



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA-CLÍNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**JUAN DANIEL ZÚÑIGA PRO**

**NOVOS DE BIOMARCADORES DE FUNÇÃO RENAL NÃO CONVENCIONAIS EM  
PACIENTES COM HEMOGLOBINÚRIA PAROXISTICA NOTURNA**

**FORTALEZA**

**2018**

JUAN DANIEL ZÚÑIGA PRO

NOVOS DE BIOMARCADORES DE FUNÇÃO RENAL NÃO CONVENCIONAIS EM  
PACIENTES COM HEMOGLOBINÚRIA PAROXISTICA NOTURNA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças crônicas degenerativas.

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P956 Pro, Juan Daniel.  
Novos de biomarcadores de função renal não convencionais em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna / Juan Daniel Pro. – 2019.  
68 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Elizabeth De Francesco Daher.
1. Hemoglobinúria paroxística noturna. 2. Lesão renal aguda. 3. Biomarcadores renais. 4. MCP-1. 5. KIM-1. I. Título.

CDD 610

---

JUAN DANIEL ZÚÑIGA PRO

NOVOS DE BIOMARCADORES DE FUNÇÃO RENAL NÃO CONVENCIONAIS EM  
PACIENTES COM HEMOGLOBINÚRIA PAROXISTICA NOTURNA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças crônicas degenerativas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Herivaldo Ferreira da Silva  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Junior  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Dr. Gdayllon Cavalcante Meneses  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Marina Pro.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À professora Elizabeth De Francesco Daher, por me permitir fazer parte desta pesquisa e por sua orientação ao longo deste projeto, bem como ao Professor Herivaldo Ferreira por sua inestimável ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, também para Gdayllon Cavalcante e o grupo de trabalho do Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDT) pela grande colaboração em cada etapa do trabalho. Também aos pacientes pela sua participação neste projeto.

“I don't know anything, but I do know that everything is interesting if you go into it deeply enough”.

Richard Feynman

## RESUMO

**Introdução:** A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença hemolítica crônica adquirida classificada como rara, da qual a fisiopatologia da disfunção renal ainda não é bem entendida. **Objetivos:** Avaliar a importância de novos biomarcadores de lesão renal precoce em pacientes com HPN. **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal de caso-controle, observacional e analítico com 17 pacientes com HPN do ambulatório de hematologia do HUWC. Após a confirmação do diagnóstico pela citometria de fluxo de sangue periférico, foram coletadas amostras aleatórias de urina e sangue. Foram avaliados parâmetros clínicos e renais associados à HPN. Para análise da função renal o ritmo de filtração glomerular (RFGe) foi estimado usando a fórmula CKD-EPI. Dois biomarcadores renais foram avaliados: KIM-1 urinário (uKIM-1) e MCP-1 urinário (uMCP-1), os quais foram quantificados utilizando o método de imunoenensaio (ELISA). Foram realizadas comparações e correlações estatísticas para avaliar o papel dos biomarcadores renais para a detecção de alterações renais subclínicas na HPN. **Resultados:** Os pacientes com HPN apresentaram importantes distúrbios hematológicos e sinais de anemia hemolítica intravascular. Os níveis de uMCP-1 foram significativamente maiores em comparação com o grupo controle ( $p=0.017$ ) e apresentou correlações positivas com a fração de excreção de sódio ( $p=0.004$ ), fração de excreção de cloreto ( $p=0.008$ ) e correlação inversa com o ácido úrico ( $p=0.016$ ). Em relação aos níveis de uKIM-1, não foi encontrada significância estatisticamente relevante entre os dois grupos ( $p=0.65$ ). **Conclusão:** Não foi observada disfunção renal clinicamente evidente utilizando os marcadores tradicionais de função renal. Porém, o uMCP-1 apresentou níveis elevados nos pacientes com HPN, que podem apresentar danos renais nas células epiteliais do túbulo proximal devido a processos inflamatórios no espaço intermediário entre os túbulos (nefrite intersticial). Esse resultado sugere que o uMCP-1 poderia representar um biomarcador útil para a detecção precoce de disfunção renal. A falta de resultados significativos com o biomarcador uKIM-1 pode ser devido à ausência de lesão renal de origem isquêmica, devido à redução significativa de eventos trombóticos após o uso de eculizumabe.

**PALAVRA CHAVE:** Hemoglobinúria paroxística noturna, Lesão renal aguda, Biomarcadores renais, MCP-1, KIM-1.

## ABSTRACT

**Introduction:** Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare chronic acquired hemolytic disease, of which the pathophysiology of renal dysfunction is not well understood. **Objectives:** To evaluate the importance of new biomarkers of early renal injury in patients with PNH. **Methods:** A cross-sectional, observational and analytical case-control study was conducted with 17 PNH patients from the HUWC hematology outpatient clinic. After confirmation of the diagnosis by peripheral blood flow cytometry, random urine and blood samples were collected. Clinical and renal parameters associated with PNH were evaluated. For renal function analysis the glomerular filtration rate (eGFR) was estimated using the CKD-EPI formula. Two renal biomarkers were evaluated: urinary KIM-1 (uKIM-1) and urinary MCP-1 (uMCP-1), which were quantified using the immunoassay method (ELISA). Statistical comparisons and correlations were performed to assess the role of renal biomarkers in detecting subclinical renal changes in PNH. **Results:** Patients with PNH had noticeable hematological disorders and signs of intravascular hemolytic anemia. The uMCP-1 levels were significantly higher compared to the control group ( $p = 0.017$ ) and showed positive correlations with sodium excretion fraction ( $p = 0.004$ ), chloride excretion fraction ( $p = 0.008$ ), and inverse correlation with uric acid ( $p = 0.016$ ). Regarding uKIM-1 levels, no relevant statistical significance was found between the two groups ( $p = 0.65$ ). **Conclusion:** No clinically evident renal dysfunction was observed using the traditional markers of renal function. However, uMCP-1 showed elevated levels in PNH patients, who may have renal damage to the proximal tubule epithelial cells due to inflammatory processes in the intermediate space between the tubules (interstitial nephritis). This result suggests that uMCP-1 could represent a useful biomarker for early detection of renal dysfunction. The lack of significant results with the uKIM-1 biomarker may be attributable to the absence of renal injury of ischemic origin due to the important reduction in thrombotic events following eculizumab use.

**Keywords:** Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Acute renal injury, Renal biomarkers, MCP-1, KIM-1.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Biossíntese da âncora GPI .....	17
Figura 2 - Esquema representativo dos mecanismos de lesão renal na HPN .....	23
Figura 3 - Mecanismo de ação do eculizumabe .....	24
Figura 4 - Algoritmo para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento da HPN .....	29
Figura 5 - Fluxograma da população de estudo .....	42
Figura 6 - Níveis de KIM-1 urinário (uKIM-1) em pacientes com HPN vs. Controle .....	50
Figura 7 - Níveis de MCP-1 urinário (uMCP-1) em pacientes com HPN vs. Controle .....	50
Figura 8 - Gráficos de dispersão (correlações significativas do uMCP-1) .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1A - Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPN .....	44
Tabela 1B - Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPN .....	45
Tabela 2 - Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPN vs. grupo controle .....	46
Tabela 3 - Correlações de Spearman e Pearson entre parâmetros clínicos – laboratoriais e novos biomarcadores em pacientes com HPN .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Anemia aplásica.
DRC	Doença renal crônica
FEK+	Fração de excreção de potássio
FENa	Fração de excreção de sódio
GPI	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
GPI-Aps	GPI-anchored proteins
HO-1	Heme oxigenase-1
Hp	Haptoglobina
HPN	Hemoglobinuria paroxística noturna
HPNsc	Hemoglobinuria paroxística noturna subclínica (HPNsc)
I-PIG	International PNH Interest Group
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeos
LRA	Lesão renal aguda
MAC	Membrane attack complex
MAC	Membrane attack complex
RCUD	Cytopenia with unilineage dysplasia
MO	Medula óssea
NO	Óxido nítrico
PIG-A	Phosphatidyl-inositol-glycan-class A
RCUD	Cytopenia Refratária com Displasia Unilinear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SMD	Síndrome mielodisplásica
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimado
TGF-beta	Transforming Growth Factor beta
TGO	Transaminase glutâmico- oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
THP	Proteína Tamm-Horsfall
uKIM-1	Kidney Injury Molecule-1 urinária
uMCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1 urinária

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Mecanismos sugeridos na fisiopatologia da HPN .....	16
1.2 Prevalência de HPN .....	17
1.3 Diagnóstico e classificação .....	18
1.4 Tratamento .....	21
1.4.1 Eculizumabe .....	22
1.4.2 Impacto do Eculizumabe na função renal .....	22
1.4.3 Perspectivas futuras .....	25
1.5 Fisiopatologia da lesão renal na HPN .....	25
1.5.1 Heme citotoxicidade .....	26
1.5.2 Mecanismos de proteção renal contra o heme livre .....	28
1.6 Marcadores de função renal .....	29
1.6.1 Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) .....	31
1.6.2 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) .....	32
2 OBJETIVOS .....	35
2.1 Objetivo Geral .....	35
2.2 Objetivos Específicos .....	35
3 METODOLOGIA .....	36
3.1 Desenho e local do estudo .....	36
3.2 Critérios de inclusão e exclusão .....	36
3.3 População do estudo .....	36
3.4 Coleta de dados e processamento das amostras biológicas .....	37
3.5 Análises laboratoriais .....	37
3.6 Análise da função renal .....	38
3.7 Parâmetros de disfunção renal .....	39
3.8 Quantificação dos novos biomarcadores renais e biomarcadores inflamatórios .....	39
3.9 Análise Estatística .....	40
3.10 Aspectos éticos .....	40
3.11 Descarte do material biológico .....	40
4 RESULTADOS .....	41

4.1 Características demográficas, clínicas e laboratoriais do grupo HPN e controle .....	41
4.2 Avaliação de parâmetros renais e novos biomarcadores .....	42
4.3 Correlações entre os biomarcadores renais subclínicos e os parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com HPN .....	43
5 DISCUSSÃO .....	52
6 CONCLUSÕES .....	55
REFERÊNCIAS .....	56
ANEXOS .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma enfermidade clonal adquirida da célula tronco hematopoética, caracterizada pela expansão clonal não maligna de uma ou mais células-tronco hematopoéticas que adquiriram mutações somáticas no gene da glicosil-fosfatidil-inositol classe-A (phosphatidyl-inositol-glycan-class A, PIG-A) (BESSLER; HIKEN, 2008; BRODSKY, 2009). O déficit da proteína PIG-A condiciona alterações nas proteínas reguladoras de membrana (CD55 e CD59) que acarretam uma sensibilidade anormal ao complemento (PARKER et al., 2005). É considerada ainda um tipo de trombofilia adquirida, apresentando-se com hemólise intravascular, hemoglobinúria, hemossiderinúria, anemia, trombocitopenia, hematopoese diminuída e tendência a fenômenos trombóticos, especialmente em veias abdominais (JARVA; MERI, 1999), Lesão renal aguda (LRA) pode ocorrer em associação às crises hemolíticas (KIRKIZLAR et al., 2007). A HPN surge em associação com outras doenças hematológicas, especialmente com síndromes de insuficiência medular, como anemia aplásica e síndromes mielodisplásicas (PARKER et al., 2005).

Sua incidência não é conhecida, não só pela sua raridade como pela dificuldade diagnóstica que ela impõe. Nos Estados Unidos estima-se um a cinco casos a cada milhão de habitantes, incidência cinco a 10 vezes menor que a de anemia aplásica. É provavelmente mais frequente no sul da Ásia e dentre os orientais. Pode ocorrer em qualquer idade, mas a maioria dos pacientes abre o diagnóstico entre a quarta e a quinta década de vida (SOCIE et al., 1996).

Lesão renal aguda e doença renal crônica (DRC) podem ocorrer em pacientes com HPN (CLARK et al., 1981; KIRKIZLAR et al., 2007; SHIBASAKI; MATSUDA; FURUYA, 2007). A lesão renal aguda é associada com crises hemolíticas e pode ocorrer recuperação sem dano residual (YOUNG; MACIEJEWSKI, 2000). Podem ocorrer: hemoglobinúria, hematúria, proteinúria, hipertensão, distúrbios de concentração urinária e repetidos episódios de trombose em microvasos renais (CLARK et al., 1981; NOMURA et al., 2004; YOUNG; MACIEJEWSKI, 2000). A LRA pode ser a primeira manifestação da doença (ANDRESEN et al., 1989; SHIBASAKI; MATSUDA; FURUYA, 2007). A ocorrência de LRA em grandes séries de HPN é muito rara (FORMAN et al., 1984) ou não é descrita (DACIE JV., 1980). Clark e colaboradores (FRANCO DE CARVALHO et al., 2001) descreveram 21 casos de HPN e somente um caso de azotemia leve. Em alguns pacientes, a LRA ocorre na HPN associada a choque hipovolêmico, sepse, gestação ou pielonefrite (SHIBASAKI; MATSUDA; FURUYA, 2007), porém a principal causa de óbito é a trombose venosa e insuficiência

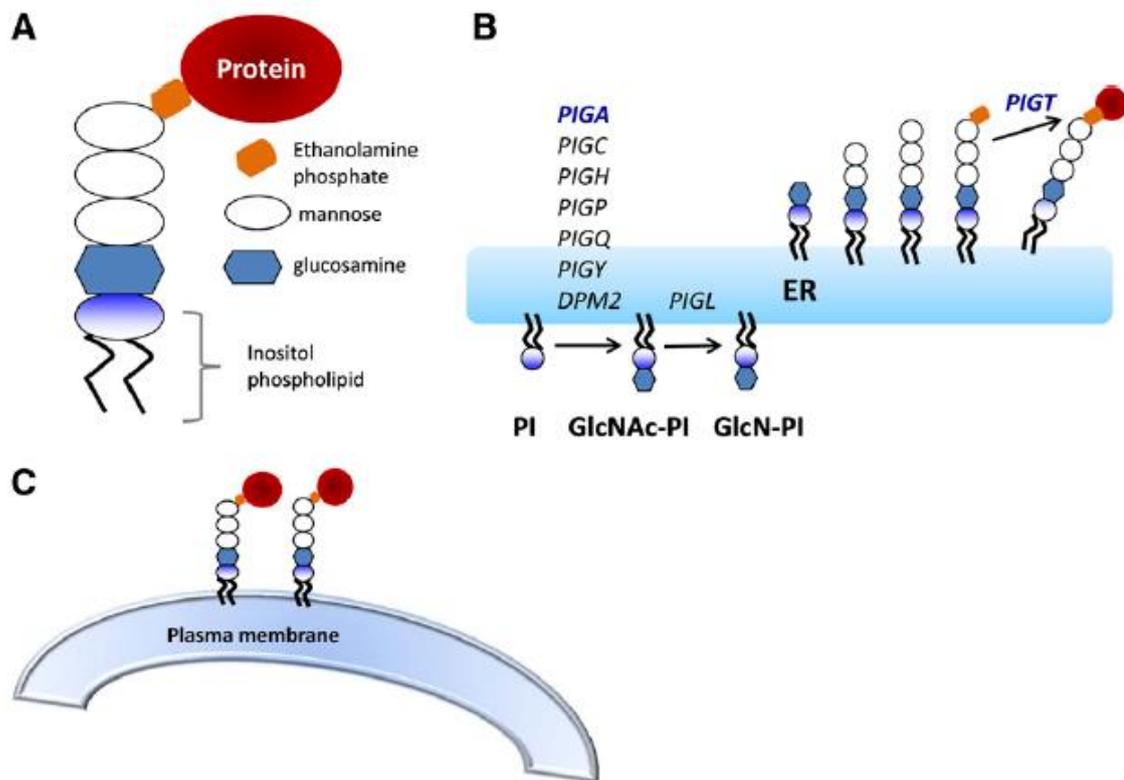
medular (LAU; AULT, 2006). A lesão renal aguda pode ocorrer em decorrência de uma reação pós-transfusional (ANDRESEN et al., 1989).

O exame histológico em casos de LRA na HPN tem demonstrado hemossiderose tubular proximal, sendo escassa em túbulo distal e glomérulo. Em alguns pacientes, há documentação histológica de necrose tubular aguda (KIRKIZLAR et al., 2007; TSAI et al., 2007). É importante monitorar a função renal destes pacientes, principalmente durante as crises hemolíticas, além de tomar medidas para aumentar o volume urinário, como hidratação adequada, para evitar depleção do espaço extracelular e hipotensão arterial, que causam redução da perfusão renal e predis põem a LRA em situações de hemólise.

