

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE
VITÓRIA – EMESCAM

FLÁVIA VIEIRA DE FREITAS

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Vitória
2014

FLÁVIA VIEIRA DE FREITAS

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória como requisito parcial para obtenção do grau de médico.

Orientadora: Dr^a Síbia Soraya Marcondes

Vitória
2014

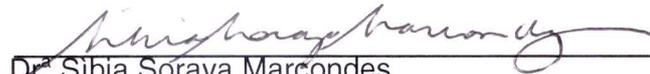
FLÁVIA VIEIRA DE FREITAS

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória como requisito parcial para obtenção do grau de médico.

Aprovada em 27 de Março de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Dr^a Sibia Soraya Marcondes

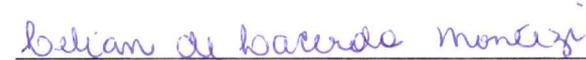
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM

Orientadora



Dr^a Anísia Carla Zucoloto Loureiro Novaes

Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM



Dr^a Leliana Lacerda Montezi

Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM

DEDICATÓRIA

À minha família, especialmente à Míriam Jubé e Carolina Jubé, que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis.

À Camilo Coelho pela paciência e compreensão enquanto tive que me dedicar aos estudos.

À Carolina, Flávio, Sebastião e Sebastião Neto com muito carinho, in memoriam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, rocha firme em quem busquei força e inspiração.

Aos professores e colegas de jornada, que foram na realidade grandes mestres e auxiliares em minha evolução acadêmica e pessoal.

Especialmente à professora Síbia Soraya pela paciência, perseverança e por acreditar na execução deste trabalho.

“Dá-me da Sabedoria que partilha do vosso trono. Ela sabe o que vos é agradável e o que se conforma às vossas ordens. Fazei-a pois descer do vosso santo céu e envia-a do trono da vossa glória. Para que junto de mim tome parte em meus trabalhos e para que eu saiba o que vos agrada. Ela sabe e conhece todas as coisas; prudentemente guiará meus passos e me protegerá no brilho de sua glória. Amém.”

Salomão Jedidias

RESUMO

A anemia hemolítica autoimune (AIHA), é uma doença rara, porém de curso rápido e muitas vezes fatal. Pode ser definida como uma reação autoimune contra autoantígenos eritrocitários, gerando hemólise, predominantemente extravascular, que pode variar de acordo com a capacidade dos autoanticorpos em fixar o sistema complemento. Foram revisados neste trabalho os principais mecanismos etiológicos envolvidos no desencadeamento da AIHA, a saber: os autoantígenos ocultos, a ativação policlonal de células B e/ou T, o mimetismo molecular, os erros de tolerância central e periférica e os distúrbios imunorregulatórios. Foi revisada a classificação das AIHA, de acordo com o tipo de imunoglobulina envolvida, definindo-as em quentes ou frias, sua amplitude térmica e a identificação de doenças subjacentes, definindo-as em AIHA primárias ou secundárias. Este trabalho revisou também os principais métodos diagnósticos empregados, tanto para as definições laboratoriais de uma anemia hemolítica, quanto para definição de autoimunidade e subtipo de AIHA. Foi destacado neste rol o principal teste que avalia os processos patológicos autoimunes, o teste da antiglobulina direta, e suas variações, como os testes poliespecíficos, monoespecíficos e o teste de Donath-Landsteiner. No centro do raciocínio para os diagnósticos diferenciais devem estar as desordens imunoproliferativas, as doenças infecciosas e as demais doenças autoimunes. O tratamento padrão e as últimas tecnologias envolvidas na terapêutica da AIHA também foram abordados, desde o uso da terapia padrão-ouro como os glicocorticoides, passando pela esplenectomia até o emprego atual do rituximabe. A AIHA é uma doença muitas vezes subdiagnosticada pela sua baixa frequência na população geral, porém assusta médicos e demais profissionais da saúde por seu curso clínico abrupto, intenso, de elevada mortalidade, pela ótima resposta à terapêutica inicial e pela nefasta recorrência após algum tempo de tratamento.

Palavras-chave: Anemia hemolítica autoimune. AIHA por anticorpos quentes. AIHA por anticorpos frios. Hemolisina de Donath-Landsteiner. Teste de antiglobulina direta.

ABSTRACT

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is a rare disease, but has a rapid and life-threatening clinical course. The AIHA can be defined as an autoimmune reaction against erythrocyte autoantigens, leading to hemolysis, predominantly extravascular hemolysis, which varies according its ability to fix the complement system on the erythrocyte's surface. Were revised in this work the main etiologic mechanisms involved in development of AIHA, known as: the ignored or cryptic self-antigens, polyclonal B and/or T cell activation, molecular mimicry, errors in central or peripheral tolerance, and immunoregulatory disturbances. Has been studied the classification of AIHA, according to the subtype of immunoglobulin involved, defining them in warm, cold and mixed AIHA, the thermal amplitude and the identification of underlying diseases, classifying them in idiopathic AIHA or secondary AIHA. This work also revised the main laboratorial diagnostic methods employees, as for a laboratorial definition of a hemolytic anemia, as for the definition of autoimmunity and AIHA subtype. It was emphasizing the main diagnostic test that evaluates the pathologic autoimmune process, de direct antiglobulin test, and its variations, like the polyspecific, monospecific and the Donath-Landsteiner test. The reasoning for differential diagnosis must be, at first, the immunoproliferative disorders, the infectious diseases and the autoimmune connective tissue diseases. The standard therapeutic and the last technologies implicates in treatment of AIHA also been reported, since the gold-standard therapy like glucocorticoids, passing through splenectomy, until the use of Rituximab. AIHA is an underdiagnosed disease because it is a population low frequency disease, however intimidates doctors and health professionals for its abrupt and intense clinical course, with high mortality, for its good initial therapeutic response and finally for its malign recurrence after some weeks of treatment in mostly cases.

Key-words: Autoimmune hemolytic anemia. Warm AIHA. Cold AIHA. Donath-Landsteiner hemolysin. Direct Antiglobulin Test.

LISTA DE QUADROS

Título	Página
Quadro 1: Classificação das anemias hemolíticas autoimunes	26
Quadro 2: Fisiopatologia das DIAIHA	38
Quadro 3: Exames solicitados na investigação inicial das anemias, suas funções e resultados esperados na AIHA	46
Quadro 4: Esferócitos	47
Quadro 5: Hemólise vista ao microscópio	47
Quadro 6: Macrófago com hemácias em roseta	47
Quadro 7: Teste de antiglobulina direto	48
Quadro 8: Teste de antiglobulina indireto	49

LISTA DE TABELAS

Título	Página
Tabela 1: As 20 causas mais frequentes de WAIHA e seu percentual em relação à uma amostra de 1749 pacientes com AIHA (excluindo os 85 casos de aloimunização materno-fetal e síndrome hemolítico-urêmica – SHU):	29
Tabela 2: As 20 causas mais frequentes de CAS e seu percentual em relação à uma amostra de 1749 pacientes com AIHA (excluindo os 85 casos de aloimunização materno-fetal e SHU):	30
Tabela 3: As 10 causas mais frequentes de MAIHA e seu percentual em relação à uma amostra de 1749 pacientes com AIHA (excluindo os 85 casos de aloimunização materno-fetal e SHU):	31
Tabela 4: Análise da frequência de DIAIHA em relação aos fármacos entre os anos de 1969-2008:	32
Tabela 5: Relação entre subclasses de autoanticorpos IgG e severidade de hemólise:	34
Tabela 6: Diferenças entre autoanticorpos benignos e patológicos:	36
Tabela 7: Sintomatologia da síndrome anêmica em relação à gravidade da anemia:	40
Tabela 8: Sinais e sintomas mais frequentes em 175 pacientes com AIHA em um hospital em Bangalore – Índia:	41
Tabela 9: A interpretação do DAT 'split':.....	49
Tabela 10: Comparação entre anticorpos na CAS e PCH:	53

SUMÁRIO

Título	Página
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Etiologia da AIHA	15
2.1.1 Os autoantígenos ocultos	15
2.1.2 Ativação policlonal de células B e/ou T	17
2.1.3 O mimetismo molecular	18
2.1.4 Falhas de tolerância central e periférica na maturação linfocitária ...	19
2.1.4.1 Falhas de tolerância central e periférica de linfócitos B	19
2.1.4.2 Falhas de tolerância central e periférica de linfócitos T	22
2.1.5 Distúrbios imunorregulatórios	24
2.2 Classificação e epidemiologia	25
2.2.1 Anemia hemolítica autoimune por anticorpos quentes (WAIHA)	27
2.2.2 Anemia hemolítica autoimune por anticorpos frios(CAIHA)	29
2.2.2.1 Síndrome das crioaglutininas (CAS)	29
2.2.2.2 Hemoglobinúria paroxística ao frio (PCH)	30
2.2.3 Anemia hemolítica autoimune do tipo misto (MAIHA)	31
2.2.4 Anemia hemolítica autoimune induzida por fármacos (DIAIHA)	31
2.3 Fisiopatologia	32
2.3.1 AIHA desencadeada por autoanticorpos IgG	33
2.3.2 AIHA desencadeada por autoanticorpos IgM	35
2.3.3 O sistema inativador de C3	36
2.3.4 Hemolisina fria de Donath-Landsteiner	37
2.3.5 A fisiopatologia das AIHA desencadeadas por fármacos	37
2.3.6 Fisiopatologia da hemólise imunomediada na AIHA	39
2.4 Diagnóstico	40
2.4.1 Manifestações clínicas	40
2.4.1.1 Comportamento clínico das WAIHA	41
2.4.1.2 Comportamento clínico das CAIHA	42

2.4.1.2.1 A síndrome das crioaglutininas	42
2.4.1.2.2 A hemoglobinúria paroxística ao frio (PCH)	43
2.4.1.3 Comportamento clínico das MAIHA	43
2.4.1.4 Comportamento clínico das DIAIHA	44
2.4.2 A investigação laboratorial	45
2.4.2.1 Os exames iniciais na triagem diagnóstica	45
2.4.2.2 A detecção laboratorial de autoimunidade	47
2.4.2.3 Os exames específicos para o diagnóstico do tipo de AIHA	50
2.4.2.4 Perfil laboratorial das WAIHA	51
2.4.2.5 Perfil laboratorial das CAIHA	51
2.4.2.5.1 Perfil laboratorial da CAS	51
2.4.2.5.2 Perfil laboratorial da PCH	52
2.4.2.6 Perfil laboratorial da MAIHA	53
2.4.2.7 Perfil laboratorial da DIAIHA	53
2.5 Diagnóstico diferencial	54
2.5.1 A AIHA e as anemias hemolíticas hereditárias	54
2.5.2 A AIHA e os distúrbios linfoproliferativos	55
2.5.3 A AIHA e outras doenças autoimunes	56
2.5.4 A AIHA e as doenças infecciosas	56
2.5.5 A AIHA e outras neoplasias não hematológicas	57
2.6 Tratamento	57
2.6.1 A AIHA de início agudo, medidas emergenciais	57
2.6.2 Mecanismos de ação gerais das terapias utilizadas	58
2.6.3 Tratamento da WAIHA	60
2.6.4 Tratamento da CAIHA	61
2.6.5 Tratamento da MAIHA	62
2.6.6 Tratamento da DIAIHA	62
3 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Anemia hemolítica autoimune (AIHA) constitui uma condição clínica em que autoanticorpos fixam-se a antígenos de superfície eritrocitários, levando à sua destruição através do sistema complemento ou do sistema reticuloendotelial.¹

As anemias hemolíticas autoimunes atualmente são classificadas de acordo com a temperatura em que os autoanticorpos reagem aos glóbulos vermelhos, e são conhecidas basicamente como: anemia hemolítica autoimune a quente, onde são ativados anticorpos do tipo IgG em temperaturas maiores ou iguais a 37°C (neste tipo as imunoglobulinas não ativam avidamente o sistema complemento e não aglutinam *in vitro*). E anemia hemolítica autoimune a frio em que os anticorpos ativados são da classe IgM, reagem em temperaturas inferiores a 37°C (mais avidamente entre 4 e 18°C), promovem ampla ativação do sistema complemento e produzem aglutinação espontânea *in vitro*. Alguns autores incluem dentro das anemias autoimunes a hemoglobinúria paroxística ao frio, tipos mistos de AIHA e formas induzidas por fármacos.²

Os estudos em imuno-hematologia sobre os mecanismos etiológicos para o desenvolvimento de AIHA podem ser destacados dentro das seguintes classes de alterações: os epítomos eritrocitários ocultos, a ativação policlonal de células B e T, mimetismo molecular entre alo e autoantígenos, erros de tolerância central e periférica e as desordens imunorregulatórias³.

