as contagens dos leucócitos e plaquetas, demonstrando a ineficácia da hematopoiese que é bem descrita na HPN. Provavelmente, esses achados também podem estar relacionados com possíveis intervenções clínicas sofridas pelos pacientes.

Os valores relativos e absolutos dos reticulócitos apresentaram uma correlação diretamente proporcional ao tamanho dos três tipos de clones. Os valores relativos apresentaram correlação forte, moderada e moderada para os clones de neutrófilos, monócitos e hemácias, respectivamente. Por outro lado, os valores absolutos apresentaram correlação muito forte, forte e forte para os clones de neutrófilos, monócitos e hemácias, respectivamente. Esses resultados eram esperados, uma vez que a HPN tem como característica a presença de anemia hemolítica hiperregenerativa. Em um estudo conduzido por Pakdeesuwan *et al.* (2001), foi observado que o número e o índice de produção dos reticulócitos em pacientes com HPN era muito maior quando comparados com indivíduos normais, indicando então a aceleração da eritropoiese na HPN. A correlação entre a contagem de reticulócitos e o clone de reticulócitos (CD59 negativos) foi significativa ($r = 0,493$, $P = 0,0454$). Sendo assim, resultados de reticulócitos devem estar relacionados com a tentativa de compensação da medula óssea frente à destruição contínua dos eritrócitos pela hemólise intravascular. Evidencia-se que os valores absolutos apresentaram correlações mais fortes quando comparados aos relativos, isso demonstra como a contagem absoluta de reticulócitos é um parâmetro melhor para avaliar a resposta da medula óssea em indivíduos gravemente anêmicos.

Para avaliar se existia associação entre o tamanho dos clones HPN e as alterações eritrocitárias foi realizado o teste de Mann-Whitney U, entretanto, não houveram associações significativas, o que era esperado, uma vez que as alterações encontradas não são específicas para anemias hemolíticas e a frequência dessas alterações foi pequena.

Foram encontrados na literatura consultada, estudos que fizessem análises de correlação semelhantes aos que foram realizados no presente estudo, entretanto, utilizando outros parâmetros de correlação. Um estudo realizado por Azambuja *et al.*

(2015) descreveu 103 casos de HPN, em que foram avaliadas a apresentação clínica, trombose, sobrevida e tamanho do clone. Foram encontrados grandes clones em pacientes com HPN do tipo clássica e pequenos clones na HPN do tipo subclínica/anemia aplástica sugerindo, então, que clones maiores (50%) estão associados a riscos aumentados de trombose e hemoglobinúria, enquanto clones menores (< 50%) estão associados a insuficiência da medula óssea.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A HPN é uma doença rara e extremamente complexa, com diversos mecanismos que ainda não estão completamente elucidados, o que a torna de difícil diagnóstico. Ao longo dos anos, tanto o diagnóstico quanto o tratamento dessa doença evoluíram. Pela citometria de fluxo é possível detectar e quantificar os clones deficientes de GPI com alta especificidade e sensibilidade. Atualmente, com o eculizumab, portadores da HPN com alta atividade conseguem ter uma melhora significativa na qualidade de vida. Diante da análise dos resultados obtidos, foi possível observar a importância da realização da imunofenotipagem para HPN por citometria de fluxo, uma vez que, por mais que os exames complementares tenham a sua importância no diagnóstico/acompanhamento da doença e apresentarem correlações significativas com o tamanho dos clones HPN, eles parecem não refletir completamente a gravidade da doença. No presente estudo, alguns parâmetros laboratoriais apresentaram correlações diretamente proporcionais com os clones de HPN, conforme o esperado, tais como a contagem de reticulócitos e dosagem de bilirrubina indireta. Também como o esperado, observou-se uma correlação inversamente proporcional entre o CHCM e o tamanho do clone de HPN. Por outro lado, alguns parâmetros laboratoriais, como concentração de hemoglobina, hematócrito e hemácias apresentaram correlações positivas com o tamanho do clone, de forma diferente do esperado. A fim de confirmar esses resultados, torna-se importante a realização de um estudo com um número maior de participantes e que correlacione os resultados laboratoriais com a história clínica deles.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, M. M. DE A. S. *et al.* Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo, v. 56, n. 2, p. 214–221, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S010442302010000200022>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000200022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 20 abr. 2021.