### **1.1 Mecanismos sugeridos na fisiopatologia da HPN**

O gene PIG-A ligado ao cromossomo X codifica uma subunidade necessária para a atividade da enzima N-acetilglucosamina transferase, que por sua vez atua na síntese do N-acetilglucosaminil-fosfatidilinositol, uma molécula necessária para os passos iniciais da cascata de biossíntese do GPI (MIYATA et al., 1993). O GPI é um glicolípido que atua como âncora para diversas proteínas se fixarem na membrana plasmática de células, entre elas o CD59 e o CD55 na membrana dos eritrócitos (Figura 1).

As células-tronco hematopoiéticas que adquiram essa mutação no gene PIG-A submetidos a um processo de expansão clonal, porém permanecem a coexistir com outras células-tronco normais. eritrócitos normais circulam no sangue em coexistência com os eritrócitos sensíveis à lise pela cascata do complemento devido à ausência das proteínas ancoradas pelo GPI (CD59 e CD55). O estado trombofílico observado na HPN, hoje em dia ainda é um processo pouco compreendido, mas tem uma origem multifatorial, que inclui a deficiência do receptor ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (outra proteína ancorada no GPI), queda dos níveis de óxido nítrico, toxicidade da hemoglobina livre e aumento da atividade plaquetária (HILL; KELLY; HILLMEN, 2013). O sistema complemento também possui interações importantes com a cascata de coagulação. Os componentes da cascata do complemento têm a capacidade de aumentar os níveis de P-selectina e fator von Willebrand (CHAPIN et al., 2016).



**Figura 1.** Biossíntese da âncora GPI. (A) estrutura principal da âncora GPI. O inositol-fosfolípídeo (PI) é ancorado na bicamada lipídica da membrana plasmática. O núcleo de glicano consiste de uma molécula de N-glucosamina, três moléculas de manose (Man) e uma molécula de fosfato de etanolamina. A proteína é ligada covalentemente através de uma ligação amida a uma etanolamina na manose terminal. (B) A biossíntese da âncora GPI ocorre no retículo endoplasmático. O PIGA é uma das sete subunidades envolvidas no primeiro passo da biossíntese da âncora GPI. Existem mais de 10 etapas adicionais mais de 25 genes envolvidos. Depois que a proteína é anexada à âncora GPI, a proteína ancorada no GPI maduro vai para o Golgi, onde ocorre o remodelamento do ácido graxo e (C) eventualmente a proteína ancorada no GPI é transportada para a membrana plasmática (BRODSKY, 2014).

## 1.2 Prevalência de HPN

A incidência de HPN é estimada em 1-1,5 casos por milhão de habitantes em todo o mundo (SOCIE et al., 2016). Mas poderia ser maior em algumas regiões do mundo, como mostrado em estudo realizado em Yorkshire, Inglaterra, onde a prevalência em estudo de 15 anos, com pacientes com clones HPN de qualquer tamanho, era de 15,9 por milhão de habitantes, onde aproximadamente 82% dos pacientes tinham um clone de granulócitos maior

que 1%, 43% dos pacientes tinham clones maiores que 10% e 25% dos pacientes tinham um clone maior que 50% (HILL et al., 2006).

Graças ao Registro Internacional de HPN (iniciado em 2003) para coletar dados epidemiológicos, bem como a história natural da doença, sabe-se que há uma maior frequência nos países asiáticos em comparação com os países ocidentais. Do total de registros alcançados em 25 países, 92,5% dos pacientes eram da Europa e América do Norte, onde 87,5% eram brancos (SOCIE et al., 2016). A faixa etária mais representada era 30 a 59 anos, com muito rara apresentação na população pediátrica e distribuição por sexo mostra uma pequena predominância de mulheres (54,4%) (SOCIE et al., 2016).

Sabe-se agora que o curso e as manifestações clínicas da HPN podem variar dependendo do grupo étnico, como foi demonstrado em um estudo comparativo entre pacientes brancos jovens (norte-americanos) e pacientes asiáticos mais velhos (japoneses). Onde foi observado que os pacientes brancos tinham sintomas predominantemente clássicos de HPN (trombose, hemoglobinúria e infecções) em comparação com pacientes asiáticos com aplasia medular. Eventos trombóticos foram associados significativamente mais com pacientes brancos do que com pacientes asiáticos, no entanto, em ambas as coortes um clone maior de HPN foi associado com sintomas clássicos, enquanto um clone menor foi associado com anemia aplástica (NISHIMURA et al., 2004). Isso parece indicar que a insuficiência da MO associada à HPN também é mais frequente em pacientes asiáticos do que a trombose associada à HPN (HILL et al., 2006).

Atualmente, não existem estudos que possam determinar a incidência de HPN no Brasil, entretanto, um estudo prospectivo multicêntrico, realizado na Espanha para avaliar a eficiência das indicações médicas para o rastreamento da HPN por citometria de fluxo, teve 3938 amostras de sangue de 24 laboratórios da Espanha (1718 amostras) e um centro de referência do Brasil (2220 amostras) (Divisão de Hematologia e Citometria de Fluxo, "Fleury Grup", São Paulo), onde 10% das amostras espanholas deram resultados positivos para o diagnóstico de HPN e 16% nas amostras do Brasil. Outro dos maiores estudos realizados no Brasil foi o da Universidade Federal do Paraná, um estudo retrospectivo de 11 anos que conseguiu estudar 103 casos de HPN em um único centro; onde um maior risco de trombose foi associado com uma apresentação clássica de HPN (DE AZAMBUJA et al., 2015; MORADO et al., 2017).

### 1.3 Diagnóstico e classificação

Os pacientes com HPN podem apresentar uma ampla gama de sinais e sintomas, muitos dos quais são comuns em outras doenças, portanto, dada a raridade da doença, não é apropriado estudar cada paciente com anemia ou trombose, no entanto, algumas apresentações clínicas aumentam a probabilidade de encontrar clones de HPN (BOROWITZ et al., 2010; PARKER et al., 2005).

- A. Hemólise intravascular com evidência de hemoglobinúria, embora apenas uma minoria dos pacientes com HPN apresente hemoglobinúria, qualquer paciente com hemoglobinúria inexplicada deve ser analisado para HPN.
- B. Evidência de hemólise inexplicada, acompanhada por qualquer das seguintes manifestações: deficiência de ferro, dor abdominal, espasmo esofágico, trombose, granulocitopenia, trombocitopenia.
- C. Todos os pacientes com anemia hemolítica e Coombs negativos, particularmente se características de anormalidades da hematoscopia (esferócitos, drepanócitos, esquizócitos, etc.) não estão presentes e não há causa infecciosa óbvia para hemólise.
- D. Os pacientes com HPN são mais propensos à trombose venosa ou arterial com características incomuns ou em localizações incomuns, como veias hepáticas (síndrome de Budd-Chiari), outras veias intra-abdominais (portal, esplênica, esplâncnica), seios do cérebro ou veias dérmicas. Pode ser acompanhada por sinais de anemia hemolítica ou citopenia inexplicada.

A trombose é a causa mais comum de mortalidade em pacientes com HPN e representa aproximadamente 40% a 67% das mortes conhecidas (HILL; KELLY; HILLMEN, 2013). Além disso, 29% a 44% dos pacientes relataram pelo menos um evento trombótico durante o curso da doença, embora as razões pelas quais um evento trombótico possa ocorrer subitamente permanecem um enigma (ARATEN; THALER; LUZZATTO, 2017; SOCIE et al., 1996). Esta taxa de trombose em HPN é provável que seja subestimada, porque um estudo usando técnicas de imagem sensíveis detectou anomalias sugestivas de trombose pulmonar subclínica prévia em 6 de 10 pacientes com HPN (sem trombose prévia conhecida), mesmo em pacientes com aparente início recente da doença. Também houve evidência de dano miocárdico subclínico em 2 de 10 pacientes. Essas trombozes subclínicas podem levar a danos de longo prazo aos órgãos, como refletido pela função cardíaca comprometida na maioria

desses pacientes (HILL et al., 2012).

- E. Evidência de insuficiência da MO, suspeita ou evidência de anemia aplástica ou hipoplásica, citopenia refratária com displasia de unilinhagem ou outras citopenias de etiologia desconhecida.

Embora a ausência de hemólise essencialmente exclua o diagnóstico de "HPN clássica", outras formas de HPN, por definição, não têm hemólise, portanto, não é apropriado limitar o teste de HPN apenas aos pacientes com hemólise. Quão rigorosamente os pacientes com citopenias devem ser investigados é motivo de alguma controvérsia. No entanto, os clones HPN devem ser investigados em qualquer paciente jovem com citopenias, nas quais uma anemia aplástica ou hipoplásica seja parte do diagnóstico diferencial.

Uma recomendação do I-PIG (International PNH Interest Group) sugere que todos os pacientes com anemia aplástica ou citopenia refratária com displasia unilinhagem (RCUD - Cytopenia Refratária com Displasia Unilinear) devam ser examinados anualmente (BOROWITZ et al., 2010). Um estudo completo de pacientes com outras formas de síndrome mielodisplásica (SMD); o "EXPLORE Study", no qual um número significativo de pacientes apresentou populações de HPN (GALILI et al., 2009). Portanto, a recomendação para excluir pacientes com SMD de testes de rotina pode não ser apropriada (BOROWITZ et al., 2010).

O diagnóstico da HPN deve ser confirmado por meio de citometria de fluxo em sangue periférico, exame de rastreamento de HPN, tanto para o diagnóstico como para o monitoramento da doença e tratamento. A identificação do déficit na expressão da GPI é realizada em um primeiro estudo em granulócitos, neutrófilos e monócitos. Nos casos em que a presença de células deficientes em GPI foi demonstrada (clone HPN), é realizada em um segundo estudo em glóbulos vermelhos (VILLEGAS et al., 2016).

Detectando desta forma a ausência ou deficiência dos GPI-APs em pelo menos 2 linhas celulares (BRODSKY, 2009; HALL; ROSSE, 1996). A perda de GPI-APs é detectada após a coloração das células com anticorpos monoclonais e um reagente conhecido como fluorescent aerolysin (FLAER) (BRODSKY et al., 2000). Diretrizes de consenso foram publicadas para detectar células sanguíneas deficientes em GPI-APs usando FLAER em combinação com vários anticorpos monoclonais (BOROWITZ et al., 2010). Um esquema de classificação, proposto pelo I-PIG, inclui três categorias principais de HPN:

- I. HPN clássica, com evidência clínica de hemólise intravascular (reticulocitose,

concentração anormalmente alta de LDH e bilirrubina indireta), mas sem evidência de anormalidades na medula óssea (MO).

- II. HPN no contexto de outro distúrbio específico da MO, os pacientes desta subcategoria apresentam evidências clínicas e laboratoriais de hemólise, mas também apresentam ou já tiveram uma história de anormalidade da MO. A análise da MO e a citogenética são utilizadas para determinar se a HPN surgiu em associação com anemia aplástica (AA), síndrome mielodisplásica (SMD) ou outra doença hematológica.
- III. HPN subclínica (HPNsc), esses pacientes não apresentam evidências clínicas ou laboratoriais de hemólise, pequenas populações de células hematopoéticas deficientes em GPI-APs (eritrócitos do sangue periférico, granulócitos ou ambos) são detectadas por análise citométrica de fluxo muito sensível (PARKER et al., 2005).

A classificação de pacientes com este esquema pode nem sempre ser clara, porque vários graus de insuficiência da MO estão subjacentes a praticamente todos os casos de HPN; por conseguinte, a distinção entre três categorias pode ser difícil em alguns casos (BRODSKY, 2014).

Além da citometria de fluxo, há outro teste específico, o teste da sensibilidade à lise por complemento, utiliza um número conhecido de eritrócitos sensibilizados com anticorpo tratados com soro normal e quantidades conhecidas crescentes de complemento. A quantidade de complemento necessária para lisar 50% dos eritrócitos é utilizada como índice para a quantificação da sensibilidade pelo complemento (ROSSE; DACIE, 1966). Esse exame também levou ao reconhecimento de que alguns pacientes com HPN têm uma população de células normais (Tipo I), com sensibilidade parcial ao complemento (Tipo II) e eritrócitos com alta sensibilidade ao complemento (tipo III) (ROSSE, 1973; ROSSE et al., 1991). No entanto, apesar de ser um teste muito acurado, apresenta grande dificuldade técnica, é difícil de padronizar e pode negligenciar pequenas populações de células anormais (ARRUDA et al., 2010; HALL; ROSSE, 1996).

## **1.4 Tratamento**

As únicas opções de tratamento disponíveis são o inibidor de C5 (Eculizumabe) e o transplante de células-tronco hematopoéticas. Este último erradica células de clonagem HPN e é a única terapia curativa, mas está associada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade;

portanto, é indicado apenas como terapia de primeira linha para pacientes com HPN associada à anemia aplástica. Outras indicações controversas são em pacientes que apresentam sérias complicações da doença, apesar do tratamento com eculizumabe ou naqueles que não têm acesso ao eculizumabe (PARKER, 2016).

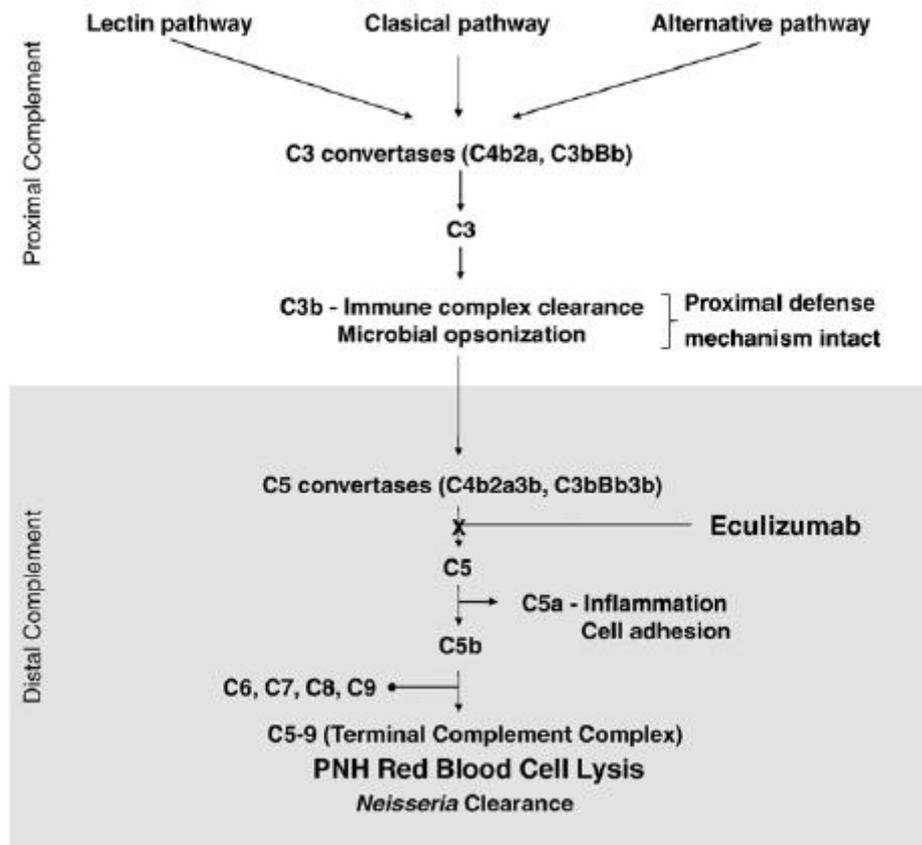
Pacientes com HPNsc geralmente não progridem ou mudam para uma variedade clínica de HPN (PARKER, 2016). A terapia específica para HPN não é indicada na ausência de manifestações clínicas. A maioria dos pacientes com SMD/HPN e AA/HPN tem clones de HPN relativamente pequenos, e a hemólise é tipicamente um achado incidental, portanto, apenas alguns pacientes precisam de tratamento com eculizumabe e a terapia deve se concentrar na síndrome de insuficiência medular (PU; BRODSKY, 2011).