A presença ou ausência de alguma doença de base, nos permite uma classificação alternativa da AIHA, em primária ou idiopática e AIHA secundária, quando temos evidências de alguma doença subjacente. Em caso de AIHA secundária, percebemos a associação com as desordens linfoproliferativas como o linfoma Hodgkin e não Hodgkin, desordens reumáticas, lúpus eritematoso sistêmico (LES) primário, infecções, neoplasias não linfoides como tumores de ovário, certas doenças inflamatórias crônicas como a colite ulcerativa ou relacionadas ao uso de determinados medicamentos.⁴

Indivíduos adultos são os mais afetados pela anemia hemolítica autoimune, apresentando quadros severos e que requerem intervenção medicamentosa. Quanto à população pediátrica, a AIHA pode se fazer presente nos casos em que haja alguma imunodeficiência primária concomitante, porém esta associação é muito rara. Quando crianças apresentam AIHA, geralmente esta se dá de forma leve, associada a quadro pós infecciosos e que resolve-se espontaneamente.⁴

A tentativa de se estimar a ocorrência de AIHA em diferentes países nos 5 continentes depende essencialmente de relatórios justos, triagem diagnóstica correta, laboratórios com tecnologias adequadas e organização em saúde que registrem e compilem os dados coletados. De acordo com o banco de dados cureresearch.com, nos Estados Unidos a incidência anual de AIHA é de 2,6 a cada 100.000 habitantes, em média 3.600 pessoas por ano. O site faz uma estimativa desta incidência para os outros países a partir dos dados populacionais norte-americanos.⁵ Porém a doença é subdiagnosticada pela baixa incidência na população, que muitas vezes leva o médico a priorizar outras hipóteses diagnósticas, e às dificuldades técnicas na confirmação laboratorial da doença.

Deste modo, sentimos a necessidade de compilar um estudo mais aprofundado sobre o tema, uma vez que a gravidade dos quadros clínicos em adultos têm muitas vezes desfecho fatal, sendo o diagnóstico e tratamento precoces nestes casos medidas de extrema importância.

Nosso objetivo principal é estudar e divulgar informações e dados sobre a anemia hemolítica autoimune com a finalidade de facilitar futuras pesquisas e publicações sobre o tema, bem como a futura implementação de protocolos e guias sobre terapêutica e diagnóstico das AIHA em nossa instituição.

2 DESENVOLVIMENTO:

2.1 Etiologia da AIHA:

De modo geral, ainda nos dias atuais a etiologia da AIHA permanece obscura, principalmente pela ampla gama de variáveis que interferem no desencadeamento da doença. Tais mecanismos muitas vezes estão inter-relacionados e interdependentes. No decorrer desta revisão sobre a etiologia da AIHA, o leitor poderá notar que um mesmo estímulo desencadeia múltiplos mecanismos etiológicos, como por exemplo as infecções por *M. pneumoniae* ou EBV, que ativam a proliferação policlonal de linfócitos, ao mesmo tempo que promovem reações cruzadas entre seus peptídeos antigênicos e os autoepítomos celulares. Alguns fatores etiológicos encontrados na AIHA são também comuns às outras doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), síndrome de Sjögren (SS) e a artrite reumatoide (AR),⁶ ou ainda às desordens linfoproliferativas como a leucemia linfocítica crônica (LLC), linfomas e síndromes mielodisplásicas.⁷

2.1.1 Os autoantígenos ocultos:

Os esforços iniciais no estudo da anemia hemolítica autoimune (AIHA) se concentraram em determinar quais características haviam em comum aos antígenos possivelmente responsáveis pelo desencadeamento da doença. Estudos preliminares por Barker et al, 1992 apontavam algumas características comuns à estes autoantígenos desencadeadores da AIHA, sua sequência polipeptídica e sua massa molecular eram sempre semelhantes e foram identificados como antígenos pertencentes ao grupo Rh.⁷ Barker iniciou seus estudos sobre o papel dos autoantígenos no desencadeamento da resposta autoimune em 1994, ao conseguir reproduzir a AIHA in vitro através da apresentação de epítomos peptídicos sintéticos da molécula de Rh, comprovando sua habilidade antigênica ao estimular linfócitos T virgens in vitro (linfócitos T CD45 RA+).⁷ Nas células T, a molécula CD45 é um antígeno comum a todos os leucócitos, são moléculas com função de tirosina fosfatase que interagem com os receptores de células T e B, atuando como transdutores de sinal intracelular e sinalizadores de superfície. A letra 'R' é uma

sigla para 'restriction', significa que este tipo de CD45 é restrito a alguns tipos de leucócitos, e a letra 'A' designa células que ainda não foram ativadas pelo contato prévio com antígenos.

Os estudos posteriores de Barker foram voltados a determinar se a ativação de células T em pacientes com AIHA também são uma resposta aos epítomos de proteínas Rh e quais sequências peptídicas destas proteínas desencadeariam as respostas autoimunes. Foram realizadas análises hematológicas de 9 pacientes com AIHA, todos com testes de antiglobulina direta positivos para IgG, reticulócitos e níveis de bilirrubinas elevados e baixos níveis de hemoglobina. O soro de cada paciente foi testado em painéis de hemácias contendo fragmentos peptídicos do tipo 15-mer sintetizados a partir de proteínas RhD e RhCE. Foi observado que tais peptídeos ativaram os linfócitos T helper em 7 dos 9 pacientes com anemia hemolítica autoimune, porém devido ao elevado polimorfismo do sistema Rh não foram detectadas sequências peptídicas com uma maior frequência de ativação entre os indivíduos da amostra. O complexo principal de histocompatibilidade de classe II, é composto por 3 loci gênicos: DP, DQ e DR, cada loci codifica uma proteína α e uma proteína β expressas em codominância na superfície da célula. Os anticorpos anti-DR ao ligarem-se à estas proteínas do MCHII, bloqueavam todo o processo de ativação dos linfócitos T helper, levando à deleção clonal ou à anergia, diminuindo também a intensidade da AIHA. Desta forma ainda na década de 90, começaram também os estudos utilizando a imunoterapia em modelos murinos de AIHA.⁸

De forma geral, muitas doenças autoimunes são desencadeadas por um mecanismo semelhante, onde os epítomos antigênicos podem permanecer ocultos dos linfócitos T através de um série de mecanismos. Dentre tais mecanismos está a difícil acessibilidade dos linfócitos a determinados tecidos, como o sistema nervoso central, ou à total destruição dos epítomos no interior dos lisossomos, ou ainda à sua baixa afinidade de ligação às moléculas do MHC, qualquer quebra deste equilíbrio pode levar à exposição destes autoantígenos ocultos. A PLP (proteína proteolipídica) é um exemplo de proteína presente no sistema nervoso central humano e um autoantígeno envolvido no desenvolvimento da esclerose múltipla, assim como os receptores musculares de acetilcolina estão envolvidos no

desenvolvimento da miastenia gravis, a peroxidase tireoidiana na doença de Graves, os fatores nucleares no lúpus eritematoso sistêmico e as reações aos epítomos ocultos da molécula de colágeno tipo II na artrite reumatóide.⁶

2.1.2 Ativação policlonal de células B e/ou T:

A ativação policlonal de células B e T é uma via de desencadeamento de AIHA especialmente após quadros infecciosos, e um ótimo exemplo é que o ocorre na infecção pelo EBV, na qual 0,5-3% dos pacientes desenvolvem AIHA.⁹ Também na doença do enxerto versus hospedeiro, nas leucemias e síndromes mielodisplásicas em que a produção maciça de linfócitos B e T leva tais células a um estado hiper-reativo aumentando as chances de desenvolvimento das doenças autoimunes. O modo pelo qual o EBV pode levar à AIHA pela ativação policlonal de células B se dá pela ação dos antígenos nucleares do EBV. O antígeno nuclear 1 (EBNA1) é responsável pela síntese de proteínas que bloqueiam a apresentação dos antígenos do EBV ao MHC, fazendo com que o sistema imune não consiga reconhecer os epítomos virais. O EBNA2 expressa proteínas (LMP1 e LMP2) que funcionam como fatores de crescimento para os linfócitos B ao mesmo tempo inativando a função destes linfócitos, onde tornam-se anérgicos, e aumentando a sua meia-vida.¹⁰

Na doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) a ativação policlonal é uma resposta do hospedeiro à apresentação de antígenos pelos linfócitos T transplantados. Os linfócitos T do enxerto, tornam-se ativados pelo contato com as várias moléculas antigênicas no organismo hospedeiro e pela apresentação de antígenos pelas células dendríticas do enxerto. O hospedeiro imunocomprometido aceita as células T do enxerto, bem como a sua apresentação de antígenos às células B do hospedeiro, não compreendendo que os antígenos apresentados pelos linfócitos transplantados são epítomos HLA do hospedeiro, os linfócitos B se multiplicam e fabricam anticorpos contra seus próprios antígenos leucocitários (HLA).¹¹ Existem outras várias vias pelas quais se dá a ativação policlonal linfocitária na GVHD, mas que fogem ao escopo desta revisão.

Um outro exemplo relevante que segue o mesmo mecanismo etiológico e pode

muitas vezes desencadear AIHA são as leucemias linfocíticas crônicas (CLL). As CLL decorrem de proliferações clonais de células B1, que ao mesmo tempo não conseguem completar o seu processo de maturação, apresentando falhas de seletividade entre self e non-self. Na CLL as células T são deficientes e não são adequadamente reconhecidas pelas células B. Esta falha no reconhecimento imunológico entre células T-B, faz com que os clones de células B maduros tornem-se facilmente autorreativos, favorecendo o surgimento das doenças autoimunes. Corroborando a etiopatogenia da doença, Arena et al, 2013, publicou que 4,5-11% dos pacientes com CLL desenvolveram AIHA, 2-5% desenvolveram PTI, e menos de 1% desenvolveram aplasia eritroide e granulocitopenia autoimune.¹²

2.1.3 O mimetismo molecular:

No mimetismo molecular, há uma reação autoimune cruzada entre antígenos externos e autoantígenos. Tais reações cruzadas retardam deleções clonais e ainda induzem a ativação de clones de células B autorreativas, favorecendo a ocorrência de fenômenos autoimunes.¹³

Têm sido descritos desde a década de setenta alguns trabalhos relatando o surgimento de anemia hemolítica em crianças após infecções virais e temos bem estabelecida a relação entre a síndrome da crioaglutinina fria e infecções por *Mycoplasma pneumoniae* ou infecções por Epstein-Barr vírus em adultos.¹³ Menos frequentes estão algumas infecções por Parvovírus, Herpes vírus e síndromes paraneoplásicas que também estimulam reações autoimunes pelo mesmo mecanismo de mimetismo molecular.¹⁴ Sobre a relação *M.pneumoniae*/AIHA Aproximadamente 45% dos pacientes com pneumonia por *M.pneumoniae* desenvolvem crioaglutininas com especificidade anti-I (Chanok et al 1961, apud Mackay, 2006)¹³.