AZAMBUJA, A. P. *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone in 103 Brazilian patients: diagnosis and classification. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 2, p. 90–97, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.01.001>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/QN8gtmdHfrcr9g4Vp4rcqLS/?lang=en#>. Acesso em: 20 abr. 2021.

BESSLER, M.; HIKEN, J. The Pathophysiology of Disease in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Hematology**. St Louis, v. 2008, n. 1, p. 104–110, 1 jan. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.104>. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article/2008/1/104/95853/The-Pathophysiology-of-Disease-in-Patients-with>. Acesso em: 20 abr. 2021.

BORDIN, José Orlando; BARROS, Melca Maria Oliveira. Anemias Hemolíticas Imunes. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 29. p. 239-247.

BOROWITZ, M. J. *et al.* Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78b, n. 4 p. 211-230. 28 abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20525>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.b.20525>. Acesso em: 10 fev. 2021

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão nacional de incorporação de tecnologias no sus – CONITEC. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Hemoglobinúria Paroxística Noturna Alta Atividade**. Brasília, 2019. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2019/Relatorio_PCDT_HPNC_CP34_2019.pdf. Acesso em: 08 fev. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão nacional de incorporação de tecnologias no sus – CONITEC. **Eculizumabe para o tratamento da Hemoglobinúria Paroxística Noturna**. Brasília, 2018. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Eculizumabe_HPNC.pdf. Acesso em: 08 fev. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de atenção especializada à saúde, secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos. **Portaria conjunta nº 18, de 20 de novembro de 2019**. Brasília, 2019. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/Portaria/2019/PortariaConjunta_SCTIE_SAES_18_2019.pdf. Acesso em: 08 fev. 2021.

BRODSKY, R. A. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6522–6527, 25 jun. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-195966>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/113/26/6522/26212/How-I-treat-paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria>. Acesso em: 05 fev. 2021.

BRODSKY, R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2804–2811, 30 out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-522128>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/124/18/2804/33385/Paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria>. Acesso em: 05 fev. 2021.

COMAR, Samuel Ricardo; PASQUINI, Ricardo. Bases Técnicas do Hemograma e suas Aplicações. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 83. p. 817-830.

COSTA, Fernando Ferreira; FERTRIN, Kleber Yotsumoto; CONRAN, Nicola. Síndrome Hemolítica. Fisiopatologia e Clínica. Classificação. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 22. p. 161-167.

CROSBY, W, H. Historical Review: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: A Classic Description by Paul Strübing in 1882, and a Bibliography of the Disease. **Blood** 1951; 6 (3): 270–284. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V6.3.270.270>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/6/3/270/7080/Historical-Review-Paroxysmal-Nocturnal>. Acesso em: 26 jul. 2021.

DEVALET, B. *et al.* Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. **European Journal of Haematology**, v. 95, n. 3, p. 190–198, set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejh.12543>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ejh.12543>. Acesso em: 05 fev. 2021.

DEVOS, T. *et al.* Diagnosis and management of PNH: Review and recommendations from a Belgian expert panel. **European Journal of Haematology**, v. 101, n. 6, p. 737–749, 1 dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejh.13166>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ejh.13166>. Acesso em: 27 ago. 2021.

DEZERN, A. E.; BOROWITZ, M. J. ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 1 - Clinical Utility. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, v. 94, n. 1, p. 16–22, 28 jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21608>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21608>. Acesso em: 20 jul. 2021.

GUPTA, S. K. *et al.* PNH clone assessment by flow cytometry and its clinical correlation in PNH and aplastic anemia. **Journal of Hematopathology**, v. 3, n. 4, p. 137–143, 23 dez. 2010. DOI: 10.1007/s12308-010-0079-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12308-010-0079-z>. Acesso em: 20 jul. 2021.

HALL, CL.; RICHARDS, S.; HILLMEN, P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal. **Blood**, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0009>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/102/10/3587/16955/Primary-prophylaxis-with-warfarin-prevents>. Acesso em: 05 fev. 2021.

HILL, A. *et al.* Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2559–2565, 1 out. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0564>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/106/7/2559/21677/Sustained-response-and-long-term-safety-of>. Acesso em: 05 fev. 2021.