#### **1.4.1 Eculizumabe**

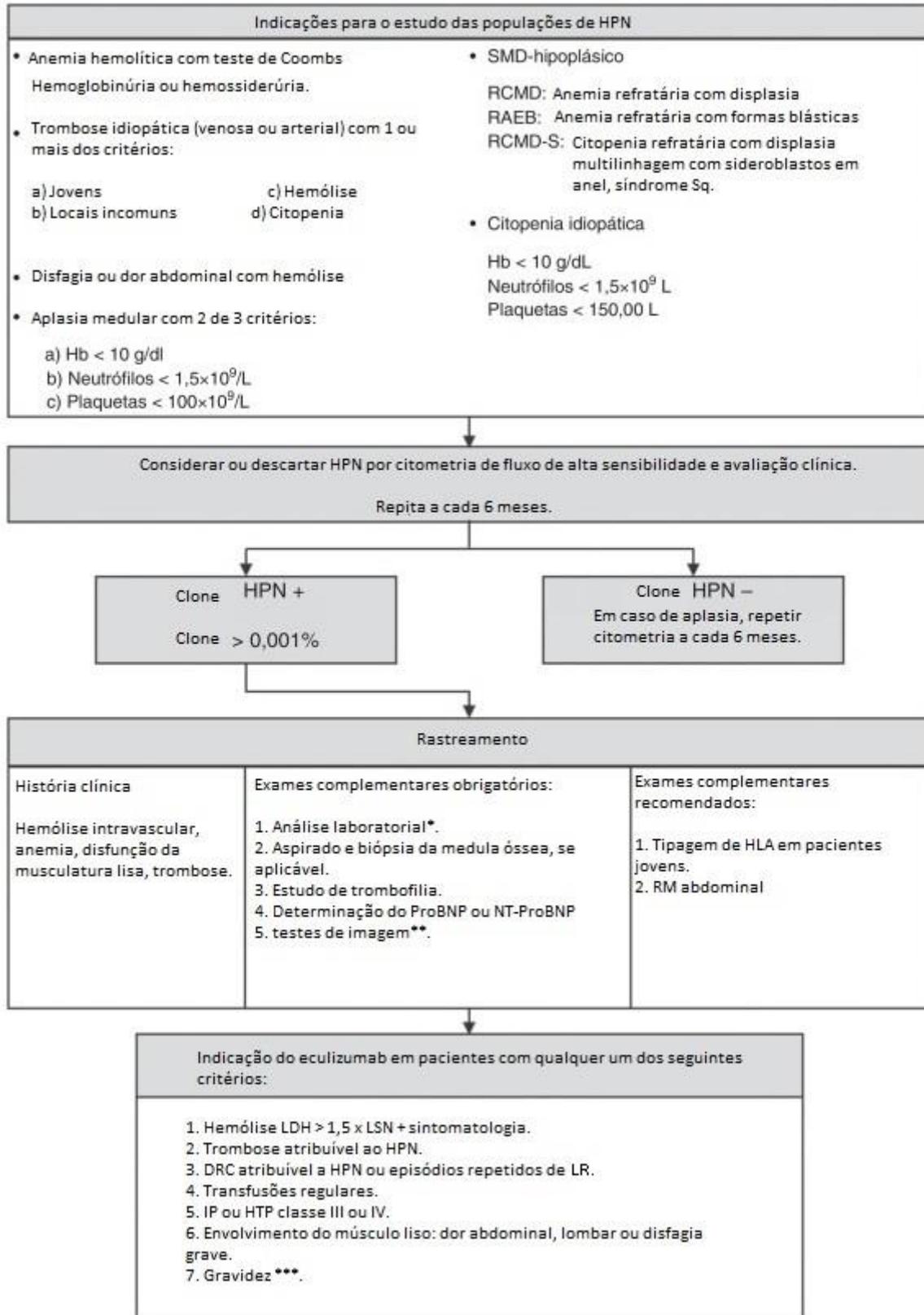
A hemólise intravascular mediada por complemento na HPN pode ser inibida pelo bloqueio da montagem do MAC (membrane attack complex). O eculizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado contra o C5 que inibe a ativação do complemento terminal. A prevenção da clivagem de C5 bloqueia a geração das moléculas de células pró-inflamatórias e líticas, C5a e C5b-9, respectivamente (ROTHER et al., 2007) (Figura 2). Portanto, o Eculizumabe é muito eficaz na redução da hemólise intravascular na HPN, mas não tem como alvo a hemólise extravascular e a insuficiência da MO. Em um estudo com 195 pacientes, o tratamento com Eculizumabe foi eficaz na redução rápida dos níveis de lactato desidrogenase (LDH), um marcador de hemólise, que permaneceu baixo enquanto os pacientes estavam em tratamento, embora alguns pacientes tivessem elevação transitória da LDH sérica. O mesmo estudo mostrou que a porcentagem de pacientes que apresentaram eventos trombóticos diminuiu de 32,3% para 3,6% (HILLMEN et al., 2013). O eculizumabe é geralmente bem tolerado. Eventos adversos comumente relatados em ensaios clínicos incluíram cefaleia, nasofaringite, dor nas costas e náusea (HILLMEN et al., 2013). Esta terapia aumenta o risco de infecções por *Neisseria*, incluindo meningite e sepse. Portanto, os pacientes devem ser vacinados duas semanas antes do início do tratamento com a vacina conjugada tetravalente para *N. meningitidis* a cada tres anos após o início da terapia (ALASHKAR et al., 2017). Outra abordagem comum para a prevenção de *Neisseria* é o uso de penicilina profilática contínua.

### 1.4.2 Impacto do Eculizumabe na função renal

O eculizumabe reduz eventos de hemólise intravascular e hemoglobinúria em pacientes com DRC. Uma coorte mostrou que, após 36 meses de tratamento com eculizumabe, houve melhora ou manutenção da função renal em 94,5% dos pacientes. A melhora na função renal foi observada com maior frequência em pacientes com DRC basal dos estágios 1-2 (melhora de 67,1%,  $P < 0,001$ ). Em geral, 40 (21%) dos 195 pacientes que demonstraram disfunção ou dano renal no início do estudo não eram mais classificados como tal após 18 meses de tratamento (HILLMEN et al., 2010).



**Figura 2.** Mecanismo de ação do eculizumabe. Caminhos clássicos, de lectina e alternativos convergem no ponto de ativação de C3. A via lítica é iniciada com a formação de C5 convertase que eventualmente leva à formação do complexo de ataque à membrana. O eculizumabe é um anticorpo monoclonal que se liga a C5, impedindo assim a formação de C5a e C5b. C5b é o componente inicial do complexo de ataque à membrana. HPN = hemoglobinúria paroxística noturna (RACHIDI; MUSALLAM; TAHER, 2010).



**Figura 3.** Algoritmo para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento da HPN. \* Hemograma, reticulócitos, LDH, bilirrubina, haptoglobina, hemoglobina no plasma, hemoglobinúria, hemosidenuria, vitamina B12, eritropoietina no soro, ferro, ácido fólico,

Coombs direto, creatinina, taxa de filtração glomerular estimada (TFGe), proteinúria. \*\* Ecodoppler abdominal e cardíaca, ressonância magnética craniana ou angiografia usando tomografia computadorizada helicoidal (anuais ou se alterações clínicas). \*\*\* Avalie cada caso individualmente. BNP: peptídeo natriurético tipo B; Hb: hemoglobina; HLA: antígenos de leucócitos humanos; HTP: hipertensão pulmonar; IP: insuficiência pulmonar; LR: lesão renal; DRC: doença renal crônica; NYHA: New York Heart Association; RMN: ressonância magnética nuclear; SDM: síndrome mielodisplásica (VILLEGAS et al., 2016).

### 1.4.3 Perspectivas futuras

Os inibidores do *small molecule factor D* (compostos ACH-3856 e ACH-4471) reduziram significativamente a hemólise mediada pelo complemento. Esses agentes promissores podem ser tomados por via oral e agir bloqueando a via alternativa de ativação do complemento em HPN. Além disso, o composto ACH-4471 diminuiu significativamente a deposição de fragmentos C3 nos eritrócitos HPN, indicando um potencial reduzido em relação ao eculizumabe para hemólise extravascular. O ACH-4471 foi selecionado para desenvolvimento clínico em HPN e está atualmente na fase I do estudo clínico (YUAN et al., 2017).

### 1.5 Fisiopatologia da lesão renal na HPN

A associação entre HPN e alteração da função renal foi primeiramente descrita por RUBIN, em 1971, quando se observou a ocorrência de LRA na vigência de hemoglobinúria intensa em um paciente com HPN, sem evidências de doença renal subjacente. Desde então, diversos casos de LRA em pacientes com HPN foram relatados (BOTELHO et al., 1981; JACKSON et al., 1992; JOSE; LYNN, 2001; MOORAKI et al., 1998; TSAI et al., 2007; ZEIDMAN et al., 1994).

A principal causa de LRA no HPN é a liberação de heme atribuída à hemólise intravascular. Um episódio hemolítico agudo associado à hemoglobinúria maciça pode causar um episódio de LRA. Os mecanismos por trás desse fenômeno incluem os seguintes:

- Hipovolemia e isquemia renal.
- Toxicidade direta da hemoglobina livre em células tubulares.
- Deposição glomerular fibrinosa.

- Obstrução tubular por cristais de ácido úrico e cilindros urinários de hemoglobina (produtos da reação de heme com a proteína Tamm-Horsfall THP).

Esta glicoproteína é excretada pelo ramo ascendente espesso da alça de Henle e da primeira parte dos túbulos distais, quando a hemoglobina está presente nos rins devido à hemólise intensa, cristais de ácido úrico e cilindros de hemoglobina urinária são formados com a participação de THP na seção do néfron onde a diluição é máxima (KHALIGHI et al., 2015; WIJEWICKRAMA et al., 2013).

A hemólise crônica também pode ser uma causa de doença renal crônica (DRC), a exposição repetida do epitélio renal à hemoglobina (causada por hemólise crônica e hemoglobinúria) leva a depósitos de hemossiderina progressivamente intensos (hemossiderose) nos túbulos contorcidos proximais e subsequentemente a danos tubulares. A hemossiderina não pode ser excretada por filtração devido ao seu alto peso molecular e sua capacidade de se acumular nas células epiteliais tubulares. A lesão renal, no entanto, pode não ser imediatamente percebida (ZACHEE et al., 1993). Além disso, a trombose microvascular recorrente pode levar à necrose isquêmica do córtex renal, com a conseqüente perda da capacidade do rim de concentrar a urina e diminuir a depuração da creatinina. A DRC também está associada a microinfarto na medula renal, atrofia tubular e fibrose intersticial e é caracterizada por uma deterioração da TFG (AL-HARBI et al., 1998).

### **1.5.1 Heme, citotoxicidade**

Quando os dímeros de hemoglobina são reabsorvidos nos túbulos contorcidos proximais, sua degradação começa resultando na liberação de heme. O excesso de heme livre é altamente tóxico, pois libera ferro oxidado. O ferro liberado, não armazenado como ferritina, é particularmente tóxico, uma vez que sua forma divalente ( $Fe^{+2}$ ) induz não apenas a peroxidação lipídica da membrana, mas também a citotoxicidade através da liberação de lactato desidrogenase (LDH). No citoplasma, o ferro induz a produção de ROS, estas destroem as membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005) e induzem a apoptose de células epiteliais tubulares (ZAGER; FOERDER, 1992). Além disso, o ferro causa inflamação e dano ao rim que se manifesta como fibrose (YUSTE et al., 2015).

O heme, sendo uma molécula lipofílica, tem a capacidade de se intercalar na membrana celular, afetando as bicamadas e organelas lipídicas (como mitocôndrias e núcleos)

e desestabilizando o citoesqueleto. O ferro catalisa a oxidação dos componentes da membrana celular, causando a oxidação dos ingredientes e a formação de radicais peróxidos com efeitos tóxicos (NATH, 2008). Resíduos de ácidos graxos insaturados de fosfolipídios, que são caracterizados por uma alta sensibilidade à oxidação, são particularmente vulneráveis aos efeitos dos ROS; devido à presença de grandes quantidades de radicais superóxido, aparecem lesões de membrana (MARNETT, 1999). O heme livre também pode causar inflamação e, portanto, causar danos nos rins. Nas células epiteliais do túbulo proximal, o heme resulta na ativação do fator de transcrição Fator Nuclear kappa B (NF-kappa B). O NF-kappa B desempenha um papel central no controle da inflamação. Como resultado da ativação do fator NF-kappa B, a inflamação pode se desenvolver no interespaço entre os túbulos (nefrite intersticial) (NELSON et al., 2004). Portanto, o processo inflamatório é induzido pela ativação do NF-kappa B, pelo aumento do estresse oxidativo, pela produção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos (BAUGE et al., 2008). O heme também pode induzir apoptose de células epiteliais de túbulos contorcidos proximais. A hemoxigenase-1 é um importante regulador da apoptose em vários modelos que descrevem a lesão renal, incluindo isquemia e reperfusão renal (TRACZ; ALAM; NATH, 2007).

Juntamente com a inflamação, as células endoteliais são estimuladas para formar novos vasos na área da lesão. Os fibroblastos são ativados por IL-13 e TGF-beta (Transforming Growth Factor beta), para produzir matriz extracelular e contribuir para o processo de cicatrização. Finalmente, as células epiteliais proliferam e a regeneração do tecido danificado está completa (GRANDE; PÉREZ-BARRIOCANAL; LÓPEZ-NOVOA, 2010). Quando as reações inflamatórias se tornam repetitivas, observa-se a ativação crônica e contínua dos fibroblastos, o que resulta na produção descontrolada e no acúmulo de matriz extracelular, o que finalmente leva à formação de fibrose.

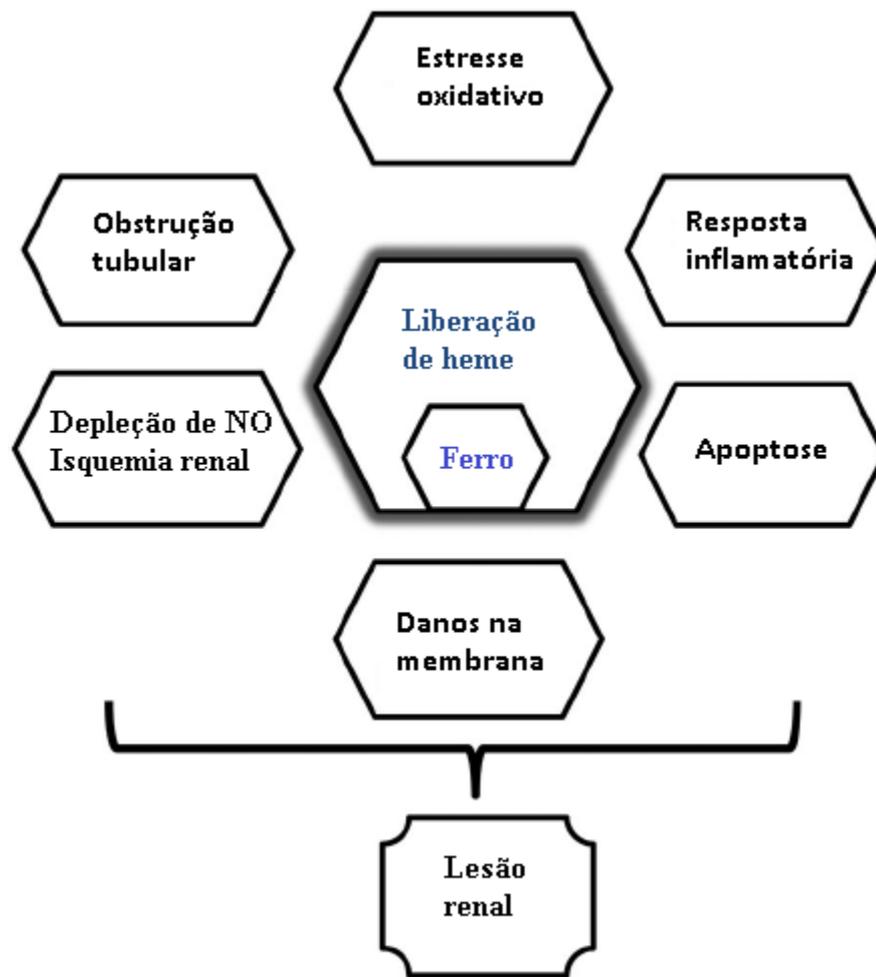
O óxido nítrico (NO) é o principal regulador do tônus vascular. Níveis normais de NO levam a dilatação dos vasos sanguíneos e aumento do fluxo sanguíneo (DENNINGER; MARLETTA, 1999). Durante a hemólise intensa, os eritrócitos liberam a arginase no plasma. A arginase converte a L-arginina em ornitina, reduzindo assim a fonte primária de produção e síntese de NO. O acúmulo de hemoglobina livre no plasma reduz drasticamente os níveis de NO. O óxido nítrico reage irreversivelmente com a hemoglobina livre e produz NO<sub>3</sub> e metemoglobina. A redução do NO<sub>3</sub>, devido à sua união com o heme, leva à vasoconstrição, que é mais pronunciada na medula renal. O fenômeno acima resulta em uma redução do fluxo sanguíneo para os rins que causa hipóxia grave e prolongada que eventualmente leva à necrose tubular (HEYMAN; FUCHS; BREZIS, 1995).