Coelhos infectados por *M.pneumoniae* desenvolveram crioaglutininas com especificidade anti-I, tais crioaglutininas reagem tanto com antígenos da membrana bacteriana quanto com o autoantígeno I da superfície eritrocitária. (Janney et al 1978).¹⁵ Diante da reprodutibilidade desta associação foi também aventada a hipótese de que na superfície eritrocitária haveriam receptores para moléculas de

M.pneumoniae, de forma que a bactéria ao ligar-se exporia o autoantígeno I o que facilitaria uma reação autoimune. O autoantígeno I tem sido estruturalmente estudado e esta hipótese tem ganhado peso, e os cientistas acreditam que os antígenos I funcionam como parte de um receptor para *M.pneumoniae*, quando este se acopla, libera o epítipo eritrocitário que estimula a reação antigênica. (Loomis et al, 1983 apud Mackay, 2006).¹³

2.1.4 Falhas de tolerância central e periférica na maturação linfocitária:

2.1.4.1 Falhas de tolerância central e periférica de linfócitos B:

O processo de maturação dos linfócitos B inicia-se através de sucessivos rearranjos de DNA a fim de produzir imunoglobulinas funcionais. Estes rearranjos gênicos têm início na célula pró-B, na medula óssea (MO), onde expressam CD-10, CD-19, proteínas nucleares como desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT) e produtos gênicos de ativação de recombinação (RAG1 e RAG2).¹⁶ Somente cerca de 50% destas células conseguem montar uma cadeia funcional de imunoglobulina, produzindo cadeias pesadas primárias chamadas cadeias pesadas μ_m , duas cadeias leves κ ou λ , e uma porção Ig α e Ig β . A união das cadeias leves às cadeia pesadas forma um protótipo de Ig ancorada à superfície celular e envia sinais de feedback negativo para estabilização desta conformação gênica (cessa a expressão de TdT), finalizando a sua primeira etapa de maturação. A perda das cadeias leves e a endocitose das cadeias pesadas marca o início do estágio pré-B.¹⁶

Uma das primeiras imunodeficiências descritas na literatura médica, a agamaglobulinemia de Bruton (agamaglobulinemia ou hipogamaglobulinemia ligada ao X), é uma doença ligada ao cromossomo X, que impede a maturação dos linfócitos pré-B, tornando-os incapazes de produzir anticorpos funcionais. Os pacientes tornam-se vulneráveis à infecções recorrentes e predispostos ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, AIHA e LES.¹⁷

As células pré-B, na medula óssea, dividem-se sob estímulo de citosina e iniciam seus rearranjos nucleares a fim de formarem cadeias leves definitivas e transportar

até a membrana uma nova imunoglobulina funcional IgM, ao término deste processo um novo feedback negativo é enviado ao núcleo celular cessando os rearranjos genéticos e a expressão de RAG 1 e 2, e iniciando a expressão de CD20. Assim, as células pré-B passam a ser linfócitos B imaturos. Este feedback negativo é também denominado exclusão alélica e isotípica, que leva à uma restrição clonal, sendo classificado como um processo de seleção positiva.^{16,18} Segue-se a ele a seleção negativa, onde são apresentados autoantígenos aos linfócitos B, na medula óssea. Os linfócitos B que ligam-se com maior avidéz aos autoantígenos entram em apoptose ou iniciam seus processos de recombinação gênica para uma nova edição de receptor, se esta edição de receptor falhar a célula permanecerá indiferenciada e em poucos dias morrerá. Se houver sucesso, os linfócitos B passam a produzir marcadores de superfície, como IgD, receptores do complemento (CR1 e CR2 ou CD21), 5'- nucleotidase (CD73), CD23, LFA-1, ICAM-1, receptores de residência, MHC-II, CD40 e em poucos dias abandonam a medula óssea.^{16, 18}

Após saírem da medula óssea, os linfócitos B (LB) procuram competitivamente por antígenos para que possam se ativar e proliferar. As vias de ativação de um LB podem se dar de várias formas, onde as principais são: a) Ativação de LB através do contato com antígenos T independentes. Estes antígenos ativam os receptores ligados à resposta imune inata como os TLR (Toll-like receptors). Nestes casos os linfócitos B endocitam os antígenos, os quebram em pequenos epítomos, e os apresentam em sua superfície celular através de seu MHC II aos linfócitos T auxiliares (Th) CD4+, que ficam ativados e aumentam a ativação os linfócitos B^{16, 18} b) Intensificação da ativação dos linfócitos B pelo contato com fatores do complemento, através da presença dos receptores transmembrana CD21 (ou CR2), CD19, CD81 que formam um complexo receptor para C3d. c) Ativação de LB diante de antígenos apresentados pelos LTh CD4+. Os linfócitos T expressam em sua superfície uma proteína transmembrana CD40L que se liga à proteínas CD40 na superfície dos LB (especialmente na presença de IL-4 e IL-5). Assim também a CD28 na superfície dos LT ativados ligam-se às proteínas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Estas ligações somadas à presença do antígeno, ativam fortemente os linfócitos B.¹⁸

Após a ativação dos LB, segue-se a etapa de diferenciação, em que alteram sua morfologia e substituem suas cadeias pesadas de IgM ou IgD para IgG, IgA e IgE, processo chamado mudança de classe. A interação entre CD40/CD40L parece ser decisiva no início do processo de mudança de classe. Na síndrome da hiper IgM, esta interação encontra-se prejudicada pela baixa expressão de CD40L na superfície de linfócitos T ativados, o que por sua vez prejudica o processo de mudança de classe e torna o paciente susceptível a infecções, doenças autoimunes e linfomas.¹⁸

Um outro tipo de imunodeficiência que acomete os LB em seu processo de maturação e ativação é a imunodeficiência comum variável (CVID), também conhecida como hipogamaglobulinemia de início tardio, é uma das imunodeficiências mais comuns associadas à deficiência de anticorpos. Cursa com hipogamaglobulinemia <300mg/dl, infecções pulmonares recorrentes complicadas com abscessos pulmonares, derrame pleural, e septicemia, quadros artríticos sépticos com envolvimento frequente de *Mycoplasma spp.* e diarreia crônica por *G. lamblia* e *C. difficile*. 1/3 dos pacientes desenvolvem doenças autoimunes, e dentre elas a AIHA é a mais frequente, um risco 300 vezes maior de desenvolver doenças linfoproliferativas e 50 vezes maior de se desenvolver câncer gástrico em relação à população geral.¹⁹

Com relação às subpopulações de LB e o desenvolvimento de AIHA, Watanabe et al, 2002, realizou um estudo cruzando características de camundongos transgênicos H+L6 produtores de autoanticorpos antieritrocitários com camundongos deficientes na expressão de Fas; do cruzamento foram gerados camundongos homozigotos e heterozigotos, e o que se observou foi que os camundongos homozigotos desenvolveram uma síndrome autoimune muito semelhante à ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome), caracterizada por AIHA, PTI (púrpura trombocitopênica idiopática) e neutropenia autoimune. Através da citometria de fluxo foi observado um aumento intenso na ativação e multiplicação das células B1 (na ALPS humana há um aumento dos LB1 CD5+), e um aumento na produção de IL-10 (também visto na ALPS).²⁰ Finalizando a abordagem sobre os desequilíbrios na maturação e ativação dos LB e o desenvolvimento da AIHA é importante destacar que o mecanismo de ação de um

dos mais recentes medicamentos utilizados no controle desta enfermidade, o rituximabe, é justamente o bloqueio das moléculas CD20 situadas seletivamente nas células pré-B e linfócitos B maduros, através dos anticorpos monoclonais anti-CD20.

2.1.4.2 Falhas de tolerância central e periférica de linfócitos T:

O papel do timo nos processos autoimunes começou a ser questionado em 1953, por Robert Good, ao relacionar vários casos clínicos de pacientes com timoma e agamaglobulinemia, que persistiam mesmo após a timectomia. Tais observações renderam-lhe em 1955 a descrição da Síndrome de Good, cujas características clínicas são: aumento da susceptibilidade a infecções por germes encapsulados, fungos e vírus oportunistas, timomas à investigação por exames de imagem e uma hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia à investigação sorológica.²¹ Segundo estudos iniciados por Miller em 1961, a timectomia em ratos ao nascimento, foi associada à atrofia linfoide, susceptibilidade a infecções, inabilidade na rejeição de aloenxertos de pele e morte precoce. Miller deu início a um novo capítulo na história da imunologia ao inferir que o timo possuía um papel específico na maturação de linfócitos, induzindo-os a discriminar antígenos próprios dos não-próprios.^{22, 23}

De crucial importância no estudo da AIHA, estão os linfócitos T regulatórios. Os linfócitos T regulatórios são células capazes de zelar pelo controle da autotolerância imunológica periférica e moderação das respostas imunes. Os linfócitos T regulatórios (T_{REGS}) produzem citosina imunossupressoras como IL-4, IL-10 e TGF- β . Os LT_{REGS} se subdividem em: LT_{REGS} de origem natural (LT_{REGS} CD4+/CD25+), LT_{R1} que produzem IL-10 e suprimem algumas respostas de linfócitos T in vivo, e os Lth3 capazes de impedir o desenvolvimento de doenças autoimunes mediante a produção de TGF- β . Outros LT com função regulatória são os LT $\gamma\delta$ células CD8+Qa-1+, os LT CD8+CD28- (CD8+ TR), as células NK/T e os LT duplo-negativos.^{16, 18}

Sakaguchi et al, desde 1982 até os dias atuais vêm pesquisando sobre o desenvolvimento, comportamento e função das T_{REGS} como células supressoras de

autoimunidade. Suas suspeitas da existência de um tipo linfocitário imunossupressor iniciaram ao notar que, reproduzindo as pesquisas de Miller et al, 1961,²² observou que as principais causas de morte após a timectomia em ratos neonatais (entre o segundo e quarto dias de nascimento) eram doenças autoimunes em vários órgãos (principalmente tireoide, ovários, testículos e estômago). Este padrão também se repetia em ratos adultos timectomizados e submetidos à várias sessões de radiação ionizante subletais, porém a administração de linfócitos T CD4+ de ratos sadios de mesma linhagem aos ratos timectomizados e irradiados fazia com que a doença autoimune involuísse. Concluindo assim que não haviam somente linfócitos T potencialmente autorreativos, mas também linfócitos T capazes de suprimir as respostas autoimunes.²⁴ Em suas pesquisas subsequentes, o grupo de Sakaguchi procurou encontrar moléculas específicas que designassem diferentes linhagens de linfócitos T e testassem qual linhagem extirpada do organismo provocaria o surgimento de doenças autoimunes. Assim, após várias tentativas, uma suspensão de linfócitos TCD4+ (na qual foi retirada outras subpopulações de linfócitos T, especificados como CD5^{high} e CD45^{low}) foi injetada em ratos timectomizados induzindo várias desordens autoimunes, dentre elas tireoidites, doença inflamatória intestinal e rejeição tumoral.²⁵ Posteriormente, Sakaguchi e sua equipe seguem seus esforços no sentido de determinar com mais precisão os marcadores de superfície que correspondessem com maior especificidade a esta subpopulação de linfócitos T, chegando à descoberta da molécula CD25 e denominando esta classe de linfócitos como linfócitos T CD4+CD25+.²⁶

Através de pesquisas genéticas na espécie de camundongos Scurfy (caracterizados por uma mutação recessiva ligada ao X), Brunkow et al, em 2001, através de técnicas de mapeamento genético de alta resolução conseguiram identificar o sítio genético defeituoso, que seria responsável por decodificar uma proteína transcricional da família forkhead/winged helix, chamada Foxp3. Os camundongos Scurfy, por não conseguirem sintetizar a Foxp3 acabam apresentando uma doença fatal caracterizada pela hiperativação de células CD4+, produção de citosinas inflamatórias e várias desordens autoimunes, recebeu a sigla IPEX (immune dysregulations, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) que corresponde a desregulação imunológica, poliendocrinopatias e enteropatias

ligadas ao cromossomo X.²⁶ Tal síndrome também foi encontrada em neonatos humanos do sexo masculino e possui a mesma etiopatogenia, sendo um defeito genético no locus decodificador de Foxp3 e gerando um quadro clínico de diarreia aquosa, diabetes tipo 1, tireoidite autoimune, dermatite eczematosa e outras doenças autoimunes dentre elas a AIHA.²⁷ A molécula Foxp3 age nos linfócitos, fazendo-os produzir moléculas imunossupressoras e inibidoras de proliferação, estimula a produção das moléculas de superfície encontradas nos linfócitos T reguladores (CD25, CTLA-4, GITR) e inibe a produção de IL2, IL4, e IFN- γ inibindo assim o desenvolvimento de doenças autoimunes.²⁶