HILLMEN, P. *et al.* Effect of Eculizumab on Hemolysis and Transfusion Requirements in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 6, p. 552–559, 5 fev. 2004. DOI: DOI: 10.1056/NEJMoa031688. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa031688>. Acesso em: 05 fev. 2021.

HILLMEN, P. *et al.* Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4123–4128, 1 dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095646>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/110/12/4123/23480/Effect-of-the-complement-inhibitor-eculizumab-on>. Acesso em: 05 fev. 2021

HILLMEN, P. *et al.* The Complement Inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 12, p. 1233–1243, 21 set. 2006. DOI: 10.1056/NEJMoa061648. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa061648>. Acesso em: 05 fev. 2021.

LOURENÇO, Dayse Maria. Avaliação Laboratorial da Hemostasia. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 60. p. 583-590.

MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi**, v. 24, n. 3, p. 69–71, 1 set. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576830/#R4>. Acesso em: 27 ago. 2021

ORPHANET. **Hemoglobinúria paroxística noturna**. Disponível em: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=21. Acesso em: 1 set. 2021.

ORFAO, A, Cmf en la HPN: Diagnóstico y monitorización. In: SEHH. **HPN Guía clínica**. BcnScience. Madrid. 2010. 14-20.

PAKDEESUWAN, K. *et al.* Clinical paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is the result of expansion of glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored protein-deficient clone in the condition of Deficient Hematopoiesis. **International Journal of Hematology**, v. 73, n. 1, p. 64–70, 1 jan. 2001. DOI: 10.1007/BF02981904. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11372757/>. Acesso em: 07 set. 2021.

PARKER, C. *et al.* Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3699–3709, 1 dez. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1717>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/106/12/3699/109767/Diagnosis-and-management-of-paroxysmal-nocturnal>. Acesso em: 02 fev. 2021

PARKER, C. Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: ‘defining the disease’. **British Journal of Haematology**, v. 117, n. 1, p. 3–22, abr. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03374.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2141.2002.03374.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 02 fev. 2021.

PARKER, C. J. Management of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in the Era of Complement Inhibitory Therapy. **Hematology**, v. 2011, n. 1, p. 21–29, 10 dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.21>. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article/2011/1/21/96456/Management-of-Paroxysmal-Nocturnal-Hemoglobinuria>. Acesso em: 26 jul. 2021.

PARKER, C. J. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: An Historical Overview. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2008 n 1. p. 93–103. DOI: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.93>. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article/2008/1/93/95843/Paroxysmal-Nocturnal-Hemoglobinuria-An-Historical>. Acesso em: 26 jul. 2021.

PARKER, C. J. Update on the diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Hematology**, v. 2016, n. 1, p. 208–216, 2 dez. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.208>. Disponível em: <https://ashpublications.org/hematology/article/2016/1/208/21101/Update-on-the-diagnosis-and-management-of>. Acesso em: 03 fev. 2021.

PASQUINI, Ricardo; OLIVEIRA, Michel Michels de. Hemoglobinúria Paroxística Noturna. In: ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. Cap. 14. p. 103-107.

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. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 1, p. 36–52, 25 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejh.13176>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ejh.13176>. Acesso em: 20 jul. 2021

ROSSE, W. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 60, n. 1, p. 20–23, 1 jul. 1982. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120759744?via%3Dihub#bib21>. Acesso em: 20 jul. 2021

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, 1 maio 2014. DOI: <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.093161>. Disponível em: <https://haematologica.org/article/view/7038>. Acesso em: 01 set. 2021.

SCHREZENMEIER, H. *et al.* Baseline clinical characteristics and disease burden in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): updated analysis from the International PNH Registry. **Annals of Hematology**, v. 99, n. 7, p. 1505–1514, 10 jul. 2020. DOI: [10.1007/s00277-020-04052-z](https://doi.org/10.1007/s00277-020-04052-z).1.208. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7316848/>. Acesso em: 01 set. 2021.

ANEXO A – PARECER CEP SH UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil laboratorial de pacientes portadores de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, HU/UFSC/EBSERH

Pesquisador: Ana Carolina Rabello de Moraes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44549921.4.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.647.948

Apresentação do Projeto:

As informações que seguem e as elencadas nos campos "Objetivo da pesquisa" e "Avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1715028.pdf, de 02/04/2021, preenchido pelos pesquisadores.