A redução do NO também pode resultar na diminuição da ativação da guanilato ciclase citosólica solúvel (sGC) e diminuição dos níveis de cGMP (guanosina monofosfato cíclico), que perturbam a regulação do tônus do músculo liso causando a distonia (com múltiplos sintomas subseqüentes), como hipertensão sistêmica e pulmonar, disfagia, espasmo esofágico, dor retroesternal, dor abdominal atípica e disfunção erétil (principalmente em crise hemolítica). A diminuição dos níveis de cGMP também pode levar à ativação e agregação de plaquetas, promovendo a formação de coágulos (ROTHER et al., 2005).

### **1.5.2 Mecanismos de defesa contra a lesão renal no HPN**

Em um relato de caso de LRA por HPN, foi observada uma infiltração acentuada de macrófagos expressando CD163 no interstício renal em áreas com depósitos de ferro, sugerindo um possível papel desse receptor de hemoglobina em resposta à hemólise maciça. A absorção da hemoglobina pelos receptores CD163 não apenas atenua os efeitos tóxicos da hemoglobina livre, mas também induz várias respostas anti-inflamatórias, incluindo a liberação de interleucina 10 (IL-10) e a síntese de HO-1 (BALLARIN et al., 2011).

Sabe-se que o excesso de heme intracelular é citotóxico nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e sua degradação é mediada por HO. HO-1 é a isoforma indutível de HO e sua expressão aumenta rapidamente com a exposição a proteínas contendo heme, alguns estudos mostraram que a expressão da enzima HO-1 é induzida pelas células renais como uma resposta adaptativa, a fim de proteger essas células contra os efeitos tóxicos do heme (KOKORIS et al., 2018). Em pacientes com HPN, uma forte indução de HO-1 em células tubulares renais foi observada, esta indução representa uma resposta adaptativa que permite a degradação do heme. O HO-1 é um regulador que participa do catabolismo do heme, levando à geração de quantidades equimolares de ferro, biliverdina e CO, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). HO-1, CO e biliverdina são moléculas protetivas com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. A biliverdina redutase converte a biliverdina em bilirrubina dentro do ciclo redox da biliverdina/bilirrubina, o que permite a neutralização das ROS. O ferro liberado é armazenado como ferritina nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e é detectado como hemossiderina devido à apoptose das células tubulares nas seções histológicas do rim de pacientes com HPN (KOKORIS et al., 2018; NATH, 2006).



**Figura 4.** Esquema representativo dos mecanismos de lesão renal na HPN (KOKORIS et al., 2018).

### 1.6 Marcadores de função renal

Os parâmetros disponíveis atualmente na avaliação da função renal, como creatinina sérica e taxa de filtração glomerular estimada através do clearance de creatinina apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Não são capazes de prever alterações renais em seus primeiros estágios, pois se alteram apenas quando o dano renal torna-se extensivo e em grande parte irreversível (MORI; NAKAO, 2007; SUNDARAM et al., 2011).

Baseado na creatinina sérica, o diagnóstico da lesão renal ocorre somente na fase de diminuição da filtração glomerular e aumento da creatinina sérica, quando já ocorreu um maior grau de lesão renal, com redução de pelo menos 30% da TFG. Após queda abrupta da TFG, há um atraso de dias para o aumento da elevação da creatinina sérica. Da mesma forma, após início da recuperação da filtração glomerular, a queda da creatinina sérica também é

tardia (SLOCUM; HEUNG; PENNATHUR, 2012). A creatinina é o marcador sorológico padrão utilizado para detectar LRA. Sendo produzida nas células musculares. Diariamente, cerca de 1-2% de creatinina é produzida no organismo. Essa concentração pode variar de acordo com a massa muscular. É filtrada livremente no glomérulo e parcialmente secretada ativamente, sendo utilizada na estimação da taxa de filtração glomerular (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Sua análise é econômica e a molécula mostra boa estabilidade química na rotina clínica. No entanto, demonstra marcantes limitações. A piora da função renal é classicamente detectada por meio dos níveis de creatinina sérica, que é, então, utilizada para estimar a TFG com aplicação de diferentes abordagens matemáticas. A determinação da medida da depuração da creatinina é realizada pelos níveis da creatinina no sangue e na urina, cujos métodos mais utilizados para verificação destes níveis são os ensaios enzimáticos (PERES et al., 2013).

As concentrações de creatinina sérica não se alteram até que uma quantidade significativa da função renal já tenha sido perdida, quando já ocorreu um maior grau de lesão renal com redução de pelo menos 30% da TFG, o que significa que a lesão renal já estava presente ou ocorreu antes que a creatinina sérica estivesse elevada. Em curto prazo, ureia e creatinina sérica mostram baixa sensibilidade e especificidade para a detecção de lesão renal (FASSETT et al., 2011; URBSCHAT; OBERMULLER; HAFERKAMP, 2011).

Na LRA, a excreção fracionada de sódio é o teste de triagem mais preciso para diferenciar entre origem pré-renal da intrarrenal. Um valor abaixo de 1% sugere doença pré-renal. Em contrapartida, entre pacientes com doença renal crônica, uma doença pré-renal coexistente pode não resultar em uma baixa concentração de sódio urinário ou excreção fracionada de sódio (URBSCHAT; OBERMULLER; HAFERKAMP, 2011).

A determinação de microalbuminúria é definida como a excreção de albumina entre 30 e 300mg/24h ou 20-200mcg/min, ou em duas determinações separadas por um intervalo superior a três meses. Amostras de urinas isoladas podem ser utilizadas como triagem; em caso de alterações, deve ser confirmada através de uma coleta casual ou de 24h (ZELMANOVITZ et al., 1997). É comumente empregada no diagnóstico precoce de lesão renal, pois precede os demais parâmetros utilizados. Entretanto, não é capaz de distinguir os diferentes tipos de lesão, e nem prevê a progressão da doença, impossibilitando seu uso na monitorização da resposta terapêutica.

Os biomarcadores séricos e urinários atualmente em uso não são sensíveis ou específicos para a detecção de danos renais, limitando as opções terapêuticas e potencialmente comprometendo o prognóstico. Os biomarcadores mais recentes prometem a identificação

precoce dos pacientes com risco de LRA, diagnosticam antes que os testes convencionais, indicam a necessidade de iniciar terapia de substituição renal e prever o risco de progressão para DRC (BIHORAC et al., 2014; HAASE et al., 2009). O objetivo é que, com essa abordagem e as intervenções mais apropriadas, os resultados dos pacientes possam ser melhorados. A disponibilidade destes novos biomarcadores e a avaliação de combinações simultâneas de biomarcadores funcionais e danos teciduais podem ajudar a estratificar os pacientes em 4 subgrupos: nenhuma alteração nos biomarcadores, apenas alterações nos biomarcadores funcionais, apenas alterações nos biomarcadores de danos ou alterações nos dois biomarcadores funcionais e de danos. Essa nova abordagem permite a identificação de uma nova categoria de pacientes, denominada "LRA subclínica" e representada por aumento de marcadores de dano sem perda simultânea da função renal. Com base nesta nova estrutura conceitual, uma modificação dos critérios do KDIGO tem sido recomendada para incorporar o uso de marcadores de danos renais, além da creatina sérica, TFG e diurese (LOMBI et al., 2016).

Essa nova abordagem foi reconhecida e incorporada nas definições de LRA das diretrizes de prática regional da Austrália e Nova Zelândia, sem esclarecer que tipo de biomarcador usar ou seu valor de corte (LANGHAM et al., 2014).

### **1.6.1 Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1)**

A molécula de injúria renal (KIM-1), também conhecida como T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) receptor-1 celular do vírus da hepatite A (HAVCR-1), é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1 com um domínio de imunoglobulina e mucina, com um ectodomínio contendo um domínio do tipo imunoglobulina 6-cisteína, dois sítios de N-glicosilação e um domínio de mucina (ICHIMURA et al., 1998). KIM-1 não é detectável no tubo proximal em condições fisiológicas, mas é expresso em grandes quantidades em lesões renais e áreas fibróticas, que sofrem uma regulação positiva nos túbulos proximais após lesões isquêmicas e nefrotóxicas. Após lesão tubular, o ectodomínio de KIM-1 é clivado por metaloproteinases e armazenado em células in vitro e in vivo são encontradas na urina de roedores e humanos (ICHIMURA et al., 2004; VAIDYA et al., 2006).

Níveis elevados de KIM-1 urinário serão detectados numa coorte de 201 pacientes hospitalizados com LRA e esteve associado com o prognóstico desfavorável (morte e necessidade para diálise) em pacientes com LRA (LIANGOS et al., 2007).

Embora o gene KIM-1, ou a expressão da proteína seja indetectável no rim normal,

após uma injúria no tecido, mRNA- KIM-1 e sua proteína são rapidamente sintetizados e localizadas em níveis muito elevados na membrana apical do túbulo proximal, sendo encontrada nos três seguimentos do túbulo (URBSCHAT; OBERMULLER; HAFERKAMP, 2011).

### **1.6.2 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)**

A proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1/CCL2) é um membro da família de quimiocinas C-C e um potente fator quimiotático para monócitos. MCP-1 é a primeira quimiocina CC humana descoberta. Localizada no cromossomo 17 (ch.17, q11.2), a MCP-1 humana é composta de 76 aminoácidos e é secretada em duas formas predominantes, com pesos moleculares semelhantes de 9 e 13kDa. Tem o mesmo núcleo de proteína e difere pela adição de carboidratos (JIANG et al., 1990). Apesar da diferença, possui atividades in vitro idênticas (Jiang Y, et al., 1992). O MCP pertence a uma família composta por pelo menos quatro membros (MCP-1, -2, -3 e -4) (VAN COILLIE; VAN DAMME; OPDENAKKER, 1999).

A MCP-1 é produzida por diversos tipos de células, incluindo as células endoteliais, células epiteliais, do músculo liso, fibroblastos, células mesangiais, astrócitos e micróglias; no entanto, os monócitos e os macrófagos são a fonte principal de MCP-1 (DESHMANE et al., 2009), regulando a migração e infiltração de monócitos, eosinófilos, basófilos, células T de memória, NK e Kupffer (LOETSCHER et al., 1996). Apresenta também outros efeitos de células-alvo, como liberação de enzimas, expressão de moléculas de adesão e liberação de histamina (MELGAREJO et al., 2009). É importante observar que a MCP-1 é um dos membros mais estudados da família de quimiocinas e foi demonstrado ser um possível ponto de intervenção para o diagnóstico e tratamento de várias doenças, incluindo a esclerose múltipla (SORENSEN et al., 2004), artrite reumatoide (HAYASHIDA et al., 2001), aterosclerose (KUSANO et al., 2004) e diabetes resistente à insulina (SARTIPY; LOSKUTOFF, 2003).

Os principais indutores da expressão de MCP-1 são IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Outras citocinas, como IL-4, IFN- $\alpha/\beta$ , M-CSF, GM-CSF, PDGF, TGF- $\beta$ , produtos exógenos, como lipopolissacarídeos (LPS), vírus, e complexos imunes pode ser também indutores potentes. Em contraste, ácido retinóico, glucocorticóides e estrógeno inibem a expressão de MCP-1 (SUNG et al., 2002).

A detecção de MCP-1 em tecidos renais saudáveis e não saudáveis iniciou-se em 1995.

No início, observou-se uma fraca marcação de MCP-1 nas células epiteliais tubulares em comparação a detecção na nefropatia membranosa, nefropatia por IgA, e glomeruloesclerose, havendo uma correlação com infiltração de macrófagos (PRODJOSUDJADI et al., 1995).

A MCP-1 relaciona-se com a presença de micro e macroalbuminúria (WADA et al., 2000) e sua expressão é induzida em doenças com inflamação, tais como nefropatia diabética, estudos em humanos mostram que a acumulação de macrófagos no rim está associada com o desenvolvimento de lesão renal, fibrose e declínio da função renal, sugerindo uma doença renal mediada por mecanismos inflamatórios (TESCH, 2008). Nessa doença, a principal fonte de MCP-1 são os túbulos corticais (CHOW et al., 2006). O acúmulo de macrófagos e miofibroblastos em torno dos túbulos estão associados com a lesão tubular, em resposta a elevados níveis de glicose e aos produtos finais da glicolisação (BURT et al., 2007; GU et al., 2006; TARABRA et al., 2009) levando ao agravamento da função renal (CHOW et al., 2004). Em modelos animais foi observada uma redução da glomeruloesclerose após o uso de antagonistas MCP-1/CCR2, sugerindo o papel de MCP-1 na progressão da doença. Esses achados também sugerem novas possibilidades terapêuticas (KANAMORI et al., 2007) mais específicas no tratamento dessas doenças.

Tem sido demonstrado que aumentos na expressão tubular de MCP-1 estiveram fortemente associados à infiltração de monócitos e fibrose no interstício em pacientes com nefrite lúpica, sugerindo que a MCP-1 participa da patogênese do dano tubulointersticial, uma vez que recruta monócitos e produz fibrose do interstício. Os resultados de vários estudos reforçam o papel da MCP-1 urinária como um biomarcador da atividade da doença no lúpus renal, com produção mínima ou indetectável de MCP-1 no tecido renal de indivíduos sem envolvimento renal. (BARBADO et al., 2010; KIANI et al., 2009; MARKS et al., 2008).

Na crise hemolítica da anemia falciforme (AF) a fração heme liberada é pró-inflamatória, e indutora de MCP-1 (NATH et al., 2001), promovendo uma lesão vascular (TRACZ; ALAM; NATH, 2007). Finalmente, o transporte de heme através da barreira de filtração glomerular expõe o endotélio e podócitos a metabolitos com efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos, prejudicando assim a permeabilidade seletiva glomerular e causando proteinúria (BELCHER et al., 2010; GONZALEZ-MICHACA et al., 2004).

Um estudo de 50 pacientes com doença falciforme mostrou níveis aumentados de MCP-1 urinária em comparação com um grupo controle, observando que os níveis de NO podem ser importantes indicadores de associação entre lesão da membrana celular glomerular e tubular e estado oxidativo do rim (DOS SANTOS et al., 2015).

O aumento dos níveis de MCP-1, também foi observado durante a nefrite intersticial

na leishmaniose visceral, demonstrando a importância de estes biomarcadores na caracterização dos processos inflamatórios que envolvem os mecanismos de lesão renal (MENESES, G.C., 2017). Todas as evidências clínicas e modelos experimentais demonstraram que o MCP-1 desempenha funções críticas no desenvolvimento de doenças renais (AMANN; TINZMANN; ANGELKORT, 2003; WADA et al., 2000). Estudos recentes apontam um importante papel da MCP-1 em alterações não só glomerulares, mas também do dano tubular renal (ENDO et al., 2016).

A disponibilidade de novos biomarcadores de LRA pode facilitar a detecção precoce de danos nos rins, permitindo assim o tratamento que pode impedir a progressão para mais avançadas de disfunção renal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o papel de novos biomarcadores de função renal não convencionais em pacientes com HPN.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar os parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPN, e comparar com grupo controle sadio.
- Avaliar marcadores de disfunção renal e os níveis de uKIM-1 e uMCP-1 como novos biomarcadores no grupo HPN vs. Controle.
- Detectar e investigar possíveis mecanismos fisiopatológicos da lesão renal na HPN, baseado nas alterações dos novos biomarcadores de lesão renal.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Desenho e local do estudo**

Trata-se de um estudo transversal de caso-controle, observacional e analítico com pacientes adultos com diagnóstico de HPN, diagnosticada por citometria de fluxo em amostras de sangue periférico, em acompanhamento no ambulatório de HPN e AA do serviço de hematologia no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza, Ceará, no período de março de 2017 a março de 2018.

O estudo foi realizado em Fortaleza - Ceará, nos Ambulatórios de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e com a colaboração de pesquisadores do Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDT) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### **3.2 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos pacientes adultos ( $\geq 18 \leq 60$  anos) de ambos os sexos com diagnóstico confirmado de HPN, depois de concordar em participar do estudo.

Os critérios de exclusão foram:

- Pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 ou 2, hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg) e/ou insuficiência cardíaca.
- Pacientes que tenham sido submetidos a transplante renal ou MO.
- Pacientes com nefrolitíase, DRC prévia ou infecção do trato urinário.
- Pacientes co-infectados com HIV dentre outras doenças infecciosas agudas também foram excluídos.

#### **3.3 População do estudo**

Foram estudados 17 pacientes com diagnóstico de HPN. Foram coletadas amostras de sangue e urina dos pacientes e analisados parâmetros clínicos e laboratoriais. Os pacientes foram avaliados no ambulatório de hematologia do HUWC. Treze pacientes foram classificados como HPN clássicos e quatro como HPN associados a AA, de acordo com os

critérios de classificação propostos pelo I-PIG. Quatorze dos pacientes têm tratamento específico com o anticorpo monoclonal eculizumabe na dose de 900 mg a cada 14 +/- 2 dias, com períodos de ausência de tratamento específico por falta de medicação no estoque hospitalar. Os restantes três pacientes têm tratamento inespecífico com hemocomponentes, reposição de ferro e folatos via oral, juntamente com anticoagulantes orais, se necessário. Além disso, um grupo controle composto por 13 voluntários sadios foi adicionado para comparação com o grupo HPN.