Os linfócitos T efetores dividem-se em linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos e os linfócitos T $\gamma\delta$ (este com uma função intermediária entre o sistema imune inato e adaptativo). Os linfócitos T helper, por sua vez, dividem-se em linfócitos T CD4+ e TCD8+. A partir daí, os linfócitos CD4+, podem ainda se diferenciar em linfócitos Th1, Th2 ou Th17 (antiga família Th3), de acordo com o estímulo de citosinas que receber.¹⁶ Foi observado que pacientes com AIHA tinham elevados níveis de linfócitos Th17 e de IL-17 e que tais níveis estavam proporcionalmente relacionados à gravidade da doença. Segundo Xu et al, 2012, modelos murinos de AIHA (Marshall-Clarke e Playfair) nos quais se injetavam linfócitos Th17 e/ou IL-17, apresentavam mais chances de desenvolver AIHA e intensificavam a atividade da doença naqueles que já a haviam desenvolvido, e o contrário, a neutralização da Th17 in vivo, fazia com que a doença regredisse. Sugerindo desta forma que os linfócitos Th17 contribuem de fato para o desenvolvimento de AIHA, tais dados permitem que novas terapias sejam exploradas no futuro para o tratamento da doença.²⁸

2.1.5 Distúrbios imunorregulatórios:

Intimamente relacionados aos distúrbios de tolerância central e periférica dos linfócitos, estão os distúrbios imunorregulatórios. Hoje sabe-se que a manipulação de certas subpopulações de linfócitos T pode prevenir ou iniciar uma doença autoimune, como exemplificado no item anterior sobre os linfócitos T reguladores como na eliminação das células T regulatórias CD4+/CD25+.²⁹

O desequilíbrio entre citosinas Th1/Th2 também pode levar aos mesmos efeitos, de forma que o aumento das respostas Th2 se mostraram associadas a maiores chances de desenvolvimento de AIHA.²⁸ Os estudos realizados por Fagiolo et al, delinearam em grande parte os estudos atuais no que tange ao envolvimento das citosinas Th1/Th2 no início e manutenção das doenças imunomediadas, como AIHA e LES. Utilizando culturas de células mononucleares de sangue periférico (PMBCs) de pacientes com AIHA e de controles saudáveis, e incorporando-as com ³H-timidina (para avaliação da multiplicação celular e produção de citosinas) e ensaios imunoenzimáticos com e sem estimulação antigênica, Fagiolo et al puderam observar que: a produção de IL-10 foi sempre mais elevada em pacientes com AIHA do que nos controles, independentemente da estimulação antigênica; os níveis de IL-12 estão inicialmente mais elevados nos pacientes com AIHA do que nos controles, mas após estimulação antigênica os níveis de IL-12 aumentam significativamente nos controles, tornando-se mais elevados do que os níveis dos pacientes (os valores elevados de IL-10 nos pacientes com AIHA inibem a produção de IL-12 pelas células Th1, modulando assim a resposta imune para predominantemente Th2).²⁹

2.2 Classificação e epidemiologia:

A classificação proposta por Gehrs & Friedberg, 2002, é uma das mais abrangentes descritas sobre AIHA (resumida na tabela 1), e citada em mais de 60% dos autores pesquisados. Engloba além da AIHA por anticorpos quentes e frios, a hemoglobinúria paroxística noturna, a AIHA mista e as AIHA desencadeadas por fármacos.

As classificações usualmente encontradas nos livros do ciclo básico até 2005, divide as AIHA em dois tipos principais, por anticorpos quentes e frios. A AIHA mista até então pouco citada em livros, correspondia à um grupo de pacientes com AIHA severa e de tendência à cronicidade; a DIAIHA fazia parte de um grupo à parte, não sendo considerado verdadeiramente autoimune, até as pesquisas sobre o mecanismo de desencadeamento de autoimunidade da α -metildopa. Desta forma, na tabela a seguir pode-se observar a inclusão da MAIHA e DIAIHA e a descrição de cada subtipo classificado:

Quadro 1: Classificação das anemias hemolíticas autoimunes:

Classificação das anemias hemolíticas autoimunes (AIHA)			
AIHA por anticorpos quentes 48-70%	Idiopática		
	Secundária	Associada a desordens linfoproliferativas	
		Associada a desordens reumáticas	
		Associada a malignidades não linfoides	
		Associada a inflamação crônica	
		AIHA induzida por drogas	
AIHA por anticorpos frios	Síndrome das crioaglutinininas 16-32%	Idiopática	
		Secundária	Pós-infecciosas
			Hemoglobinúria paroxística por anticorpos frios 2-10%
AIHA mista	Idiopáticos		
	Secundários (frequentemente por desordens reumáticas)		
AIHA induzida por fármacos 12-18%	AIHA dependente de fármacos	Haptenos ou adsorção de drogas	
		Imunocomplexos ternários	
		AIHA não dependente de fármacos	

Gehrs & Friedberg, 2002²

O quadro acima mostra que a classificação inicial se dá pela reatividade dos anticorpos à temperatura. Uma outra importante classificação é a etiológica, que subdivide cada tipo de AIHA em primária e secundária, sendo a busca do diagnóstico etiológico de importância vital para o prognóstico do paciente. As AIHA induzidas por drogas recebem quesitos classificatórios diferenciados e foram divididas por motivos didáticos em AIHA dependente da presença de fármacos e AIHA independente da presença de fármacos (neste caso a exposição dos autoantígenos eritrocitários ocultos permanece mesmo que o fármaco já não esteja na corrente sanguínea), veremos no decorrer no trabalho que os tipos de DIAIHA são na realidade um espectro da potência imunogênica do fármaco. Nos tópicos seguintes será abordada a epidemiologia de cada subtipo da AIHA lançando as bases para o raciocínio diagnóstico pormenorizado adiante em tópico próprio.

Alwar et al, 2010 fizeram uma análise estatística retrospectiva e prospectiva de 175 casos de AIHA, na Índia, e listaram as frequências encontradas de AIHA idiopática e secundária, e as causas subjacentes às AIHA secundárias. De forma que, dos 175 casos estudados, 40 eram de AIHA idiopática (correspondendo a

aproximadamente 23%) e 135 eram de pacientes com a forma secundária (correspondendo a aproximadamente 77% dos casos). Dentre as doenças secundárias à AIHA foram encontrados 63 casos de desordens do tecido conjuntivo (46% dos casos de AIHA secundária), com predominância de LES; 19 casos secundários a falência de órgãos, com predominância de falência renal (~14% das AIHA secundárias); 15 casos classificados como miscelânea (~11%), para designar AIHA induzida por fármacos, malária, PTI; 14 casos secundários a malignidades hematológicas (~10,3% das AIHA secundárias); 12 casos relacionados a outras anemias (~8,8%); 8 casos secundários a HIV (~6%); e 4 casos relacionados à tuberculose (~3%).³⁰ Estas proporções de causas de AIHA secundária não acompanham as estatísticas encontradas nos Estados Unidos, onde as desordens linfoproliferativas, em especial a leucemia linfocítica crônica (CLL) figura como a principal causa de AIHA secundária tanto por anticorpos quentes quanto por anticorpos frios, em sequência estão os linfomas Hodgkin e não-Hodgkin e a macroglobulinemia de Waldenström; depois surgem as doenças do tecido conjuntivo e as neoplasias não linfoides. A proporção de AIHA idiopática e secundária, na literatura norte-americana possui uma ampla variabilidade, onde uma causa subjacente pode ser encontrada em 20-80% dos casos.^{2, 31, 32}

2.2.1 Anemia hemolítica autoimune por anticorpos quentes (WAIHA):

WAIHA (warm autoimmune hemolytic anemia) é o tipo de anemia hemolítica autoimune mais comum relatada em toda a bibliografia consultada. Com uma incidência de 1 em cada 75.000-80.000 indivíduos na população geral norte-americana. A WAIHA corresponde a aproximadamente 75% de todas as AIHA (revisado por Bass, 2014).³¹ Dados mais antigos corroboram estes números, estimando o total de casos de WAIHA em 48-70% do total na população norte-americana (revisado por Gehrs & Friedberg, 2002),² e Packman, 2008 encontrou uma incidência de WAIHA em 80-90% do total de casos de AIHA na população da Carolina do Norte.³²

Como a WAIHA idiopática é um diagnóstico de exclusão, poucos autores possuem dados sobre ela, Packman, 2008 afirma que cerca de 50% dos casos de WAIHA sejam idiopáticos.³² Outros autores se limitam a dizer que as AIHA idiopáticas são

mais comuns em mulheres entre 40-50 anos. Um pico de incidência de WAIHA idiopática também é relatada em crianças, especialmente do sexo masculino,³¹ porém o médico deve estar atento às imunodeficiências congênitas ligadas ao cromossomo X, bem como à ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome), não sendo WAIHA idiopática nestes casos.

A WAIHA secundária pode ser associada a várias condições clínicas subjacentes, como infecções (por exemplo, a mononucleose infecciosa e as infecções pelo vírus da imunodeficiência humana); as desordens linfoproliferativas, como a leucemia linfocítica crônica (CLL), onde 11% dos pacientes com CLL podem desenvolver WAIHA, e os linfomas Hodgkin e não-Hodgkin em que 2-3% dos pacientes desenvolvem WAIHA por ano,³¹ no total, as desordens linfoproliferativas correspondem a aproximadamente 50% dos casos de WAIHA secundária;³² existem também as doenças autoimunes associadas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), a artrite reumatoide, as tireoidites autoimunes, a doença inflamatória intestinal e hepatites autoimunes;³¹ as neoplasias não linfoides como os cistos dermides de ovário, teratomas, sarcomas de Kaposi e outros carcinomas.²

Sokol et al, 1992, realizou um dos maiores estudos epidemiológicos na Europa através da análise de 1834 casos de AIHA e foi um dos responsáveis pela inclusão da AIHA mista dentro da classificação geral das AIHA.³³ Os dados que se seguem, ainda hoje são utilizados como referência em muitos artigos internacionais, algumas doenças são sempre lembradas em todos os trabalhos que abordam WAIHA secundária, como a leucemia linfocítica crônica, os linfomas, o LES, AR, e colite ulcerativa. Porém poucos dados fazem referência à AIHA desencadeada por fármacos, e que no entanto foi a causa secundária de WAIHA mais prevalente nos trabalhos de Sokol. Outro dado que chama a atenção é a maior prevalência de artrite reumatoide em relação ao lúpus eritematoso sistêmico, fato pouco encontrado em outros trabalhos.