Segundo os pesquisadores:

Resumo: A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença rara de células-tronco hematopoiéticas, causada por uma mutação em um gene localizado no cromossomo X, essa mutação resulta em uma deficiência de uma proteína de membrana denominada glicosil fosfatidilinositol (GPI), que tem como função ancorar uma série de proteínas à membrana celular. Com a deficiência de GPI, há uma deficiência nas proteínas que seriam ancoradas por ela, o que leva ao desenvolvimento e aparecimento das manifestações clínicas dessa doença. As manifestações clínicas são variadas e dependem da gravidade da doença, mas podem incluir: anemia hemolítica, trombofilia e insuficiência da medula óssea. Por ser uma doença rara e de difícil diagnóstico, sua incidência não é totalmente conhecida, mas estima-se que seja de 1,3 casos novos por milhão de pessoas a cada ano. O diagnóstico e a classificação da HPN são feitos com base nas características clínicas e laboratoriais do paciente. Nos exames laboratoriais, podem

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 4.647.948

ser observados, por exemplo, a diminuição da concentração de hemoglobina, a leucopenia, a trombocitopenia e o aumento da lactado desidrogenase sérica. Porém, o diagnóstico definitivo é feito por meio da técnica de citometria de fluxo, em que é possível detectar e quantificar as células que apresentam deficiência das proteínas de membrana que seriam ancoradas pela proteína GPI, o que se denomina clone HPN. O tratamento da HPN depende dos sinais e sintomas do paciente, e tem como objetivo reduzir os sintomas causados pela doença e evitar possíveis complicações. Somente o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas pode curar a HPN, mas esta forma de tratamento está associada a elevadas taxas de morbimortalidade. Adicionalmente, existem alguns medicamentos que podem ser utilizados no tratamento da HPN. Diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar o perfil e evolução laboratorial de pacientes com HPN no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH por meio da coleta de dados laboratoriais desses pacientes e, por fim, espera-se determinar o perfil laboratorial desses pacientes e verificar como os dados obtidos se relacionam com a literatura.

Hipótese: A caracterização do perfil laboratorial dos pacientes com HPN atendidos Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH permitirá conhecer o perfil regional dos pacientes e auxiliará a melhorar o atendimento dos portadores de HPN pelo Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH.

Metodologia Proposta:

- **COLETA DOS DADOS:** Este trabalho é um estudo quantitativo, transversal e retrospectivo em que serão utilizados os dados do sistema da ULAC do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH e do registro interno do setor de marcadores celulares. A obtenção dos resultados laboratoriais será realizada utilizando-se o número de prontuário dos pacientes. Serão levantados dados dos setores de hematologia, bioquímica, urinálise, marcadores celulares e imunologia. Destes setores serão coletados os dados dos seguintes exames:

imunofenotipagem para HPN, hemograma, TAP, TTPA, d-dímero, mielograma, reticulócitos, LDH, bilirrubina, ferro sérico, índice de saturação da transferrina pelo ferro, ureia, creatinina, parcial de urina e haptoglobina, além de idade e sexo do paciente que estão citados normalmente nos cabeçalhos dos laudos. Adicionalmente, serão coletadas quaisquer informações clínicas anotadas nos livros de registro interno do setor de marcadores celulares (estas informações são obtidas pelo setor a partir das requisições de exames que chegam nele). A farmacêutica Dra. Chandra Chiappin Cardoso, coordenadora, reunirá todos os resultados do período do estudo em uma

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 4.647.948

tabela. Os dados serão encaminhados aos demais pesquisadores no formato de tabelas onde não constará qualquer tipo de identificação do sujeito participante que permita conectar os resultados laboratoriais aos seus donos.