### **3.4 Coleta de dados e processamento das amostras biológicas**

Os pacientes com HPN que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), recebendo as devidas orientações a respeito do estudo. A coleta de dados dos prontuários clínicos e amostras de sangue e urina, foram realizados no serviço de hematologia do HUWC. Foram coletados no mínimo 10 mL de urina em pote coletor estéril, entregue ao paciente diagnosticado com HPN e ao grupo controle após assinatura do TCLE. A urina foi então centrifugada a 1000g por 15 minutos para a remoção do sedimento urinário, incluindo células e dendritos. O sobrenadante urinário foi aliqotado para posterior quantificação da creatinina urinária, eletrólitos urinários, albuminúria, proteinúria e dos novos biomarcadores renais. As alíquotas foram congeladas a -80°C após coleta até o dia das análises. O sangue venoso foi coletado em tubos BD Vacutainer® com ativador de coágulo e gel separador para separação e obtenção de soro em tubos com EDTA para hemograma. Após da coleta, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos para obtenção do soro. As amostras de soro também foram aliqotadas e congeladas a -80°C para análises bioquímicas e quantificação de novos biomarcadores a nível sistêmico.

### **3.5 Análises laboratoriais**

Hemograma e contagem de reticulócitos foram realizados com o sistema automatizado de hematologia XT-4000i™ - Sysmex; dosagens séricas de ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), potássio (mEq/L), sódio (mEq/L), cálcio (mEq/L), cloro (mEq/L), desidrogenase láctica LDH (U/L), bilirrubina total e frações (mg/dL), ácido úrico, albumina (g/dL) globulinas (g/dL), transaminase glutâmico-oxalacética TGO (U/L), transaminase glutâmico-pirúvica TGP (U/L), fosfatase alcalina (U/L), ferro (ug/dL), índice de saturação de transferrina IST (%),

capacidade total de ligação do ferro CTLF (ug/dL), capacidade latente de ligação do ferro CLLF (ug/dL), foram feitos com o equipamento de química clínica CMD 800iX1-Wiener lab., os níveis de ferritina (ng/dL) foram calculados com o sistema de Imunoensaio IMMULITE 2000 XPi – SIEMENS.

### 3.6 Análise da função renal

Para análise da função renal o ritmo de filtração glomerular (TFGe) foi estimado usando a fórmula CKD-EPI “*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*” (LEVEY et al., 2009), que é baseada na dosagem de creatinina sérica (Cr):

- *Para mulheres com creatinina <0,7mg/dL (62mmol):*  

$$\text{TFG} = 144 \times (\text{Cr}/0,7)^{-0.329} \times (0,993)^{\text{idade}}$$
- *Para mulheres com creatinina >0,7mg/dL (62mmol):*  

$$\text{TFG} = 144 \times (\text{Cr}/0,7)^{-1.209} \times (0,993)^{\text{idade}}$$
- *Para homens com creatinina <0,9mg/dL (80mmol):*  

$$\text{TFG} = 141 \times (\text{Cr}/0,9)^{-0.411} \times (0,993)^{\text{idade}}$$
- *Para homens com creatinina >0,9mg/dL (80mmol):*  

$$\text{TFG} = 141 \times (\text{Cr}/0,9)^{-1.209} \times (0,993)^{\text{idade}}$$

Além disso, foram feitas dosagens bioquímicas na urina para avaliação clínica da função tubular e glomerular. Para a função tubular, foram calculadas a fração de excreção de sódio, potássio e cloreto, onde utiliza os valores quantificados dos eletrólitos no soro e na urina através do analisador eletrodo íon seletivo (9180, Analisador de eletrólitos, Roche ®).

*Fração de excreção de sódio, potássio e cloreto:*

$$\text{FENa}^+ = (\text{UNa}^+ \cdot \text{PNa}^+) / (\text{Ucr} \cdot \text{Pcr}) \times 100$$

$$\text{FEK}^+ = (\text{UK}^+ \cdot \text{PK}^+) / (\text{Ucr} \cdot \text{Pcr}) \times 100$$

$$\text{FECl}^+ = (\text{UCl}^+ \cdot \text{PCl}^+) / (\text{Ucr} \cdot \text{Pcr}) \times 100$$

Onde:

UNa<sup>+</sup>, UK<sup>+</sup> e UCl<sup>+</sup>: Concentração urinária de sódio, potássio e cloreto(mEq/L)

PNa<sup>+</sup>, PK<sup>+</sup> e PCl<sup>+</sup>: Concentração plasmática de sódio, potássio e cloreto (mEq/L)

Ucr e Pcr: Concentração urinária e plasmática de creatinina (mg/dL)

### **3.7 Parâmetros de disfunção renal**

Para a função glomerular, além do TFGe foram avaliados a proteinúria e albuminúria nos grupos. A proteinúria foi quantificada através de método colorimétrico, pela reação com o vermelho de pirogalol. Nessa reação, o vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido (urina) desenvolve um cromóforo de cor azul, com o máximo de absorção em 600 nm. A absorbância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra (Labtest).

Para determinação quantitativa de albumina na urina (albuminúria) foi utilizado o ensaio imunoturbidimétrico. Nesse ensaio anticorpos anti-albumina reagem com o antígeno (albumina) na amostra de urina e formam complexos albumina/anti-albumina aglutinados. Estes complexos são quantificados através da turbidimetria, método de espectrofotometria que é capaz de medir a redução da transmissão de luz em um meio causado pela turbidez de uma amostra, que nesse caso aumenta quanto maior for a concentração de albumina e conseqüentemente de complexos formados. O equipamento utilizado para análise foi o Cobas C111, Roche ®.

Além disso, a creatinina urinária também foi mensurada no Cobas C111, Roche ®. Todos os marcadores clínicos urinários, bem como os novos biomarcadores renais urinários avaliados no presente estudo, tiveram seus valores ajustados pelo valor da creatinina urinária, eliminando o viés da diferença de concentração urinária entre as amostras dos pacientes (MENESES, G.C., 2017; WAIKAR; SABBISSETTI; BONVENTRE, 2010). A proteinúria e a albuminúria foram expressas em “mg/g-Creatinina”.

### **3.8 Quantificação dos novos biomarcadores renais subclínicos**

Os novos biomarcadores renais subclínicos (KIM-1, MCP-1) foram quantificados a partir de alíquotas específicas das amostras separadas no dia da coleta. Para todas essas quantificações foi utilizada a técnica do ELISA, um ensaio imunoenzimático de alta

sensibilidade e especificidade. Kits comerciais de ELISA foram adquiridos da marca R&D Systems ® (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), onde foram seguidos o protocolo do fabricante para o kit de MCP-1 (R&D Systems, DuoSet ELISA DY279-05) e para o kit de KIM-1 (R&D Systems, DuoSet ELISA DY1750B). Para amostras de urina, a concentração dos biomarcadores urinários foi corrigida pelos níveis de creatinina urinária (WAIKAR; SABBISSETTI; BONVENTRE, 2010). Todos os kits de ELISA foram do tipo sanduíche, um método mais rápido e eficaz. Os valores foram expressos em pg/mcg de creatinina urinária (MENESES, G.C., 2017).

### **3.9 Análise Estatística**

As variáveis quantitativas foram testadas para determinar se seguem uma distribuição normal ou não, usando o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis distribuídas normalmente ou quase normais foram relatadas como a média  $\pm$  desvio padrão, e para dados não-normais como mediana e amplitude interquartil. O teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney foram aplicados para comparar médias ou medianas de variáveis contínuas de acordo a distribuição dos dados entre grupos controle saudáveis e pacientes com HPN. As correlações entre os novos biomarcadores renais e parâmetros clínicos foram avaliadas através da correlação de Pearson ou pelo Rho de Spearman, conforme apropriado (NAYAK; HAZRA, 2011; SIMPSON; JOHNSON; AMARA, 1988).

A análise estatística foi realizada com o software Python 3.6 para Windows e os pacotes NumPy 1.14.0, SciPy 1.0.0 (Python Software Foundation). Os gráficos foram feitos usando o pacote Matplotlib 2.2.3 (Python Software Foundation).

### **3.10 Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará; CAAE: 79307517.6.0000.5045 (ANEXO 1). Os pacientes receberam informações sobre a importância da pesquisa e conforme aceitação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 2) por escrito para participação na pesquisa. O anonimato foi garantido e assegurado; a confidencialidade, privacidade, proteção da imagem, garantindo a utilização das informações em benefício das pessoas e utilizadas apenas no âmbito deste estudo.

### 3.11 Descarte do material biológico

O descarte do material biológico foi realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 4.9.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características demográficas, clínicas e laboratoriais do grupo HPN e controle

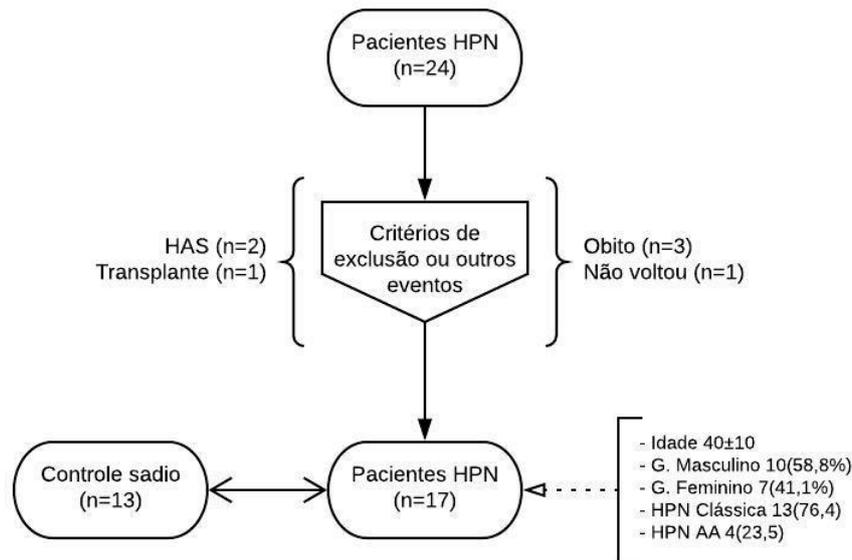
No período do estudo, tiveram diagnóstico confirmado por citometria de fluxo 24 pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna. Contudo após critérios de exclusão foram incluídos e acompanhados um total de 17 pacientes. Entre os pacientes excluídos (n=7), dois apresentaram hipertensão arterial ou diabetes mellitus, os resultados laboratoriais de tres pacientes estavam incompletos devido à falta de reagentes em laboratório, não foi possível repetir o teste porque esses pacientes entraram em crise hemolítica devido à ausência de tratamento específico (eculizumabe) e morte subsequente, um paciente foi submetido a transplante de células-tronco hematopoéticas, e outro não retornou às consultas subsequentes (Figura 5).

A média de idade foi de  $40,2 \pm 10,8$  anos (variação 25 a 59), a idade dos pacientes no momento do diagnóstico da doença foi de  $33,7 \pm 6,3$  anos (variação 26 a 2), sendo 7 (41,18%) sexo feminino. De acordo com as recomendações do I-PIG, 13 (76,47%) pacientes apresentavam HPN clássico e 4 (23,52%) apresentavam HPN AA. O tempo médio de diagnóstico (em meses) foi de  $85,25 \pm 84,15$  meses. A partir da data do diagnóstico, 7 (41%) pacientes apresentaram eventos trombóticos associados à doença.

Entre os pacientes estudados com HPN, 14 (82,3%) dos pacientes têm tratamento específico com o anticorpo monoclonal eculizumabe na dose de 900 mg a cada 14 +/- 2 dias, com períodos de ausência de tratamento específico por falta de medicação no estoque hospitalar. Os restantes 3 (17,6%) pacientes têm tratamento inespecífico com hemoderivados, reposição de ferro e folatos, juntamente com anticoagulantes orais, se necessário (Tabela 1A, 1B).

Em relação à avaliação quanto ao desenvolvimento de LRA, nenhum dos pacientes estudados apresentou lesão renal de acordo com os critérios da Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) (KELLUM; LAMEIRE, 2013). Entretanto, eles apresentaram

distúrbios hematológicos significativos (diminuição da hemoglobina, hematócrito, reticulócitos e plaquetas) com altos níveis de lactato desidrogenase (LDH), acima do limite superior normal, que se traduz como crises hemolíticas de gravidade diferente.



**Figura 5.** Fluxograma da população de estudo com a quantidade de pacientes que foram excluídos e o grupo de controle com o qual foi comparado. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou como número absoluto e porcentagem entre parêntesis. HPN: hemoglobinúria paroxística noturna. AA: anemia aplásica. G: gênero.

A comparação dos pacientes com HPN com o grupo controle mostrou diferença significativa em relação aos níveis de bilirrubina total (1,28 [0,84-1,62] vs. 0,26 [0,21-0,4] mg/dL  $p < 0,001$ ), bilirrubina indireta (1,02 [0,53-1,35] vs. 0,18 [0,08- 0,84] mg/dL  $p = 0,008$ ), albumina ( $4,33 \pm 0,31$  vs.  $4,64 \pm 0,19$  g/dL  $p = 0,002$ ), fosfatase alcalina ( $205,76 \pm 65,57$  vs.  $33,43 \pm 14,18$  U/L  $p < 0,001$ ), cálcio ( $9,51 \pm 0,42$  vs.  $9,1 \pm 0,26$  mEq/l  $p = 0,003$ ), sódio ( $135,82 \pm 3,83$  vs.  $138,62 \pm 3,07$  mEq/l  $p = 0,035$ ), potássio ( $6,03 \pm 1,95$  vs.  $4,35 \pm 0,34$  mEq/l  $p = 0,005$ ), ureia ( $31,24 \pm 7,86$  vs.  $24,77 \pm 5,34$  mg/dL  $p = 0,012$ ) e creatinina ( $0,93 \pm 0,23$  vs.  $0,58 \pm 0,18$  mg/dL  $p < 0,001$ ).

#### 4.2 Avaliação de parâmetros renais e novos biomarcadores

Enquanto dentro dos testes de urina não foi encontrada significância nos níveis de creatinina ou eletrólitos, como potássio, cloro e sódico, mas sim nos níveis de excreção das

frações de sódio ( $0,7\pm 0,37$  vs.  $0,46\pm 0,25$   $p=0,040$ ) e cloro ( $1,05\pm 0,46$  vs.  $0,68\pm 0,42$   $p=0,029$ ); bem como os níveis de proteinúria ( $18,99\pm 16,47$  vs.  $51,67\pm 21,99$  mg/g-Cr  $p<0,001$ ) e albuminúria ( $33,61\pm 52,26$  vs.  $3,81\pm 2,57$  mg/g-Cr  $p=0,032$ ) ajustados à creatinina, além da TFGe ( $95,47\pm 19,08$  vs.  $131,4\pm 22,75$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>  $p<0,001$ ).

Dentro dos dois biomarcadores de lesão renal precoce estudado neste projeto, foram encontrados níveis significativos de MCP-1 urinária ao comparar os pacientes com HPN e os controles sadios ( $76,47$  [27,57-124,65] vs.  $15,3$  [8,66-28,93] ng/g-Cr  $p=0,010$ ). No entanto, não houve significância estatística para o biomarcador KIM-1 urinário quando comparados os dois grupos ( $0,77\pm 0,51$  vs.  $0,7\pm 0,29$   $p=0,652$ ) (Tabela 2).

### **4.3 Correlações entre os biomarcadores renais subclínicos e os parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com HPN**

Na análise de correlações, os níveis dos novos biomarcadores renais foram avaliados quanto à sua associação com parâmetros clínicos tradicionais nos pacientes com HPN.

O MCP-1 urinário (uMCP-1), apresentou correlações positivas com a fração de excreção de sódio ( $r=0,657$ ,  $p=0,004$ ), fração de excreção de cloreto ( $r=0,618$ ,  $p=0,008$ ) e correlação inversa com o ácido úrico ( $r=-0,573$ ,  $p=0,016$ ) (Tabela 3) (Figura 6 e 7).

Em relação aos níveis de KIM-1 urinário (uKIM-1), houve correlação inversa com ureia sérica ( $r=-0,522$ ,  $p=0,032$ ) e correlações positivas com a fração de excreção de sódio ( $r=0,572$ ,  $p=0,016$ ), fração de excreção de cloreto ( $r=0,706$ ,  $p=0,002$ ) (Tabela 3) (Figura 6).