O resultados encontrados em seu estudo das causas de WAIHA secundárias estão listados na tabela a seguir, bem como a frequência e sua porcentagem em relação ao total de AIHA:

Tabela 1: As 20 causas mais frequentes de WAIHA, e seu percentual em relação à uma amostra de 1749 pacientes com AIHA (excluindo os 85 casos de aloimunização materno-fetal e síndrome hemolítico-urêmica - SHU):

Doença	Frequência	%	Doença	Frequência	%
Idiopática	617	35,2%	Infec. Inesp.	13	0,7%
DIAIHA	140	8%	Mielofibrose	12	0,7%
Carcinoma	67	3,8%	HD	10	0,6%
CLL	63	3,6%	DM	8	0,4%
AR	34	1,9%	Anemia perniciosa	7	0,4%
LNH	32	1,8%	LNLA	5	0,3%
Sd. Mielodispl.	23	1,3%	LMC	5	0,3%
Colite ulcerativa	19	1%	Tu. de ovário	4	0,2%
LES	17	1%	Mieloma	4	0,2%
Mieloma	4	0,4%	Tireotoxicose	3	0,16 %

Adaptado de Sokol et al, 1992³³

2.2.2 Anemia hemolítica autoimune por anticorpos frios (CAIHA):

2.2.2.1 Síndrome das crioaglutininas (CAS):

A CAS é em sua maior parte secundária, contabilizando 56,1% dos casos.³³ A síndrome das crioaglutininas (CAS) correspondem a em média 15% das causas de AIHA segundo Bass et al, 2014,³¹ a 16-32% das causas de AIHA segundo Gehrs & Friedberg, 2002. Tem maior prevalência em adultos idosos, com um pico de incidência aos 70 anos e uma ligeira predileção por mulheres. A CAS secundária surge na maioria das vezes após infecções como pneumonias por *M. pneumoniae*, infecções por EBV, adenovírus, citomegalovírus, vírus influenza, vírus varicela zoster, e vírus da imunodeficiência humana.² O mecanismo patogênico de CAS é dependente de complemento e sua lise é basicamente mediada pelas proteínas C3, levando à hemólise intravascular e extravascular. Os autoanticorpos mais frequentemente envolvidos são do tipo IgM, e é uma doença dependente de variações de temperatura. Em baixas temperaturas a hemólise intravascular é acelerada, podendo levar muitas vezes à acrocianose e necroses de extremidades.^{2, 31}

Tabela 2: As 20 causas mais frequentes de CAS e seu percentual em relação à uma amostra de 1749 pacientes com AIHA (excluindo os 85 casos de aloimunização materno-fetal e SHU):

Causa	Frequência	%	Causa	Frequência	%
Idiopática	344	19,6%	LLA	4	0,2%
Pneum. por <i>M. pneumoniae</i>	29	1,6%	LNLA	4	0,2%
Carcinomas	23	1,3%	DH	4	0,2%
LNH	22	1,2%	Sd. Mielodispl.	4	0,2%
CLL	13	0,7%	DM	3	0,2%
Pneum. Inesp.	13	0,7%	MW	3	0,2%
Infec. Inesp.	11	0,6%	Outras neoplasias	2	0,1%
AR	9	0,5%	LMC	1	0,06%
LES	8	0,4%	Linf. Ang.	1	0,06%
EBV	6	0,3%	Tb	1	0,06%

Adaptado de Sokol et al, 1992³³

2.2.2.2 Hemoglobinúria paroxística ao frio (PCH):

A PCH é conhecida como síndrome de Donath-Landsteiner, relativamente incomum com uma incidência de 2-10% do total de casos de AIHA.² Está relacionada a casos de sífilis congênita e à quadros pós-infecciosos, como sarampo, catapora, caxumba, e nas pneumonias, acometendo preferencialmente crianças. Os anticorpos envolvidos são do tipo IgG (anticorpos de Donath-Landsteiner). Tais anticorpos possuem um caráter bifásico, onde opsonizam os eritrócitos a baixas temperaturas e levam à hemólise quando o organismo retorna à temperatura média de 37°C; seu comportamento clínico é o de uma anemia hemolítica aguda, com hemoglobinúria, febre súbita, calafrios, dores abdominais e lombalgia, que acometem preferencialmente crianças e adultos jovens. Os detalhes sobre a hemolisina de Donath-Landsteiner serão abordados no tópico sobre fisiopatologia.³¹

Segundo Sokol et al, a PCH idiopática correspondeu a 0,6% do total de casos de AIHA e a 57,9% do total de casos de PCH, a PCH secundária correspondeu a 0,4% do total de casos de AIHA e a 42,1% do total de casos de PCH. Todas as causas secundárias de PCH foram relacionadas a quadros infecciosos não específicos e sífilis.³³

2.2.3 Anemia hemolítica autoimune do tipo misto (MAIHA):

Este subtipo também pode ser classificado em MAIHA primária e MAIHA secundária. Quando existem suspeitas de MAIHA secundária, geralmente deve-se investigar as desordens linfoproliferativas e as outras doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (LES). MAIHA corresponde a menos de 5% do total das incidências de AIHA ³¹ Segundo Sokol et al, as MAIHA correspondem a uma fatia de 6,5% do total de AIHA de sua amostra. As MAIHA idiopáticas correspondem a 68,3% do total de MAIHA e as secundárias a 31,6%.³³

Tabela 3: As 10 causas mais frequentes de MAIHA e seu percentual em relação à uma amostra de 1749 pacientes com AIHA (excluindo os 85 casos de aloimunização materno-fetal e síndrome hemolítico-urêmica):

Causas	Frequência	%	Causas	Frequência	%
Idiopática	82	4,7%	Sd. Mielodispl.	3	0,2%
LNH	8	0,4%	Infecções	3	0,2%
Carcinomas	6	0,3%	AR	3	0,2%
DH	4	0,2%	LES	3	0,2%
Mielofibrose	3	0,2%	LMC	1	0,06%

Adaptado de Sokol et al, 1992³³

2.2.4 Anemia hemolítica autoimune induzida por fármacos (DIAIHA):

A DIAIHA começou a ser suspeitada e relatada na década de 50, através de estudos de casos e atualmente foi incorporada à classificação geral. Em relação à população geral a DIAIHA é uma reação raríssima, em torno de 1 pessoa acometida a cada 1.000.000 de habitantes. Interpretando os dados fornecidos por Sokol et al, dentre sua amostra de 1749 pacientes, contabilizou 140 casos de AIHA induzida por fármacos, representando 8% do total das anemias hemolíticas autoimunes.³³ Paralelamente, Garratty, 2009, observa um aumento no número de medicamentos implicados na gênese de DIAIHA em seus 40 anos de estudo. Em 1967 os relatos de AIHA induzida por drogas envolviam em torno de 13 medicamentos, dentre eles o mais comum era a Metildopa, responsável por 67% dos casos e a Penicilina com 25% dos casos na década de 70. Nos anos 80 os estudos giravam em torno de 32 fármacos, e em 2007 haviam 125 diferentes

fármacos comprovadamente causadores de AIHA. Atualmente os principais fármacos envolvidos são as cefalosporinas, especialmente o Cefotetan – descontinuado no início de 2006 e reinserido no mercado em 2007.³⁴ Ainda sobre os fármacos que desencadeiam AIHA com maior frequência, a tabela abaixo, de Garratty et al, 2009, resume um trabalho estatístico de 40 anos:

Tabela 4: Análise da frequência de DIAIHA em relação aos fármacos entre os anos de 1969-2008.

Fármaco	1969-1978 (Petz & Garratty)	1979-2008 (Garratty, Arndt e Leger)			Total em 40 anos
		1979-88	1989-98	1999-08	
Metildopa	29 (67%)	0	0	0	29 (15%)
Penicilina	10 (23%)	2 (15%)	0	0	12 (6,2%)
Cefotetan	0	0	36 (69%)	45 (53%)	81 (42%)
Ceftriaxone	0	1 (8%)	5 (10%)	14 (17%)	20 (10,3%)
Outras cef.	0	2 (15%)	0	0	2 (1%)
Inibidores de β -lactamase	0	0	4 (8%)	6 (7%)	10 (5,1%)
Piperacilina	0	0	1 (2%)	12 (14%)	13 (6,7%)
Outros	4 (9,3%)	8 (62%)	6 (12%)	8 (9%)	26 (13,5%)

Garratty, 2009³⁴

A DIAIHA é subdividida em DIAIHA dependente da presença de fármacos e DIAIHA independente da presença de fármacos, de acordo com o método laboratorial necessário para o diagnóstico. A DIAIHA dependente de fármacos só é diagnosticada laboratorialmente quando o fármaco é adicionado ao teste de antiglobulina indireta (IAT), pois nestes casos as hemácias não ficam revestidas com o complexo fármaco/anticorpo para que seja realizado apenas o DAT. Na DIAIHA independente da presença de fármacos, o DAT é positivo, significando que estas hemácias estão revestidas de anticorpos, quer seja pela adsorção do medicamento pela superfície da membrana celular tornando-a imunogênica, quer pela indução de reações cruzadas ou exposição de autoantígenos.^{34, 35}

2.3 Fisiopatologia:

As AIHA e seu comportamento clínico são definidos basicamente pelos tipos de anticorpos envolvidos e sua forma de ativar o sistema complemento, sua amplitude térmica, concentração (titulação) e sua especificidade antigênica.

2.3.1 AIHA desencadeada por autoanticorpos IgG:

Quando se diz, 'AIHA por anticorpos quentes' (WAIHA), nos referimos de forma grosseira à anemia hemolítica causada pela opsonização dos eritrócitos por imunoglobulinas do tipo IgG. Porém, hoje sabemos que outras imunoglobulinas podem estar envolvidas na AIHA tipo quente, como a IgM e a IgA³¹

Os fatores etiológicos, ao serem ativados, como discutido no início deste trabalho, estimulam a produção de autoanticorpos (neste caso do tipo IgG) contra os autoantígenos eritrocitários. As imunoglobulinas do tipo G ativam o sistema complemento, porém, para que a ativação do sistema complemento ocorra, as IgG necessitam se fixar aos autoantígenos de tal forma que duas IgG fiquem bem próximas, formando assim o ponto de fixação para C1, cuja fração C1q fixa-se à fração Fc de imunoglobulinas como IgG1, IgG2 IgG3 e IgM (anticorpos fixadores do complemento). Quando C1 é ligado e ativado, ocorre ativação de C4 e C2, sendo então formada a C3 convertase. A C3 convertase cliva C3, expondo o fragmento C3b na superfície do eritrócito, este fragmento interage com a IgG, formando um dímero de potente ação opsonizadora, fazendo com que ocorra um aumento na velocidade do sequestro esplênico de glóbulos vermelhos.^{36, 37}

A opsonização dos eritrócitos por IgG, independentemente da presença do complemento, faz com que os eritrócitos sejam hemolisados pelos macrófagos no baço. Estes macrófagos do baço possuem receptores de membrana específicos (receptores Fc γ) para a fração Fc das IgG, e receptores para C3b (receptores CR1 e CR3). Se a quantidade de IgG for excessiva, os eritrócitos poderão também ser hemolisados no fígado. Tanto no baço, como no fígado, a hemólise por anticorpos IgG é predominantemente extravascular.³⁶

A severidade da doença, depende do subtipo de IgG que está ativando o sistema complemento. Temos 4 subtipos de imunoglobulina G, a saber: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A IgG4 realiza ligações fracas com a porção Fc dos receptores macrófágicos o que provoca pouca ou nenhuma hemólise somado à um teste de antiglobulina direta positivo; a IgG2 apresenta um comportamento variável, que depende do tipo de receptor Fc que o paciente possui predominantemente (determinado por

herança genética); a IgG1 e especialmente a IgG3 são potentes ativadores dos receptores macrófágicos do baço, e por isso são as maiores responsáveis pelos quadros de hemólise extravascular moderada a severa. A hemólise extravascular desencadeada pelas IgG ocorre pois a cascata do complemento que ativam segue até a ativação de C3, não produzindo os complexos de ataque à membrana (MAC), não levando assim à hemólise intravascular.³⁷

Engelfriet et al, em 1968 realizou análises sanguíneas de 572 casos de AIHA por autoanticorpos IgG, com a finalidade de analisar as proporções dos subtipos de imunoglobulinas que mais acometiam os pacientes com anemia hemolítica autoimune por IgG e realizar as correlações entre cada subtipo e o comportamento clínico da doença. De acordo com seus resultados, dos 572 pacientes, 76% apresentavam somente um subtipo de autoanticorpo como opsonizador dos eritrócitos e 24% apresentavam duas ou mais subclasses envolvidas. Ainda, do total de casos, 72% eram compostos por imunoglobulinas do subtipo IgG1, 25% dos pacientes apresentavam IgG1 associada a outra classe e apenas 3% não possuía qualquer envolvimento da IgG1 na fisiopatologia da WAIHA. Evidenciando desta forma a importância da IgG1 e do teste da antiglobulina direta como teste auxiliar no diagnóstico da doença.³⁸

Engelfriet conclui este experimento realizando a correlação entre as subclasses de autoanticorpos IgG e a gravidade da hemólise, para isso foram analisados somente os casos que apresentavam um único subtipo de imunoglobulina. Os resultados se seguem conforme a tabela 5:

Tabela 5: Relação entre subclasses de autoanticorpos IgG e severidade de hemólise:

Nº de pacientes	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Aumento da destruição eritrocitária:
416	+	-	-	-	75,00%
4	-	+	-	-	Nenhum
13	-	-	+	-	100,00%
5	-	-	-	+	Nenhum