- ASPECTOS ÉTICOS: Este estudo será realizado mediante a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Santa Catarina (UFSC), de acordo com o preconizado pela Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº486 de 2012. Os dados obtidos serão utilizados apenas para este fim e terão seu sigilo preservado. Conforme previsto pelo OFÍCIO CIRCULAR Nº 2/2021/CONEP/SECNS/MS, o TCLE será apresentado aos pacientes de forma não presencial. Para a obtenção dos telefones de contato dos pacientes, será solicitado a um funcionário da ULAC do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH não vinculado ao projeto para levantar a lista de nomes e telefones dos possíveis participantes da pesquisa. Os contatos serão realizados atendendo as normas estipuladas no referido ofício. A primeira tentativa de contato será via aplicativo de mensagens Whatsapp e, se não for possível, será via ligação telefônica. Gostaríamos de salientar que todos os contatos serão realizados individualmente e a única informação coletada em ambiente virtual será a resposta do participante à pergunta sobre o consentimento, assegurando o sigilo e confidencialidade das informações dos pacientes. O paciente receberá o convite para participar da pesquisa em forma de texto e o TCLE assinado pelos pesquisadores será enviado em arquivo PDF para o paciente, após o paciente ler e tirar quaisquer dúvidas, será perguntado se ele aceita ou não participar da pesquisa. As trocas de mensagem e gravações contendo a anuência ou não do participante serão salvas em computador e apagadas do dispositivo de celular.

- Critérios de inclusão: Serão incluídos na pesquisa os resultados laboratoriais de portadores de HPN diagnosticados pelo setor de marcadores celulares da Unidade de laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH no período de janeiro de 2014 a julho de 2021 e que sejam maiores de 18 anos e que tenham concordado em participar do estudo por meio do TCLE.

Critérios de exclusão: Serão excluídos da pesquisa os resultados laboratoriais de portadores de HPN que não possuem resultados de hemograma registrado no sistema do laboratório ou nos livros de registro interno do setor de marcadores celulares.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 4.647.948

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil laboratorial de pacientes portadores de HPN no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos:

Os riscos existentes para esse projeto estão relacionados à quebra de confidencialidade dos dados coletados, por isso, os dados obtidos serão armazenados codificados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo. Após a obtenção do consentimento do participante, será realizada a coleta dos dados e estes serão tabelados pelos pesquisadores. As informações obtidas serão mantidas em sigilo e utilizadas exclusivamente para os fins dessa pesquisa. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. O anonimato dos participantes será mantido quando da divulgação dos resultados nos meios científicos, pois os dados apresentados não incluirão nomes de pessoas, ou seja, apenas divulgaremos resultados obtidos como um todo.

Benefícios:

Os pacientes não terão benefícios diretos com esse estudo, entretanto, será possível determinar o perfil laboratorial dos pacientes atendidos pelo Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH, o que pode vir a melhorar o processo de diagnóstico e acompanhamento desses indivíduos, visto que esta é uma doença rara e que diminui consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Informações retiradas primariamente do formulário com informações básicas sobre a pesquisa gerado pela Plataforma Brasil e/ou do projeto de pesquisa e demais documentos postados, conforme lista de documentos e datas no final deste parecer.

Projeto de TCC de Gisieli Megue Pagliarini, do curso de Farmácia, constam a pesquisadora principal Ana Carolina Rabello de Moraes e a coorientadora denominada Chandra Chiappin Cardoso.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 4.647.948

Estudo nacional e unicêntrico, retrospectivo.

Financiamento: próprio.

Número de participantes no Brasil: 50

Previsão de início do estudo: [17/05/2021 no formulário PB].

Previsão de término do estudo: [05/01/2023 no formulário PB].

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações."

Recomendações:

- 1) Solicita-se alterar o termo cópia por via no TCLE
- 2) Solicita-se retirar o campo para inclusão do CPF, uma vez que não devem ser solicitados dados pessoais no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que toda a documentação está adequada, este CEP é de parecer favorável à aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1715026.pdf	02/04/2021 14:40:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HPN_projeto_comite_2v_02042021.pdf	02/04/2021 14:38:14	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
Outros	RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.pdf	02/04/2021 14:37:07	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_projeto_gisieli.pdf	02/04/2021 14:36:13	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 4.647.948

Ausência	TCLE_projeto_gisieli.pdf	02/04/2021 14:38:13	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_projeto_hpn_gisieli_assinado_ana_assinado_mareni.pdf	02/04/2021 14:35:08	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Projeto_017_Declaracao_de_Ciencia_da_Instituicao.pdf	09/03/2021 15:38:38	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 13 de Abril de 2021

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br