**Tabela 1A.** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).

<b>Dados clínicos e laboratoriais</b>	<b>HPN (n = 17)</b>	<b>Variação (mín. e máx.)</b>	<b>Valores de Referência</b>
Idade (anos)	40,2±10,8	25 a 59	
Idade ao diagnóstico	33,7±6,3	26 a 55	
Gênero feminino (%)	7 (41,18)		
HPN clássica (%)	13 (76,47)		
HPN AA (%)	4 (23,52)		
Pressão sistólica (mmHg)	117,1±13,4	97 a 137	< 140
Pressão diastólica (mmHg)	73,8±24,4	60 a 85	< 90
Tempo de diagnóstico (meses)	85,25±84,15	24 a 318	
Idade ao diagnóstico (anos)	33,7±6,3	20 a 55	
Pacientes com eventos trombóticos	7 (41,18)		
Tratamento com eculizumabe	14 (82,3)		
<b>HEMOGRAMA</b>			
Hematócrito (%)	31,52±6,69	22,9 a 43,8	37 a 47
Hemoglobina (g/dL)	10,27±2,41	7,5 a 15,4	12 a 16
Neutrófilos (por mm <sup>3</sup> )	2307,88±999,43	835 a 4107	1600 a 7000
Leucócitos (por mm <sup>3</sup> )	4097,29±1329,05	2103 a 6845	5000 a 10000
Reticulócitos (%)	3,85±2,04	1,08 a 8,29	0,5 a 1,5
Plaquetas (por mm <sup>3</sup> )	117574±64124	13520 a 258600	150000 a 450000

Dados apresentados como média ± desvio padrão ou como número absoluto e porcentagem entre parêntesis. AA, síndrome mielodisplásico ou anemia aplásica.

**Tabela 1B.** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna (HPN).

Dados clínicos e laboratoriais	HPN (n = 17)	Varição (máx. e mín.)	Valores de Referência
<b>BIOQUIMICA DO SANGUE</b>			
LDH (U/L)	2085±1817	352 a 5929	230 a 460
Ácido úrico (mg/dL)	4,25±1,48	3,3 a 5,8 (H) 2,1 a 7,6 (M)	2,5 a 6,0 (H) 2,0 a 5,0 (M)
Globulina (g/dL)	2,95±0,43	2,1 a 3,5	2,0 a 3,5
Albumina (g/dL)	4,32±0,30	3,8 a 5	3,5 a 4,8
Relação globulina de albumina A/G	1,28±0,65	0,05 a 2,21	>1
Proteínas totais (g/dL)	7,3±0,4	6,1 a 8,2	6,6 a 8,3
TGO (U/L)	60±41	20 a 154 (H) 14 a 92 (M)	< 38 (H) < 32 (M)
TGP (U/L)	33±20	12 a 81 (H) 9 a 44 (M)	< 41 (H) <31 (M)
Ferro sérico (ug/dL)	78±39	49 a 128 (H) 31 a 167 (M)	65 a 175 (H) 50 a 170 (M)
IST (%)	27,2±15,6	6 a 51 (H) 8 a 61 (M)	20 a 50 (H) 15 a 20 (M)
Ferritina (ng/dL)	212,6±240,4	25,5 a 473 (H) 11,1 a 806 (M)	28 a 365 (H) 9 a 148 (M)
CLL-Fe (ug/dL)	237±70	105 a 347	140 a 280
CTL-Fe (ug/dL)	315±45	226 a 395	150 a 450

Dados apresentados como média ± desvio padrão. (H), homens; (M), mulheres; LDH, lactato desidrogenase; TGO, transaminase glutâmico-oxalacética; TGP, transaminase glutâmico-pirúvica; IST, índice de saturação de transferrina; CLL-Fe, capacidade latente de ligação ao ferro; CLT-Fe, capacidade total de ligação ao ferro.

**Tabela 2.** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPN em comparação ao grupo controle.

	<b>HPN (n = 17)</b>	<b>Controle (n=13)</b>	<b>P</b>
Idade (anos)	40±11	31±10	0,003
Sexo (femenino)	7 (41%)	7 (54%)	0,257
<b>SANGUE</b>			
Bilirrubina total (mg/dL)	1,28[0,84-1,62]	0,26[0,21-0,4]	<0,001*b
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,02[0,53-1,35]	0,18[0,08-0,84]	0,008*b
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,26[0,22-0,34]	0,18[0,15-0,38]	0,104 b
Albumina (g/dL)	4,33±0,31	4,64±0,19	0,002*a
Fosfatase alcalina (U/L)	205,76±65,57	33,43±14,18	<0,001*a
Cálcio (mEq/l)	9,51±0,42	9,1±0,26	0,003*a
Fosforo (mEq/l)	3,76±0,51	3,43±0,48	0,077 a
Sódio (mEq/l)	135,82±3,83	138,62±3,07	0,035*a
Potássio (mEq/l)	6,03±1,95	4,35±0,34	0,005*a
Cloro (mEq/l)	103,76±2,61	102,77±1,36	0,189 a
Ureia (mg/dL)	31,24±7,86	24,77±5,34	0,012*a
Ácido Úrico (mg/dL)	4,3[3,1-5,2]	4,1[3,8-5,0]	0,260 b
Creatinina (mg/dL)	0,93±0,23	0,58±0,18	<0,001*a
<b>URINA</b>			
Creatinina (mg/dL)	157,28±92,46	179,57±102,32	0,543 a
Sódio (mEq/l)	132,47±50,17	160,54±52,16	0,149 a
Potássio (mEq/l)	70,74±41,45	62,71±29,7	0,541 a
Cloro (mEq/l)	154,88±48,63	176,85±61,48	0,300 a
Fe Na	0,7±0,37	0,46±0,25	0,040*a
Fe K	7,87±4,56	5,05±2,8	0,057 a
Fe Cl	1,05±0,46	0,68±0,42	0,029*a
Proteinúria (mg/g-Cr)	18,99±16,47	51,67±21,99	<0,001*a
Albuminúria (mg/g-Cr)	33,61±52,26	3,81±2,57	0,032*a
TFGe (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	95,47±19,08	131,4±22,75	<0,001*a

Continua.

**Tabela 2.** Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com HPN em comparação ao grupo controle.

<b>BIOMARCADORES</b>			
uMCP-1 (pg/g-Cr)	76,47[27,57-124,65]	15,3 [8,66-28,93]	0,010*b
uKIM-1 (ng/g-Cr)	0,77±0,51	0,7±0,29	0,652 a

Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, ou ainda como mediana e amplitude interquartil (quartil 1 - quartil 3) para uMCP-1. TFGe, taxa de filtração glomerular estimada pela fórmula CKD-EPI. “g-Cr” ou “mg-Cr”, concentração do biomarcador corrigida pela concentração urinária de creatinina. FE, Fração de excreção. uKIM-1, kidney injury molecule-1 urinário; uMCP-1, monocyte chemotactic protein-1 urinário.\*  $p < 0.05$  comparado ao controle sadio. a Teste T de Student; b Teste U de Mann–Whitney.

Conclusão.

**Tabela 3.** Correlações de Spearman e Pearson entre parâmetros clínicos – laboratoriais e biomarcadores de lesão renal precoce em pacientes com HPN.

	uMCP-1		uKIM-1	
	rho ( $\rho$ )	p	r	p
Hematócrito (%)	-0,135	0,606	-0,196	0.450
Hemoglobina (g/dL)	-0,179	0,491	-0,133	0.611
Neutrófilos (por mm <sup>3</sup> )	-0,385	0,127	-0,003	0.991
Leucócitos (por mm <sup>3</sup> )	-0,370	0,144	-0,300	0.242
Reticulócitos (%)	0,331	0,195	-0,122	0.641
Plaquetas (por mm <sup>3</sup> )	-0,142	0,586	-0,130	0.618
LDH (U/L)	0,071	0,786	0,138	0.597
Bilirrubina total (mg/dL)	-0,267	0,300	0,035	0.895
Bilirrubina indireta (mg/dL)	-0,233	0,368	0,105	0.688
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,341	0,181	0,335	0.189
TGO (U/L)	-0,224	0,387	0,078	0.766
TGP (U/L)	-0,055	0,833	-0,089	0.733
Proteínas Totais (g/dL)	-0,45	0,07	-0,086	0.742
Albumina (g/dL)	-0,168	0,519	0,162	0.533
Globulina (g/dL)	-0,374	0,139	-0,176	0.499
A/G	0,151	0,563	0,273	0.289
Fosfatase alcalina (U/L)	0,027	0,918	-0,031	0.906
Ferro (ug/dL)	-0,235	0,363	-0,017	0.948
IST (%)	-0,020	0,940	0,039	0.882
Ferritina (ng/mL)	-0,125	0,633	-0,277	0.282
CTL – Fe (ug/dL)	-0,229	0,376	-0,079	0.764
CLL – Fe (ug/dL)	-0,083	0,751	-0,053	0.840
Ureia sérica (mg/dL)	-0,454	0,067	-0,522	0.032*
Ácido Úrico (mg/dL)	-0,573	0,016*	-0,311	0.224
Creatinina sérica (mg/dL)	-0,387	0,125	-0,236	0.362
Cálcio sérico (mEq/L)	-0,307	0,230	-0,348	0.171
Fósforo sérico (mEq/L)	-0,135	0,604	0,062	0.812

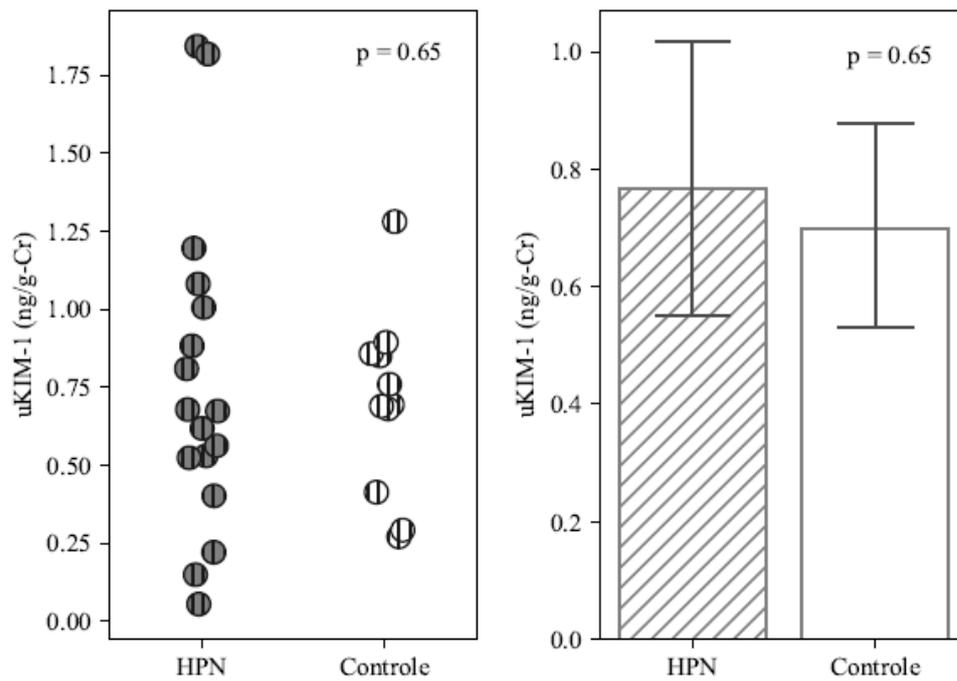
Continua.

**Tabela 3.** Correlações de Spearman e Pearson entre parâmetros clínicos – laboratoriais e biomarcadores de lesão renal precoce em pacientes com HPN.

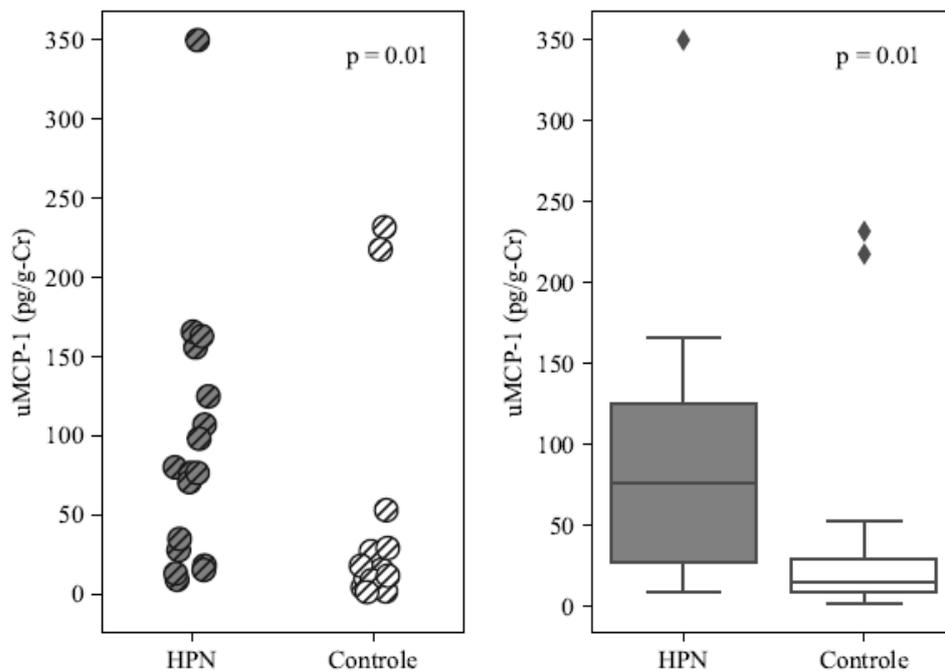
	uMCP-1		uKIM-1	
	rho ( $\rho$ )	p	r	p
Sódio sérico (mEq/L)	-0.143	0.583	-0.123	0.637
Cloro sérico (mEq/L)	0.117	0.654	0.083	0.750
Potássio sérico (mEq/L)	-0.104	0.712	-0.443	0.098
FE – Na	0.657	0.004*	0.572	0.016*
FE – Cl	0.618	0.008*	0.706	0.002*
FE – K	0.475	0.074	0.283	0.307
Creatinina urinária	-0,539	0,026	-0,696	0,002
Proteinúria (mg/g-Cr)	0.353	0.165	0.387	0.124
Albuminúria (mg/g-Cr)	0.015	0.955	0.451	0.069
TFGe (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	0.292	0.256	0.115	0.662

r de Pearson; rho de Spearman; \*Correlações significantes  $p < 0,05$ ; uKIM-1, kidney injury molecule-1 urinária; uMCP-1, monocyte chemotactic protein-1 urinária; LDH, lactato desidrogenase; TGO, transaminase glutâmico-oxalacética; TGP, transaminase glutâmico-pirúvica; A/G relação albumina/globulina; IST, índice de saturação de transferrina; CLL-Fe, capacidade latente de ligação ao ferro; CLT-Fe, capacidade total de ligação ao ferro. FE, Fração de excreção. TFGe, Taxa de filtração glomerular estimado pela fórmula CKD-EPI.

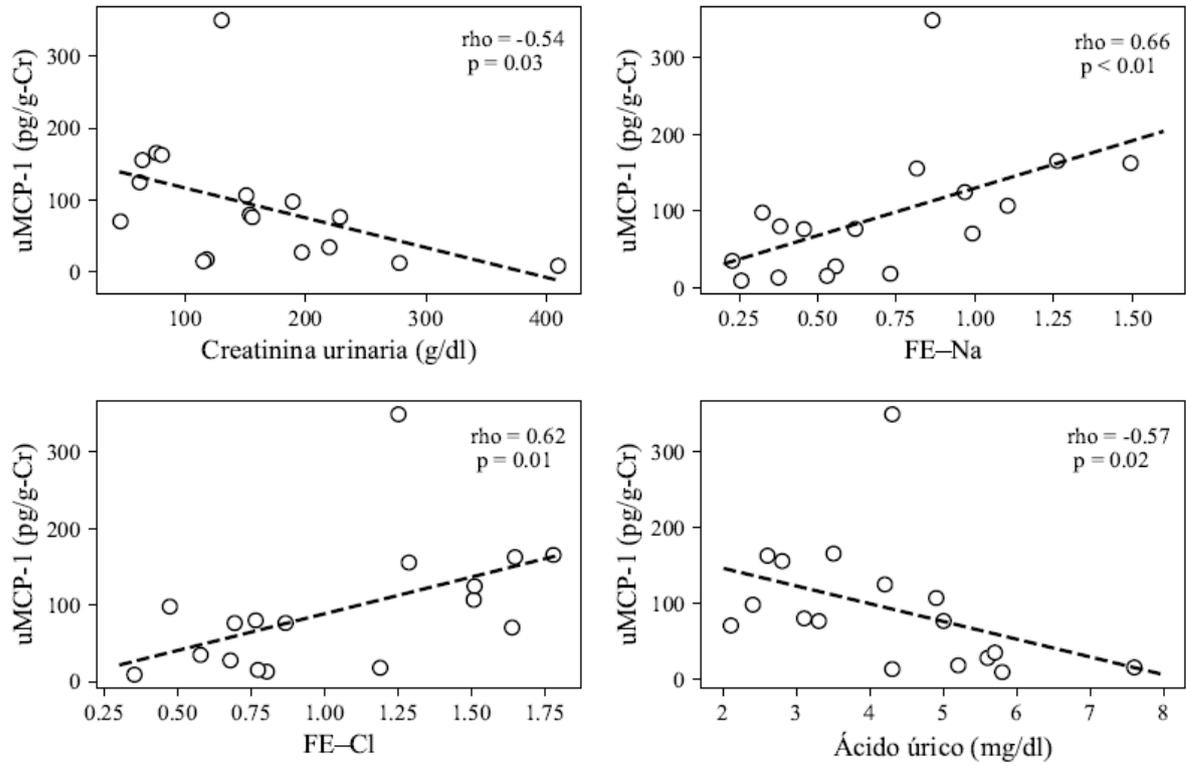
Conclusão.