Dados de Engelfriet, apud Klein & Anstee³⁸

Na tabela acima, pode-se observar que as imunoglobulinas IgG4 e IgG2

manifestam-se pouco na população estudada e quando aparecem, os pacientes apresentam pouco ou nenhum grau de hemólise. IgG1 é a imunoglobulina de ocorrência mais frequente e concorre com um aumento da destruição celular de 75% (no estudo há uma estreita correlação entre a quantidade de IgG1 na superfície eritrocitária e o aumento da hemólise) e por fim a IgG3, acometeu 13% dos pacientes e foi responsável por um aumento de 100% da destruição eritrocitária. Tal estudo foi muito importante, pois através dele fixou-se a necessidade de determinar as subclasses de IgG, como auxiliar de prognóstico em pacientes com DAT (teste de antiglobulina direta) positivo.³⁸

2.3.2 AIHA desencadeada por autoanticorpos IgM:

Os anticorpos do tipo IgM reagem com maior avidéz a temperaturas abaixo de 37°C (especialmente de 0 a 10°C), por isso foi designado como o principal responsável pela AIHA por anticorpos frios (CAIHA). Este anticorpo IgM é usualmente dirigido contra o antígeno I ou antígenos correlatos na membrana do eritrócito humano. Esta molécula de IgM possui múltiplos locais para fixação ao antígeno e apenas um anticorpo fixado já é suficiente para ativar o sistema complemento. O fato de os macrófagos não possuírem receptores Fc para a IgM, faz com que os eritrócitos opsonizados sejam reconhecidos através da ativação de C3, que gera as subunidades iC3b e C3b. Estas subunidades são reconhecidas pelos macrófagos hepáticos (células de Kupffer) que possuem os receptores aC3b e iC3b em sua superfície. Da interação entre os eritrócitos opsonizados e as células de Kupffer, podem ocorrer dois fenômenos: a fagocitose dos eritrócitos ou a liberação dos eritrócitos e inativação de C3 pelo sistema inativador de C3b/iC3b (que será descrito posteriormente).³⁷

O processo de remoção dos eritrócitos opsonizados com IgM da corrente sanguínea se dá rapidamente, pela intensa vascularização hepática, e o grau de hemólise dependente dos títulos de IgM e C3 ativado na superfície do eritrócito, da temperatura e da quantidade de proteínas do sistema inativador hepático. Ainda, quando há elevado acoplamento de IgM sobre os eritrócitos, são acionados os componentes terminais da via do complemento (C5 a C9) levando à lise eritrocitária também no espaço intravascular, especialmente a baixas temperaturas.³⁷

Assim como os anticorpos IgG se subdividem em subclasses que possuem diferentes níveis de ativação de hemólise, os anticorpos IgM variam em sua capacidade de desencadear ou não as manifestações clínicas de AIHA, são divididos em autoanticorpos frios benignos e patológicos e diferem quanto à sua amplitude térmica, autoaglutinação espontânea, clonalidade, especificidade, e resultado do DAT,³⁹ como sintetizado na tabela 6:

Tabela 6: Diferenças entre autoanticorpos benignos e patológicos:

Características	Autoac. Benignos	Autoac. Patológicos
Amplitude térmica	<22°C	Ampla >32°C
Autoagl. espont. em tubo	Nenhuma	Significativo, com dispersão após aquecimento a 37°C
Título	<64	>1000 a 4°C
Importância clínica	Nenhuma	Causa de CAIHA
Clonalidade do anticorpo	Policlonal	Idiopático: monoclonal Secund. à infecção: policlonal
Especificidade do anticorpo	Anti-I	Anti-I ou anti-P
DAT	Negativo ou fracamente positivo	Positivo

Harmening, D. M apud Harmening, Prihoda & Green.³⁹

2.3.3 O sistema inativador de C3:

O sistema inativador de C3, faz parte de um amplo sistema de regulador, que impede e na maioria das vezes reduz o impacto do sistema complemento sobre as células do próprio organismo. Sobre a superfície das células, carboidratos dotados de carga, como o ácido siálico permitem a atividade dos fatores I e H, responsáveis pela inativação de C3 e C3b em iC3b, C3dg e C3d. Ao contrário, a superfície das bactérias, não contendo estes carboidratos dotados de carga, não permitem que a atividade de C3 seja prejudicada, este é o conceito de sítio protegido (para a atividade de C3).³⁶

Este sistema desempenha um papel muito importante na redução dos impactos da hemólise por anticorpos IgM, ao regular o número de fragmentos de C3 ativos na superfície do eritrócito. Os eritrócitos com C3 inativado não conseguem se ligar aos

receptores aC3 na superfície dos macrófagos e continuam a circular pela corrente sanguínea com sobrevida normal. Desta forma o teste antiglobulina direto continua detectando altos níveis de C3 porém o paciente não apresenta manifestação da doença.^{36, 38}

2.3.4 A hemolisina fria de Donath-Landsteiner:

A hemolisina fria de Donath-Landsteiner refere-se à um autoanticorpo de classe IgG, que se dirige contra o autoantígeno eritrocitário P e exerce o seu pico de atividade a temperaturas inferiores a 22°C, comportando-se como uma IgM e com incrível capacidade de fixação do complemento, até a formação das MAC (complexo de ataque à membrana). Quando o organismo retorna à sua temperatura normal, este anticorpo se desliga do eritrócito e ocorre a hemólise intravascular. O anticorpo de Donath-Landsteiner tem sido muito associado a quadros infecciosos ou pós-infecciosos. Foi descrito inicialmente em casos de sífilis terciária e congênita, posteriormente houveram vários relatos de casos de hemoglobinúria paroxística fria em crianças após quadros de infecções virais.^{38, 40}

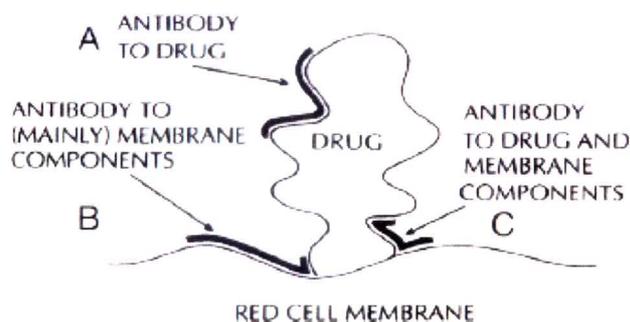
2.3.5 A fisiopatologia das AIHA desencadeadas por fármacos:

AIHA desencadeada por fármacos, têm sido um objeto de estudo recente, iniciado na década de 50 e tem mudado bastante até os dias atuais. A primeira hipótese que vigorou até o final de década de 70 era a de que a droga na corrente sanguínea se combinava com imunoglobulinas e o complexo droga/anticorpo atacava eritrócitos, plaquetas e leucócitos. Depois surgiram outros conceitos como o de que a droga se ligava inicialmente à membrana eritrocitária, chamado mecanismo de adsorção de drogas, que poderiam provocar a produção de 3 tipos básicos de anticorpos: a) anticorpos contra a droga, b) anticorpos contra as proteínas de membrana dos eritrócitos, e c) anticorpos contra o complexo droga/proteína de membrana.³⁴

Hoje a teoria mais moderna sobre a fisiopatologia das DIAIHA, proposta nesta primeira década do século XXI, é a teoria unificada (Muller-Eckardt & Salama apud Garratty, 2010) em que o fármaco para ser imunogênico necessita ter uma massa molecular maior que 1000kD, o que se observa é que na maioria dos casos são

menores, agindo como haptenos na corrente sanguínea. Assim, os haptenos só se tornam imunogênicos se combinados com proteínas carreadoras. Uma vez combinados a estas proteínas, estes complexos podem estimular a produção de anticorpos exclusivos contra o fármaco, contra uma grande porção de membrana plasmática, ou contra fármaco e proteína de membrana (de acordo com o quadro 2).^{34, 35} Tais mecanismos podem ocorrer isoladamente ou em conjunto, num mesmo paciente. Nos livros didáticos atuais ainda figuram as teorias sobre a produção de complexos imunes, ou complexos ternários tendo como modelo a Quinina, a teoria da adsorção de drogas, tendo a Penicilina como protótipo, e a divisão laboratorial das DIAIHA em dependentes e independentes da presença de fármacos. A figura abaixo ilustra o exposto sobre a teoria unificada:

Quadro 2: Fisiopatologia das DIAIHA:



Garratty et al, 2010³⁵

A respeito da divisão entre DIAIHA dependente e independente da presença de fármacos, hoje sabemos que decorre da avidéz com que o fármaco induz a fixação da imunoglobulina à proteína de superfície do eritrócito. Assim, mesmo diante de uma clínica sugestiva de anemia hemolítica autoimune, drogas com baixo poder de fixação de imunoglobulinas produzirão DAT negativos, sendo necessária a realização do teste de antiglobulina indireto, na presença do fármaco. Outros medicamentos, entretanto, induzem uma ávida fixação de imunoglobulinas às proteínas eritrocitárias, resultando em DAT positivo sem a necessidade de qualquer adição de fármacos.

Fármacos com alto poder de fixação de imunoglobulinas, laboratorialmente tidas

como fármaco independentes, podem fazê-lo através da indução de anticorpos à grandes áreas da membrana eritrocitária e pequenas áreas correspondentes ao fármaco, como no exemplo B da figura; ou à exposição de autoantígenos eritrocitários ocultos, ou ainda à indução de mimetismo molecular.^{34, 35}

2.3.6 Fisiopatologia da hemólise imunomediada na AIHA:

Anemias hemolíticas fazem parte de um quadro patológico em que há uma diminuição da meia vida eritrocitária pelo aumento da hemocatérese, quer seja intravascular ou extravascular.³⁷ De modo geral, a hemólise só pode ser observada quando a sobrevivência dos eritrócitos estiver inferior a 30 dias, quando a eritropoiese começa a se tornar ineficaz. A hemólise imunomediada depende de um fenômeno básico, que é a opsonização eritrocitária, e esta se dá pela ligação com as imunoglobulinas de classe G e pela ativação do sistema complemento com a ocorrência de C3b (ou C3 ativada).

Na hemólise imunomediada, a forma extravascular é a mais comum, pois a presença de IgG estimula avidamente os receptores Fc γ dos macrófagos esplênicos, nos cordões de Billroth e a presença de da IgM estimula a produção de C3b que por sua vez estimula a fagocitose eritrocitária pelas células de Kupffer no fígado, ocorrendo assim a hemólise extravascular. A hemólise extravascular por IgG tende a provocar esplenomegalia e sintomas dolorosos em quadrante superior esquerdo do abdome, pois a intensidade da hemólise é intensa e o fluxo eritrocitário pelos canais de Billroth é lento, associado aos sinais inflamatórios envolvidos, levam à verdadeiro ingurgitamento esplênico. Já a hemólise extravascular por IgM, raramente causaria hepatomegalia ou sintomas dolorosos em quadrante superior direito do abdome, pois o fluxo vascular no fígado é elevado e consegue ser resiliente à um aumento temporário de demanda.^{38, 40, 41}

Já a hemólise intravascular imunomediada deve-se ao sistema complemento que consegue ativar a sua cascata integralmente, construindo o seu complexo de ataque à membrana, ou à presença de uma potente hemolisina (como a de Donath-Landsteiner) que levam à lise celular e extravasamento do conteúdo intracelular para o plasma. A liberação de hemoglobina diretamente na corrente sanguínea

leva à um quadro de hemoglobinúria (na ausência de hemácias), e esta, se muito intensa ou prolongada pode levar à um quadro de necrose tubular aguda.^{40, 41}

2.4 Diagnóstico:

2.4.1 Manifestações clínicas:

A AIHA, manifesta-se inicialmente com uma sintomatologia comum a todas as anemias hemolíticas. De modo geral, os sintomas de uma anemia dependem da capacidade da medula óssea em repor a celularidade sanguínea, ou seja, se há uma eritropoiese eficaz ou ineficaz.