**Figura 6.** Níveis de KIM-1 urinário (uKIM-1) em pacientes com HPN vs. Controle  $p > 0.05$ . Esquerda: Expresso gráfico como dispersão vertical de dados. Direita: Gráfico de dois níveis médios de uKIM-1 expresso em barras.



**Figura 7.** Níveis de MCP-1 urinário (uMCP-1) em pacientes com HPN vs. Controle  $p < 0.05$ . Esquerda: Expresso gráfico como dispersão vertical de dados. Direita: Gráfico boxplot representando mediana e quartis.



**Figura 8.** Gráficos de dispersão mostrando as correlações significativas do MCP-1 urinário (uMCP-1) com parâmetros renais clínicos. FE-Na, fração de excreção de Na; FE-Cl, fração de excreção.

## 5 DISCUSSÃO

Existem poucos estudos sobre o desenvolvimento renal na HPN, que ademais de ser uma doença rara e de difícil diagnóstico, a progressão para uma lesão renal aguda clinicamente evidente ou laboratorialmente diagnosticável com os marcadores renais tradicionais é sempre tardio, pois segue-se baseando na presença de oligúria ou um incremento gradual da creatinina sérica, retrasando o tratamento e postergando uma possível intervenção precoce e adequada que permita preservar a função renal de estes pacientes.

É em este contexto que o desenvolvimento de biomarcadores para detecção precoce de lesão renal é importante, pois permitiria a estratificação do risco de acordo com novos biomarcadores ou uma combinação deles que poderia ajudar na validação de estratégias preventivas e terapias futuras. Além de um diagnóstico precoce e a melhora da nossa compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados à LRA.

Os estudos que relatam a incidência de LRA na HPN são esporádicos e seus resultados são frequentemente contraditórios. A insuficiência renal tem sido apontada como a causa de morte em 8-18% dos pacientes com HPN (NISHIMURA et al., 2004). Um estudo relata que até 65% dos pacientes com HPN desenvolvem DRC estágios 1-5 e aproximadamente 21% estágios 3-5 (HILLMEN et al., 2010). Outros estudos relatam que a lesão renal é responsável por um aumento de oito vezes na mortalidade em pacientes com HPN (JANG et al., 2016). Apesar de sua frequência, a fisiopatologia da disfunção renal nessa doença ainda não está totalmente clara (KOKORIS et al., 2018).

No presente estudo, não foi detectada doença renal clinicamente evidente nos pacientes com HPN, apesar de apresentar alterações hematológicas significativas compatíveis com períodos de hemólise intravascular (com diminuição dos níveis de hematócrito e hemoglobina e aumento da porcentagem de reticulócitos, bem como a elevação da bilirrubina total e indireta em contraste com o grupo controle).

Na população HPN estudada, houve significância nos valores de albumina, fosfatase alcalina, cálcio, sódio, potássio, ureia e creatinina em relação ao grupo controle (na bioquímica do sangue); bem como um aumento significativo na fração de excreção de sódio e cloro, além de proteinúria e albuminúria ajustada pela creatinina (em testes de urina). Nenhum dos pacientes apresentou TFGe abaixo de 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>.

Quando a hemoglobina está livre no plasma, ela se liga rapidamente à haptoglobina, impedindo a liberação da fração heme e filtrando no glomérulo, quando a haptoglobina se esgota, o excesso de hemoglobina oxida-se em metemoglobina pela ligação à hemopexina.

Este último possui uma forte afinidade pelo grupo heme, formando complexos que são então endocitados e degradados no fígado quando reconhecidos pelos receptores proteicos CD163, expressos em monócitos, macrófagos e hepatócitos. Esses mecanismos evitam os efeitos tóxicos da hemoglobina livre e induzem respostas anti-inflamatórias. A presença e o aumento de receptores CD163 nos macrófagos M2 foram descritos durante a lesão renal aguda por mioglobina durante a rabdomiólise (YUSTE et al., 2015b). Um relato de caso forneceu evidências do papel patogênico da hemoglobina livre na lesão renal túbulo-intersticial por HPN, observando uma forte imunocoloração de macrófagos CD163 em células tubulares com depósitos de hemossiderina (KOKORIS et al., 2018). A expressão de CD163 constituiria um mecanismo de proteção final contra o acúmulo de ferro no tecido renal.

Uma vez excedidos todos os mecanismos nefroprotetores, a degradação e reabsorção dos dímeros de hemoglobina e Fe oxidados nos túbulos contornados proximais, induzem apoptose das células epiteliais tubulares e peroxidação lipídica das membranas, devido à presença de grandes quantidades de ROS, além da citotoxicidade induzida pela LDH durante os períodos de hemólise. O heme livre causa a ativação do NF-kappa B, sugerindo que a inflamação ocorre no espaço inter-tubular. O NF-kappa B é um importante regulador do processo inflamatório que controla a ativação do MCP-1 (YUSTE et al., 2015).

A MCP-1 é uma das principais quimiocinas que regulam a migração e a infiltração de monócitos e macrófagos, é produzido por células epiteliais glomerulares e tubulares durante os processos de lesão renal, seus níveis urinários são o resultado da produção local de MCP-1 pelo rim e não o produto da filtração sérica de MCP-1 (MAARTEN TAAL et al., 2011).

A expressão desse biomarcador é induzida em doenças que ocorrem com processos inflamatórios, como nefropatia diabética, com acúmulo de macrófagos no tecido renal, onde a principal fonte de MCP-1 são os túbulos corticais ou na nefrite lúpica durante lesões tubulo-intersticiais ativas (CHOW et al., 2006; DING et al., 2018). O MCP-1 também foi identificado como um biomarcador preditivo de doença renal na anemia falciforme e sua associação com os efeitos tóxicos do heme livre (DOS SANTOS et al., 2015).

No presente estudo, o MCP-1 foi identificado como potencial biomarcador precoce de lesão renal na HPN, este biomarcador é produzido por diversos tipos de células renais e está envolvido de forma crítica no desenvolvimento de várias doenças renais, sobretudo de glomerulopatias e lesões túbulo-intersticiais com o envolvimento de processos inflamatórios mediados pela ativação de NF-kappa B (KIM; TAM, 2011; NELSON et al., 2004; ROVIN; DOE; TAN, 1996).

Níveis elevados do biomarcador uMCP-1 podem estar associados à lesão renal

subclínica induzida por processos inflamatórios causados pela toxicidade do heme liberado durante episódios hemolíticos agudos e também durante a hemólise crônica com depósitos progressivos de hemossiderina.

Foi avaliada a presença da proteína MCP-1 no rim, através da quantificação dos níveis de MCP-1 urinário. Os níveis de uMCP-1 estiveram significativamente aumentados nos pacientes com HPN em relação ao grupo controle. Esses resultados poderiam ser explicados pelo estado de hemólise intravascular dos pacientes com HPN e suas consequências para o organismo, durante episódios de hemólise aguda associados à hemoglobinúria maciça com a probabilidade de causar um episódio de LRA ou hemólise crônica durante a ausência de tratamento (KOKORIS et al., 2018).

O biomarcador KIM-1 é expresso principalmente em áreas fibróticas e lesões renais nos túbulos proximais após lesões isquêmicas ou nefrotóxicas (ICHIMURA 2004, VAIDYA, 2006). A exposição constante a reações inflamatórias durante crises hemolíticas causa o crescimento da matriz extracelular e a formação de fibrose devido à atividade contínua dos fibroblastos. Este estudo não mostrou níveis significativos de KIM-1 urinário em comparação com o grupo controle. Desde a implementação do tratamento com eculizumab, houve uma diminuição drástica nas complicações e na mortalidade desses pacientes. Esses fatos sugerem fortemente que a principal causa de tromboembolismo clínico é a ativação do complemento e/ou hemólise (NISHIMURA 2018). Embora não seja possível descartar trombose microvascular subclínica, os resultados do KIM-1 urinário sugerem que o tratamento com eculizumabe pode desempenhar um papel nefroprotetor. Evitar eventos isquêmicos devido a trombose microvascular e ativação constante de fibroblastos com subsequente progressão para fibrose intersticial. Um estudo que poderia apoiar essa hipótese são os resultados encontrados por Hillmen et al. onde eles analisaram dados de três ensaios clínicos originais, demonstrando que todos os estágios da DRC eram mais propensos a melhorar a função renal após tratamento prolongado com eculizumabe.

Em resumo, a lesão renal na HPN é uma característica clínica não totalmente compreendida e frequentemente subdiagnosticada. A MCP-1 pode constituir um biomarcador de lesão renal subclínica nesse tipo de paciente. A falta de resultados significativos do KIM-1 pode ser devido à ausência de lesão renal isquêmica.

## 6 CONCLUSÕES

- Não foi observada disfunção renal clinicamente evidente utilizando os marcadores tradicionais de função renal em pacientes com HPN.
- O uMCP-1, parece ser um biomarcador precoce de lesão renal em pacientes HPN.
- Pacientes com HPN podem apresentar danos renais nas células epiteliais do túbulo proximal, devido a processos inflamatórios no espaço túbulo-intersticial, onde uMCP-1 poderia representar um biomarcador útil para a detecção de doença renal subclínica ou assintomática.
- A falta de resultados significativos com o biomarcador uKIM-1 pode ser devido à ausência de lesão renal de origem isquêmica, devido à redução significativa de eventos trombóticos, após o uso de eculizumabe.
- Não foi possível avaliar o efeito do tratamento específico na função renal, devido à falta de continuidade no tratamento com eculizumabe e ao número reduzido de pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ALASHKAR, F. et al. Serologic response to meningococcal vaccination in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) chronically treated with the terminal complement inhibitor eculizumab. **Annals of hematology**, v. 96, n. 4, p. 589–596, abr. 2017.
- AL-HARBI, A. et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Renal Failure. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 9, n. 2, p. 147–151, 1 abr. 1998.
- ALLHORN, M. et al. Processing of the lipocalin alpha(1)-microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1894–1901, 15 mar. 2002.
- AMANN, B.; TINZMANN, R.; ANGELKORT, B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. **Diabetes care**, v. 26, n. 8, p. 2421–2425, ago. 2003.
- ANDRESEN, M. et al. [**Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria presenting as acute renal failure**]. [s.l: s.n.]. v. 117
- ARATEN, D. J.; THALER, H. T.; LUZZATTO, L. High incidence of thrombosis in African-American and Latin-American patients with Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. **Thromb Haemost**, v. 93, n. 01, p. 88–91, 14 dez. 2017.
- ARRUDA, M. M. DE A. S. et al. Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, p. 214–221, 2010.
- BALLARIN, J. et al. Acute renal failure associated to paroxysmal nocturnal haemoglobinuria leads to intratubular haemosiderin accumulation and CD163 expression. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 26, n. 10, p. 3408–3411, out. 2011.
- BARBADO, J. et al. **MCP-1 in urine as biomarker of renal lupus in absence of cytokines, interferon- $\gamma$  and growth factors**. [s.l: s.n.]. v. 6
- BAUGE, C. et al. NFkappaB mediates IL-1beta-induced down-regulation of TbetaRII through the modulation of Sp3 expression. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 5A, p. 1754–1766, out. 2008.
- BELCHER, J. D. et al. Heme Degradation and Vascular Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 233–248, 15 jan. 2010.
- BESSLER, M.; HIKEN, J. The Pathophysiology of Disease in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **ASH Education Program Book**, v. 2008, n. 1, p. 104–110, 1 jan. 2008.
- BIHORAC, A. et al. Validation of cell-cycle arrest biomarkers for acute kidney injury using clinical adjudication. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 189, n. 8, p. 932–939, 15 abr. 2014.
- 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. 78, n. 4, p. 211–230, 2010.

BOTELHO, R. J. et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria with renal, infective and immunological abnormalities. **Postgraduate Medical Journal**, v. 57, n. 673, p. 736–738, 1981.

BRODSKY, R. A. et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 114, n. 3, p. 459–466, 2000.

BRODSKY, R. A. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6522, 25 jun. 2009.

BRODSKY, R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2804, 30 out. 2014.

BUNN, H. F.; JANDL, J. H. Exchange of heme among hemoglobin molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, n. 3, p. 974–978, set. 1966.

BURT, D. et al. The Monocyte Chemoattractant Protein-1/Cognate CC Chemokine Receptor 2 System Affects Cell Motility in Cultured Human Podocytes. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 6, p. 1789–1799, dez. 2007.

CHAPIN, J. et al. The role of complement activation in thrombosis and hemolytic anemias. **Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis**, v. 54, n. 2, p. 191–198, abr. 2016.

CHOW, F. et al. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. **Kidney international**, v. 65, n. 1, p. 116–128, jan. 2004.

CHOW, F. Y. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. **Kidney international**, v. 69, n. 1, p. 73–80, jan. 2006.

CHRISTENSEN, E. I. et al. Renal handling of albumin in normal rat [3] (multiple letters). **Kidney International**, v. 57, n. 3, p. 1207–1209, 2000.

CLARK, D. A. et al. The kidneys in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 57, n. 1, p. 83–89, 1981.

DACIE JV. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Sangre**, v. 25, p. 890–895, 1980.

DE 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, 2015.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the  $\cdot\text{NO}/\text{cGMP}$  signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2, p. 334–350, 5 maio 1999.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, jun. 2009.

DOS SANTOS, T. E. DE J. et al. Monocyte chemoattractant protein-1: a potential biomarker of renal lesion and its relation with oxidative status in sickle cell disease. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 54, n. 3, p. 297–301, mar. 2015.

ENDO, N. et al. Urinary soluble CD163 level reflects glomerular inflammation in human lupus nephritis. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 31, n. 12, p. 2023–2033, dez. 2016.

FASSETT, R. G. et al. Biomarkers in chronic kidney disease: A review. **Kidney International**, v. 80, n. 8, p. 806–821, 2011.

FORMAN, K. et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. A clinicopathological study of 26 cases. **Acta haematologica**, v. 71, n. 4, p. 217–226, 1984.

FRANCO DE CARVALHO, R. et al. Detection of somatic mutations of the PIG-A gene in Brazilian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 34, n. 6, p. 763–766, jun. 2001.

GALILI, N. et al. Prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) cells in patients with myelodysplastic syndromes (MDS), aplastic anemia (AA), or other bone marrow failure (BMF) syndromes: Interim results from the EXPLORE trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 15\_suppl, p. 7082–7082, 20 maio 2009.

GBUREK, J. et al. Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 13, n. 2, p. 423–430, fev. 2002.

GONZALEZ-MICHACA, L. et al. Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 286, n. 2, p. F370–377, fev. 2004.

GRANDE, M. T.; PÉREZ-BARRIOCANAL, F.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 7, p. 19–19, 2010.

GU, L. et al. Role of receptor for advanced glycation end-products and signalling events in advanced glycation end-product-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in differentiated mouse podocytes. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 21, n. 2, p. 299–313, fev. 2006.

HAASE, M. et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 54, n. 6, p. 1012–1024, dez. 2009.

- HALL, S. E.; ROSSE, W. F. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 87, n. 12, p. 5332–5340, 1996.
- HAYASHIDA, K. et al. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. **Arthritis Research**, v. 3, n. 2, p. 118–126, 2001.
- HEYMAN, S. N.; FUCHS, S.; BREZIS, M. The role of medullary ischemia in acute renal failure. **New horizons (Baltimore, Md.)**, v. 3, n. 4, p. 597–607, nov. 1995.
- HILL, A. et al. The Incidence and Prevalence of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and Survival of Patients in Yorkshire. **Blood**, v. 108, n. 11, p. 985, 16 nov. 2006.
- HILL, A. et al. Under-recognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. **British journal of haematology**, v. 158, n. 3, p. 409–414, ago. 2012.
- HILL, A. et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, p. 17028, 18 maio 2017.
- HILL, A.; KELLY, R. J.; HILLMEN, P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 121, n. 25, p. 4985–4996, 2013.
- 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.
- HILLMEN, P. et al. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **American journal of hematology**, v. 85, n. 8, p. 553–559, ago. 2010.
- HILLMEN, P. et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **British journal of haematology**, v. 162, n. 1, p. 62–73, jul. 2013.
- ICHIMURA, T. et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 7, p. 4135–4142, 13 fev. 1998.
- ICHIMURA, T. et al. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 286, n. 3, p. F552–563, mar. 2004.
- JACKSON, G. H. et al. Severe haemolysis and renal failure in a patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Journal of clinical pathology**, v. 45, n. 2, p. 176–177, fev. 1992.
- JANG, J. H. et al. Predictive Factors of Mortality in Population of Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): Results from a Korean PNH Registry. **Journal of Korean medical science**, v. 31, n. 2, p. 214–221, fev. 2016.
- JARVA, H.; MERI, S. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: the disease and a hypothesis for a new treatment. **Scandinavian journal of immunology**, v. 49, n. 2, p. 119–125, fev. 1999.

JIANG, Y. et al. Post-translational modification of a monocyte-specific chemoattractant synthesized by glioma, osteosarcoma, and vascular smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 30, p. 18318–18321, 1990.

JOSE, M. D.; LYNN, K. L. Acute renal failure in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Clinical nephrology**, v. 56, n. 2, p. 172–174, ago. 2001.

KANAMORI, H. et al. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 360, n. 4, p. 772–777, 7 set. 2007.

KELLUM, J. A.; LAMEIRE, N. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). **Critical care (London, England)**, v. 17, n. 1, p. 204, 4 fev. 2013.

KHALIGHI, M. A. et al. Intratubular hemoglobin casts in hemolysis-associated acute kidney injury. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 65, n. 2, p. 337–341, fev. 2015.

KIANI, A. N. et al. Urine osteoprotegerin and monocyte chemoattractant protein-1 in lupus nephritis. **The Journal of rheumatology**, v. 36, n. 10, p. 2224–2230, out. 2009.

KIM, M. J.; TAM, F. W. K. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in renal disease. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 23–24, p. 2022–2030, 20 nov. 2011.

KIRKIZLAR, O. et al. Acute renal failure in a patient with severe hemolysis. **International urology and nephrology**, v. 39, n. 2, p. 651–654, 2007.

KOKORIS, S. I. et al. Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an update on clinical features, pathophysiology and treatment. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, p. 1–9, 28 fev. 2018.

KUSANO, K. F. et al. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 68, n. 7, p. 671–676, jul. 2004.

LANGHAM, R. G. et al. KHA-CARI guideline: KHA-CARI adaptation of the KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 19, n. 5, p. 261–265, maio 2014.

LAU, K. K.; AULT, B. H. A child with recurrent episodes of dark urine: Answer. **Pediatric Nephrology**, v. 21, n. 4, p. 471, 2006.

LEVEY, A. S. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of internal medicine**, v. 150, n. 9, p. 604–612, 5 maio 2009.

LIANGOS, O. et al. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 18, n. 3, p. 904–912, mar. 2007.

LOETSCHER, M. et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function,

and expression in activated T-lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 3, p. 963–969, 1 set. 1996.

LOMBI, F. et al. Biomarkers in acute kidney injury: Evidence or paradigm? **Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia**, v. 36, n. 4, p. 339–346, ago. 2016.

MARKS, S. D. et al. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 is predictive of poor renal prognosis in pediatric lupus nephritis. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 23, n. 11, p. 3521–3526, nov. 2008.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation research**, v. 424, n. 1–2, p. 83–95, 8 mar. 1999.

MELAMED-FRANK, M. et al. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3693–3698, 15 dez. 2001.

MELGAREJO, E. et al. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 5, p. 998–1001, maio 2009.

MENESES, G. C. **Relação entre marcadores tradicionais de função renal e a proteína Monócitos-1 (MCP-1) urinária em pacientes com hanseníase**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.

MENESES, G.C., M., A. M. C. **Investigação de novos biomarcadores renais em pacientes com Leishmaniose visceral**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, dez. 2017.

MILLER, Y. I.; SHAKLAI, N. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1454, n. 2, p. 153–164, 7 jul. 1999.

MIYATA, T. et al. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5099, p. 1318–1320, 26 fev. 1993.

MOORAKI, A. et al. Acute reversible renal failure in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Clinical nephrology**, v. 50, n. 4, p. 255–257, out. 1998.

MORADO, M. et al. Diagnostic screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Prospective multicentric evaluation of the current medical indications. **Cytometry. Part B, Clinical cytometry**, v. 92, n. 5, p. 361–370, set. 2017.

MORI, K.; NAKAO, K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. **Kidney international**, v. 71, n. 10, p. 967–970, maio 2007.

NAIR, R. K. et al. Spectrum of renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: report of three cases and a brief review of the literature. **International urology and nephrology**, v. 40, n. 2, p. 471–475, 2008.

NATH, K. A. et al. Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 3, p. 893–903, mar. 2001.

NATH, K. A. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and

other tissues. **Kidney international**, v. 70, n. 3, p. 432–443, ago. 2006.

NATH, K. A. Preservation of the kidney by carbon monoxide: a black swan phenomenon. **Kidney international**, v. 74, n. 8, p. 989–991, out. 2008.

NAYAK, B. K.; HAZRA, A. How to choose the right statistical test? **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 59, n. 2, p. 85–86, 2011.

NELSON, D. E. et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5696, p. 704–708, 22 out. 2004.

NIELSEN, M. J.; MOESTRUP, S. K. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. **Blood**, v. 114, n. 4, p. 764–771, 23 jul. 2009.

NISHIMURA, J.-I. et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. **Medicine**, v. 83, n. 3, p. 193–207, maio 2004.

NOMURA, M. L. et al. Hemoglobinúria paroxística noturna e gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, p. 579–582, 2004.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 199–211, 15 jan. 2005.

PARKER, C. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3699–3709, 1 dez. 2005.

PARKER, C. J. Update on the diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2016, n. 1, p. 208–216, 2 dez. 2016.

PERES, L. A. B. et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 35, p. 229–236, 2013.

PRODJOSUDJADI, W. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. **Clinical nephrology**, v. 44, n. 3, p. 148–155, set. 1995.

PU, J. J.; BRODSKY, R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from bench to bedside. **Clinical and translational science**, v. 4, n. 3, p. 219–224, jun. 2011.

RACHIDI, S.; MUSALLAM, K. M.; TAHER, A. T. A closer look at paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **European journal of internal medicine**, v. 21, n. 4, p. 260–267, ago. 2010.

ROSSE, W. F. Variations in the red cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **British journal of haematology**, v. 24, n. 3, p. 327–342, mar. 1973.

ROSSE, W. F. et al. The erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis. **British journal of haematology**, v. 79, n. 1, p. 99–107, set. 1991.

ROSSE, W. F.; DACIE, J. V. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal

hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. **Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 5, p. 736–748, maio 1966.

ROTHER, R. P. et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 293, n. 13, p. 1653–1662, 6 abr. 2005.

ROTHER, R. P. et al. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1256–1264, nov. 2007.

ROVIN, B. H.; DOE, N.; TAN, L. C. Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 27, n. 5, p. 640–646, maio 1996.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 7265–7270, 10 jun. 2003.

SHIBASAKI, T.; MATSUDA, H.; FURUYA, K. Haptoglobin therapy during pregnancy for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with renal failure. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 98, n. 3, p. 267–268, 25 abr. 2007.

SIMPSON, R. J.; JOHNSON, T. A.; AMARA, I. A. The box-plot: An exploratory analysis graph for biomedical publications. **American Heart Journal**, v. 116, n. 6, Part 1, p. 1663–1665, 1 dez. 1988.

SLOCUM, J. L.; HEUNG, M.; PENNATHUR, S. Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine? **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 159, n. 4, p. 277–289, abr. 2012.

SOCIE, G. et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. **Lancet (London, England)**, v. 348, n. 9027, p. 573–577, 31 ago. 1996.

SOCIE, G. et al. Changing prognosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria disease subcategories: an analysis of the International PNH Registry. **Internal medicine journal**, v. 46, n. 9, p. 1044–1053, set. 2016.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 329–337, 2007.

SORENSEN, T. L. et al. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. **European journal of neurology**, v. 11, n. 7, p. 445–449, jul. 2004.

SUNDARAM, N. et al. Biomarkers for early detection of sickle nephropathy. **American journal of hematology**, v. 86, n. 7, p. 559–566, jul. 2011.

SUNG, F. L. et al. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. **Kidney international**, v. 62, n. 4, p. 1160–

1170, out. 2002.

TARABRA, E. et al. Effect of the monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine receptor 2 system on nephrin expression in streptozotocin-treated mice and human cultured podocytes. **Diabetes**, v. 58, n. 9, p. 2109–2118, set. 2009.

TESCH, G. H. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 294, n. 4, p. F697-701, abr. 2008.

TRACZ, M. J.; ALAM, J.; NATH, K. A. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 18, n. 2, p. 414–420, fev. 2007.

TSAI, C.-W. et al. Acute renal failure in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Kidney international**, v. 71, n. 11, p. 1187, jun. 2007.

URBSCHAT, A.; OBERMULLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 16 Suppl 1, p. S22-30, jul. 2011.

VAIDYA, V. S. et al. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 290, n. 2, p. F517-529, fev. 2006.

VAN COILLIE, E.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 10, n. 1, p. 61–86, mar. 1999.

VILLEGAS, A. et al. Consenso español para el diagnóstico y tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna. **Medicina Clínica**, v. 146, n. 6, p. 278.e1-278.e7, 2016.

WADA, T. et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. **Kidney international**, v. 58, n. 4, p. 1492–1499, out. 2000.

WAIKAR, S. S.; SABBISSETTI, V. S.; BONVENTRE, J. V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. **Kidney international**, v. 78, n. 5, p. 486–494, set. 2010.

WIJEWICKRAMA, E. S. et al. Acute tubular necrosis in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 24, n. 1, p. 105–108, jan. 2013.

YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. P. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little PIG-A goes “Why? Why? Why?” **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 5, p. 637–641, 1 set. 2000.

YUAN, X. et al. Small-molecule factor D inhibitors selectively block the alternative pathway of complement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. **Haematologica**, v. 102, n. 3, p. 466–475, mar. 2017.

YUSTE, C. et al. Pathogenesis of glomerular haematuria. **World Journal of Nephrology**, v. 4, n. 2, p. 185–195, 6 maio 2015.

ZACHEE, P. et al. Chronic renal failure due to renal hemosiderosis in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Clinical nephrology**, v. 39, n. 1, p. 28–31, jan. 1993.

ZAGER, R. A.; FOERDER, C. A. Effects of inorganic iron and myoglobin on in vitro proximal tubular lipid peroxidation and cytotoxicity. **The Journal of clinical investigation**, v. 89, n. 3, p. 989–995, mar. 1992.

ZEIDMAN, A. et al. Hemolysis-induced acute renal failure in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Nephron**, v. 66, n. 1, p. 112, 1994.

ZELMANOVITZ, T. et al. The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy. **Diabetes care**, v. 20, n. 4, p. 516–519, abr. 1997.

## ANEXOS

### Anexo 1



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Novos biomarcadores de função renal não convencionais em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna.

**Pesquisador:** Juan Daniel Zuñiga Pro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 79307517.6.0000.5045

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Walter Cantídio/ Universidade Federal do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.426.004

##### Apresentação do Projeto:

O projeto será desenvolvido durante o mestrado em Ciências Médicas e será orientado pela profa. Dra Elizabeth De Francesco Daher. Trata-se de um estudo transversal com pacientes adultos com diagnóstico de HPN por citometria de fluxo, em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio. O estudo será realizado nos Ambulatórios de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), o processamento das

mostras de soro e urina serão feitas no Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais da faculdade de Medicina da UFC. A amostra será composta por 20 pacientes com HPN em acompanhamento no ambulatório do HUWC. O grupo controle será composto de 20 indivíduos sem HPN e sem histórico de doença renal. Os pacientes com HPN que preencherem os critérios de inclusão serão convidados a participar do estudo e assinarão o TCLE. Para a coleta de dados dos prontuários clínicos e amostras de sangue e urina, serão realizados no serviço de hematologia do HUWC. No grupo controle também será aplicado o TCLE e os dados clínico-epidemiológicos serão obtidos através de um questionário e do prontuário médico e também será colhida uma amostra de soro e de urina para quantificação dos diversos marcadores bioquímicos e de função renal.

- Cronograma: O estudo terminará em Março de 2018 (data da defesa da dissertação).

- Orçamento: R\$ 1.700,00 financiado pelo edital do CNPQ 478509/2014-0.

**Endereço:** Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290  
**Bairro:** RodolfoTeófilo **CEP:** 60.430-370  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3368-8613 **Fax:** (85)3281-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

## Anexo 2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**  
**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**Título da Pesquisa: Novos biomarcadores de função renal não convencionais em pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna.**

Está sendo desenvolvido pelo pesquisador Juan Daniel Zuñiga Pro sob a orientação da professora Elizabeth De Francesco Daher, médica nefrologista, professora do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará.

Prezado (a) participante,

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos. Este estudo pretende avaliar alterações na função de seus rins. Trata-se de uma pesquisa de observação, significando que seu tratamento não será alterado de forma alguma pela sua participação na pesquisa.

Para tanto peço autorização para que o você participe deste estudo.

Ao participar desta pesquisa você será convidado a responder algumas questões que buscam caracterizar o ambiente que você vive, seu passado médico e medicações em uso. Também serão coletado dados da sua história como exames laboratoriais anteriores, dados sobre sua doença e por seguinte será coletada uma amostra de sangue (5ml – uma colher de sopa) e uma amostra de urina (5ml – uma colher de sopa) que serão armazenadas para posterior realização de exames. Esses exames que serão realizados não são da prática médica do dia a dia e tem a finalidade de avaliar lesões nos rins em estágios bem iniciais.

A amostra de sangue será processada e guardada uma amostra de soro (sangue sem as células). Essa amostra de soro e de urina serão guardadas em um congelador especial (-80°C) e será utilizada para a pesquisa da qual você está fazendo parte.

O material armazenado será identificado por código, sendo mantido o seu sigilo e o seu acesso ao material guardado será garantido através do contato com o pesquisador que encontra-se abaixo.

Após um período de seis meses, o material será descartado de forma apropriada. Essas amostras pertencem a você e apenas ficarão sob nossa guarda durante o período necessário para realizar a pesquisa. Lembramos que a sua participação é voluntária, você tem a liberdade de não querer participar, e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado a resposta dos questionários, sem nenhum prejuízo para você.

Haverá risco mínimo para você ao participar dessa pesquisa. Poderá sentir desconforto durante a picada da agulha para a coleta do sangue e qualquer constrangimento será evitado mantendo-se o sigilo da sua pessoa.

A sua participação possibilitará o levantamento de informações sobre a sua saúde e favorecerá o estabelecimento de estratégias para melhorar o atendimento prestado nessa instituição.

As informações serão utilizadas em trabalhos, divulgadas em congressos ou publicadas em revista científica, sem permitir que você seja identificado. Acredita-se que a realização deste estudo terá como benefícios a melhoria da qualidade da assistência nesta instituição, atendendo-o de forma individualizada, conforme as reais necessidades do paciente.

Você poderá ter acesso às informações e poderá tirar dúvidas sobre este trabalho em qualquer momento. Você terá a liberdade de desistir de participar, sem que isso lhe cause problemas no seu acompanhamento na instituição. Caso o Sr (a) aceite participar da pesquisa NÃO receberá pagamento ou gratificação pela participação no estudo. Este termo será realizado em duas vias, permanecendo uma com o (a) senhor (a) e outra com o pesquisador.

Estaremos à disposição para dar informações sobre o nosso trabalho. Caso o senhor (a) precise entrar em contato com a gente, nosso endereço e telefone estão abaixo:

**CONTATOS DO RESPONSÁVEL PELA PESQUISA:** Aluno pesquisador, Juan Daniel Zuñiga Pro (85) 996710694, Professora Dra. Elizabeth Daher (orientadora da pesquisa) Universidade Federal do Ceará – Depto de Medicina Clínica (85) 3366-8589, (85) 99909-6881.

Hospital Universitário Walter Cantídio, Rua Capitão Francisco Pedro 1290 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE (85) 33668589.

#### TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, portador (a) da cédula de identidade \_\_\_\_\_, declaro que, após leitura detalhada do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** em participar voluntariamente desta pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do participante	Assinatura do responsável pela coleta de dados	DIGITAL
Assinatura da testemunha (Se o voluntário não souber ler)	Assinatura do Pesquisador	