Pacientes com anemia crônica e eritropoiese eficaz são oligossintomáticos ou assintomáticos na maioria dos casos. Porém, à medida que a reposição de hemácias pela medula óssea não consegue suprir a sua perda, a eritropoiese passa a se tornar ineficaz. Surgem então sintomas que variam de acordo com a velocidade de instalação da anemia e da capacidade de reserva dos órgãos diante da baixa demanda de O₂ e nutrientes. Este conjunto de sintomas é conhecido como “síndrome anêmica” e estão listados na tabela 5, bem como suas variações de acordo com sua velocidade de instalação.⁴²

Tabela 7: Sintomatologia da síndrome anêmica em relação à gravidade da anemia:

	Cardiovasculares	Pulmonares	Neurológicas	Gerais
Leve	Taquicardia aos médios e grandes esforços	Dispneia aos médios e grandes esforços	Pouco observadas	Palidez cutânea e de mucosas variável
Moderada	Taquicardia aos pequenos esforços e hipotensão ortostática	Dispneia aos pequenos esforços	Pouco observadas	Palidez cutânea e de mucosas variável
Severa	Taquicardia em repouso, hipotensão não ortostática, síncope	Dispneia em repouso, necessitando suplemento de O ₂	Queda da função cognitiva, agitação e ansiedade	Diaforese, Intensa palidez cutânea e de mucosas

Adaptado de Kenneth S. Zuckerman⁴²

A hemólise, por sua vez, pode se manifestar de forma aguda, com anemia severa,

icterícia leve e febre. A hemoglobinúria, caracterizada por urina avermelhada ou acastanhada, direciona o raciocínio para uma hemólise intravascular e geralmente está acompanhada por febre e lombalgia. Já a hemólise crônica, cursa com anemia oligossintomática; o aumento contínuo de bilirrubina indireta predispõe ao surgimento de cálculos biliares, em maior parte compostos por bilirrubinato de cálcio e visíveis à radiografia abdominal.³⁷

Na tabela abaixo o trabalho publicado por Alwar et al, 2010, lista os sinais e sintomas mais frequentemente observados numa amostra de 175 pacientes com AIHA:

Tabela 8: Sinais e sintomas em 175 pacientes com AIHA em um hospital em Bangalore – Índia:

Sinais	Primária	Secund.	Sintomas	Primária	Secund.
Hepatomegalia	19	36	Fadiga	26	37
Esplenomegalia	18	28	Febre	8	51
Linfadenopatias	1	12	Dor articular	0	22
Ausência de sinais	2	59	Dor abdominal	2	8
			Sangramento	4	11
			Infecção	0	6

Alwar et al, 2010³⁰

Neste estudo, pode-se observar que dos 175 pacientes, 40 (22,8%) apresentavam AIHA primária cujo sintoma mais frequente foi a fadiga (65% das AIHA primárias), depois febre (20%) e o sangramento (10%), dos sinais está a hepatomegalia (47,5%), e a esplenomegalia (45%). Na AIHA secundária os sintomas mais frequentes foram a febre (37,8%), fadiga (27,4%), dor articular (16,3%) e o sangramento (8,1%), dos sinais a ausência de sinais prevaleceu (43,7%), em seguida está a hepatomegalia (26,6%), a esplenomegalia (20,7%) e as linfadenopatias (8,9%).³⁰

2.4.1.1 Comportamento clínico das WAIHA:

A patologia mediada pelos autoanticorpos de classe IgG pode ser de intensidade amplamente variável, de acordo em grande parte com a subclasse de IgG que opsoniza o eritrócito. Relembrando a pesquisa de Engelfriet, a subclasse de IgG

mais frequentemente detectada era a IgG1, presente em 72% dos pacientes. A IgG1 é uma potente opsonina e produz forte ativação do sistema complemento até a molécula de C3 ativada.³⁸ Assim, o curso da maioria das WAIHA é de início súbito a moderado, de dias a semanas, que leva à uma anemia súbita a moderada, onde os pacientes podem se queixar de fadiga intensa, taquicardia, hipotensão postural, tremores. Dor em quadrante superior esquerdo.

Os sinais mais frequentemente observados são a palidez de mucosas, a esplenomegalia à palpação do abdome e icterícia leve. A urina escura é um sinal incomum na WAIHA, primeiro porque a bilirrubina indireta se eleva numa quantidade insuficiente para produzir urobilinogênio, de forma que a hemólise extravascular precisa ser maciça para provocar hemoglobinúria.^{32, 42} Quanto mais agudo for o curso clínico desta doença, maiores as chances de o paciente apresentar febre, taquicardia, taquipneia, angina, falência cardíaca e hepatoesplenomegalia.³¹

2.4.1.2 Comportamento clínico das CAIHA:

Mesmo que a CAIHA seja subdividida em síndrome das crioaglutininas e hemoglobinúria paroxística fria e suas imunoglobulinas sejam de classes diferentes, são clinicamente semelhantes, desencadeando os sintomas quando o paciente se expõe a baixas temperaturas. Na CAIHA 90% dos pacientes apresentam crises de acrocianoses e fenômenos de Raynaud quando expostos ao frio.⁴³

2.4.1.2.1 A síndrome das crioaglutininas:

A síndrome das crioaglutininas (CAS), faz-se presente em torno de 15% do total de casos de AIHA,³¹ acometendo indivíduos de meia-idade a idosos, com um pico de incidência aos 66 anos. Quando chega a acometer crianças, adolescentes e adultos jovens está muitas vezes associada a quadros pós-infecciosos (apresentando-se como uma doença secundária). A sintomatologia do paciente varia muito de acordo com a amplitude térmica da IgM que possui, quanto maior a amplitude, mais sinais e sintomas o paciente apresentará.⁴⁴

Os sinais e sintomas mais frequentes são os de uma anemia crônica, com astenia, dispneia aos esforços e palidez de mucosas. A hemoglobinúria mostra-se um sinal raro nesta doença, e quando ocorre está geralmente associada a outros sinais como acrocianose e fenômeno de Raynaud, após uma exposição ao frio. Porém não costuma ser uma hemoglobinúria importante a ponto de causar algum prejuízo renal. A acrocianose, necrose e o fenômeno de Raynaud podem também ocorrer, as duas primeiras pela aglutinação das hemácias quando expostas a baixas temperaturas e o fenômeno de Raynaud em resposta à exposição dos vasos há um aumento abrupto e local de cininas e fatores do complemento.^{36, 44}

Os sinais e sintomas de hemólise também são esperados, como elevação de bilirrubina indireta e icterícia leve, em alguns pacientes pode-se encontrar um ligeiro aumento esplênico e hepático.^{42, 44.}

2.4.1.2.2 A hemoglobinúria paroxística fria (PCH):

Este tipo de CAIHA é pouco frequente na população, e as estatísticas entre os autores não possuem um consenso. Em comum, observa-se a descrição de que é uma doença que acomete em maior parte crianças e adolescentes, com pico de incidência em torno dos 5 anos de idade e está associada a doenças infecciosas na maioria dos casos. Possui início agudo, remissão rápida e maior prevalência entre crianças do sexo masculino, numa proporção de 2.1:1 em relação às do sexo feminino.⁴⁴

O paciente geralmente relata uma história de sintomas respiratórios semelhantes à um resfriado, 1 a 2 semanas antes do quadro clínico atual. Chegam ao consultório com um quadro de anemia aguda; febre e hemoglobinúria também são relatados na maioria dos pacientes com PCH (neste caso a hemoglobinúria pode ser intensa e levar à um quadro de NTA, sendo importante o monitoramento da função renal do paciente).

2.4.1.3 Comportamento clínico das MAIHA:

As anemias hemolíticas mistas correspondem em média a 7% do total de casos de

AIHA, segundo Sokol et al. Podem muitas vezes apresentar manifestações clínicas semelhantes à um quadro de PCH, no tópico diagnóstico laboratorial a diferença entre estas duas entidades nosológicas ficará mais clara.⁴⁴

Nos casos de MAIHA, os pacientes apresentam autoanticorpos de classe IgG e IgM em atividade sob uma ampla variabilidade térmica, ou seja, a hemólise ocorre continuamente. O paciente apresenta uma anemia abrupta e severa assim como todos os sinais e sintomas clínicos de uma hemólise também abrupta e severa. Respondem inicialmente de forma excelente à instituição da corticoterapia, porém ao longo do tempo, a MAIHA apresenta-se indolente, com períodos de remissão e exacerbação, tornando-se uma anemia hemolítica crônica.⁴⁴

2.4.1.4 Comportamento clínico das DIAIHA:

No caso das anemias hemolíticas induzidas por drogas, na imensa maioria dos casos há uma estreita relação entre a administração da droga e o início abrupto dos sintomas (em horas após a administração). As manifestações clínicas são as de uma anemia hemolítica aguda e intra e extravascular, anemia moderada a severa, icterícia leve, urina escurecida ou avermelhada, febre e dor lombar.²

Os fármacos mais frequentemente envolvidos no desencadeamento de DIAIHA, além dos já analisados por Garratty et al, 2009, a saber: Metildopa, que induz a produção de autoanticorpos em 15% de seus usuários e 0,5-1% dos usuários desenvolvem AIHA; Cefotetan, Ceftriaxone, e outras cefalosporinas são atualmente os maiores agentes terapêuticos implicados no desenvolvimento de DIAIHA, especialmente o Cefotetan, responsável por mais de 50% de todas as DIAIHA encontradas hoje, seu comportamento clínico é o de uma AIHA com hemólise aguda, de elevada mortalidade (10,6% dos pacientes com DIAIHA por Cefotetan morrem) que inicia-se uma semana após administração do medicamento e segue por mais de 60 dias após a descontinuação da droga, com DAT e IAT fortemente positivos; o Ceftriaxone mesmo não sendo o mais frequente desencadeador de DIAIHA é leva à maior mortalidade, com 34,5% casos fatais; relatos frequentes sobre os inibidores de β -lactamase e Piperacilina também são comuns na literatura;³⁴ merecerem ser lembrados também o Quinino, Levodopa, Sulfonamidas,

Sulfoniluréia, Clorpromazina, os anti-inflamatórios Diclofenaco, Ibuprofeno, Fenoprofeno. Relatos de casos recentes tem sido descritos com a Fludarabina para o tratamento de CLL, entretanto mais estudos são necessários para triar entre a AIHA desencadeada pela neoplasia e a desencadeada pela droga usada em seu tratamento.

2.4.2 A investigação laboratorial:

2.4.2.1 Os exames iniciais para a triagem diagnóstica:

A partir de uma sintomatologia sugestiva de anemia, iniciamos uma investigação diagnóstica geral. Assim, deste ponto em diante os autores divergem bastante, de forma que, alguns consideram iniciar a investigação com uma dosagem de reticulócitos e análise de esfregaço de sanguíneo,⁴² outros relatam a importância em se solicitar a dosagem de reticulócitos e o teste de antiglobulina direta (DAT),³¹ enquanto Gehrs & Friedberg e Packman propõem uma investigação contendo o DAT, esfregaço sanguíneo, dosagem de bilirrubinas, LDH (isoenzima I), haptoglobina e EAS 1.^{2, 32} Ainda, Lechner & Jäger recomendam iniciar a investigação laboratorial com o hemograma, contagem de reticulócitos, dosagem de haptoglobina, LDH, bilirrubinas e o DAT.⁴⁵ O Ministério da Saúde sugere apenas o acréscimo do teste de antiglobulina direta aos demais exames para diagnóstico etiológico das anemias.⁴⁶

Todos parecem expressar a preocupação em diferenciar as anemias hemolíticas das não-hemolíticas, e é este o ponto chave no início da investigação laboratorial para o diagnóstico das AIHA. Várias são as causas de anemias hemolíticas, dentre elas temos as causas hereditárias, como as hemoglobinopatias, os defeitos do citoesqueleto, os defeitos enzimáticos; e as adquiridas, como as hemolíticas imunes a qual pertencem as AIHA, anemias decorrentes de hiperesplenismo, ou da insuficiência hepática grave, a hemoglobinúria paroxística noturna, as anemias microangiopáticas, e as decorrentes de lesões físicas ou químicas extensas.³⁷

No quadro 3 estão listados os exames mais solicitados no início da investigação laboratorial para o diagnóstico das anemias:

Quadro 3: Os exames mais solicitados na investigação inicial das anemias, suas funções e resultados esperados na AIHA:

Exame	Objetivo	AIHA
Hemograma	Triar as anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas	Anemia normocrômica e normocítica ou macrocítica
Contagem de reticulócitos	Avaliar a responsividade medular	Na maioria dos casos está elevada
Esfregaço de sangue periférico	Detectar sinais hematológicos que sugiram hemólise	Esferócitos e microesferócitos, policromasia, eritrócitos nucleados, eritrofagocitose, eritrócitos em roseta
Haptoglobina	Detectar sinais de hemólise	Abaixo do normal
LDH (isoforma I)	Detectar sinais de hemólise	Elevada
Bilirrubina indireta	Detectar sinais de hemólise	Elevada
Ureia e Creatinina	Detectar sinais de queda da função renal decorrentes de hemólise severa	Elevadas nos casos de hemólise intravascular, mais encontradas na CAIHA (PCH) e DIAIHA

Adaptado de Alan D. Shreiber.³⁷

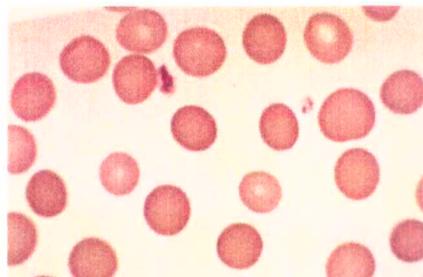
Dentre alguns exames de triagem, foram encontrados em média, hiperbilirrubinemia em 80% dos pacientes com AIHA, aumento de DHL (desidrogenase láctica) e reticulócitos em 100% dos pacientes e um teste de antiglobulina direto por hemaglutinação positivo em 90% dos pacientes e em 95% com DAT por citometria de fluxo.⁴⁷

As anemias intravasculares diferenciam-se das extravasculares pelo surgimento de hemoglobinúria e a hemossiderinúria ao EAS; ao hemograma observa-se além de um consumo acentuado de haptoglobinas, uma redução nos níveis de hemopexina livre, aumento nos níveis de hemopexina conjugada ao heme e metemalbuminemia (albumina conjugada ao heme). Clinicamente observa-se urina escurecida ou avermelhada, febre, calafrios, dor abdominal e lombalgia.³⁷

As figuras 4, 5 e 6 retratam os achados mais comumente observados na análise de esfregaço sanguíneo de pacientes com AIHA. O quadro 4 mostra uma imagem de esferócitos, que se formam quando hemácias opsonizadas passam pelo sistema reticuloendotelial e perdem partes de sua membrana, tornando-se rígidas e rompendo-se com facilidade. O quadro 5 é uma foto de uma hemólise por AIHA tal como vista ao microscópio e evidencia intensa hemaglutinação eritrocitária. O quadro 6 mostra foto de microscopia eletrônica de um macrófago em roseta, o

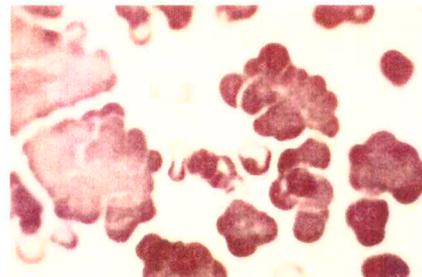
macrófago ao centro, lança pseudópodes para fagocitar os esferócitos à sua volta.

Quadro 4: Esferócitos



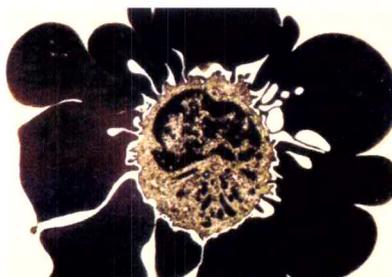
Microscopia óptica de esferócitos com aumento de 100x. Coloração May – Grunwald – Giemsa. Livro: Doenças dos eritrócitos, Dr. Paulo César Naoum.⁴⁸

Quadro 5: Hemólise vista ao microscópio



Esfregaço de sangue periférico à microscopia óptica. Coloração Giemsa (método Romanovsk). Livro: Doenças dos eritrócitos, Dr. Paulo César Naoum.⁴⁸

Quadro 6: Macrófago com hemácias em roseta



Microscopia eletrônica de macrófago e eritrócitos em roseta. Coloração Leishman. Doenças dos eritrócitos, Dr. Paulo César Naoum⁴⁸

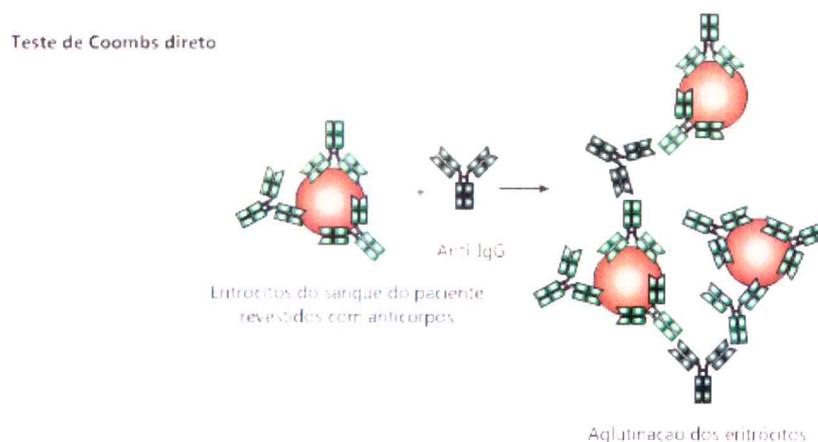
2.4.2.2 A detecção laboratorial de autoimunidade:

O exame padrão para a detecção de autoimunidade é o teste de antiglobulina direto (DAT) que avalia a presença de anticorpos do tipo IgG, IgA e porção C3d do complemento na superfície eritrocitária. A antiglobulina humana (AGH) é uma imunoglobulina produzida através da sensibilização de cabras, ou coelhos com imunoglobulinas humanas. O DAT é usado para verificar a opsonização de hemácias por anticorpos ou frações do complemento; ao adicionar o soro contendo antiglobulinas sobre hemácias opsonizadas ocorre a hemaglutinação. O DAT clássico é realizado em tubo de ensaio é considerado o teste padrão-ouro, mas possui uma sensibilidade limitada em que 1-10% dos pacientes apresentam resultados falsos negativos, pois só consegue hemaglutinar quando as hemácias

estão recobertas com mais que 200 moléculas de IgG, ou mais que 400 moléculas de IgM na superfície eritrocitária. A metodologia da técnica do DAT necessita que sejam observados alguns cuidados como por exemplo o procedimento de lavagem dos eritrócitos, que em excesso pode retirar autoanticorpos demais e pouca lavagem pode incorrer em falsos positivos.⁴⁰ Além do DAT outros testes mais modernos têm sido utilizados, como a citometria de fluxo, o teste manual direto do Polybrene e o ELAT, porém seus custos costumam ser muito mais elevados bem como o tempo e técnica investidos.⁴⁹

A figura abaixo ilustra o mecanismo básico do teste de antiglobulina direta, onde as hemácias contendo anticorpos, ou a fração C3 do sistema complemento em sua superfície são reconhecidas por antiglobulinas e anticorpos anti-C3d, provocando hemaglutinação.⁴⁰

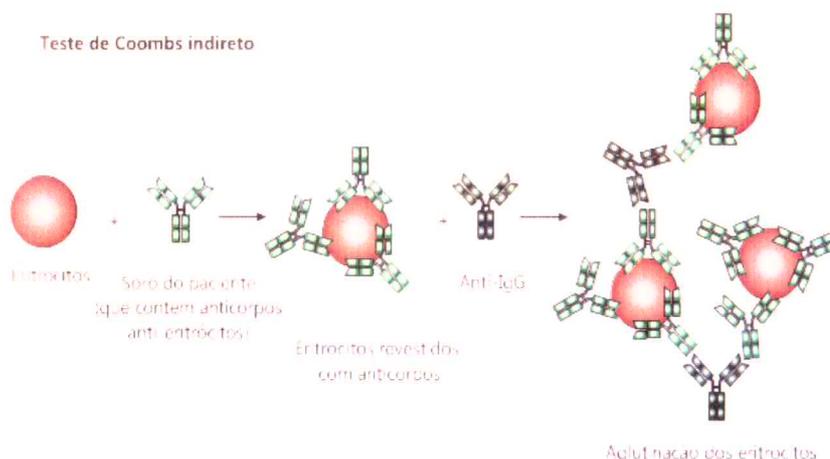
Quadro 7: Teste de antiglobulina direto



Livro: Fundamentos de imunologia. AROSA, F. A. et al.⁵⁰

O teste de antiglobulina indireto (IAT) avalia a presença de anticorpos no plasma, não ligados às hemácias. O IAT é muito utilizado para detecção de aloanticorpos no diagnóstico de reação transfusional aloimune. Muitas vezes, uma clínica sugestiva de AIHA, com um DAT negativo ou fracamente positivo necessita ser complementado com o IAT para avaliação da presença de anticorpos no soro do paciente.³⁸ A sensibilidade do DAT e IAT pode ser aumentadas utilizando-se a técnica em gel, que não precisa passar por nenhuma etapa de lavagem de hemácias, aumentando as chances de detecção de autoanticorpos.⁴⁰

Quadro 8: Teste de antiglobulina indireto



Livro: Fundamentos de imunologia. AROSA, F. A. et al.⁵⁰

Quando o DAT é positivo, duas novas amostras de lavados eritrocitários são separadas e recebem soro anti-IgG e soro anti-C3d respectivamente, também chamada de técnica “split”, gerando três padrões básicos de respostas. Packman et al,2008 descreve estes três padrões básicos de reatividade para o DAT, que fornecem pistas quanto ao diagnóstico do tipo de AIHA que está acometendo o paciente, onde: 1) As hemácias reagem somente a IgG. 2) Hemácias reagem à IgG e ao complemento. 3) Hemácias reagem somente ao complemento.³² Cada padrão está relacionado a uma maior prevalência de determinado tipo de AIHA, como na tabela 9:

Tabela 9: A interpretação do DAT 'split'

Pistas para o diagnóstico diferencial das AIHA através do DAT:	
Teste de antiglobulina direta	Diagnóstico diferencial
Positivo somente para IgG	Sugestivo de WAIHA em 20-66% dos casos, ² DIAIHA por haptenos ou DIAIHA verdadeira
Positivo somente para C3d	Sugestivo de WAIHA em 7-14% dos casos, ² CAS, PCH ou DIAIHA por complexos ternários
Positivo para IgG e C3d	Sugestivo de WAIHA em 24-63% dos casos, ² ou DIAIHA verdadeira.

Adaptado de Packman et al,³² e Gehrs & Friedberg²

2.4.2.3 Os exames específicos para o diagnóstico do tipo de AIHA:

Após a triagem inicial, o médico tem subsídios para avaliar se seu paciente possui uma anemia hemolítica autoimune, após descartarem-se as possibilidades de aloimunidade por transfusões. Faz-se necessário neste momento saber qual o tipo de AIHA deste paciente. Para isso é necessário saber qual o tipo de anticorpo envolvido.

Um DAT monoespecífico com antiglobulinas humanas para IgG (no Brasil chamado teste de Coombs anti-IgG humana, ou teste de Coombs- γ) e outro específico para C3b (no Brasil conhecido como teste de Coombs anti-C3b humano, ou teste de Coombs não γ) direciona o raciocínio clínico. Também existem os testes de antiglobulina direta para IgA e IgM. Dentre os DAT, tanto os poliespecíficos como os monoespecíficos podem ser realizados através da técnica de tubo ou de gel-teste, sendo esta comprovadamente mais sensível para a detecção das imunoglobulinas. Segundo Chaudhary et al,2007, a técnica de gel-teste tem uma sensibilidade de 98,4% e o teste convencional com tubo de 95,2%. A concordância entre os dois testes foi de 96,4% com reagente poliespecífico e de 95,7% com o reagente monoespecífico para IgG.⁵¹

Os títulos de autocrioaglutininas são preconizados pelo Ministério da Saúde para exclusão de uma possível CAIHA, muitas vezes previamente sugerida por um DAT positivo para C3d ou para C3d associado a IgG. Seu resultado é positivo quando os títulos forem superiores a 1:40.⁴⁶ Este exame tornou-se importante pela dificuldade em se detectar os anticorpos IgM sobre a superfície das hemácias. A estrutura pentamérica das IgM torna-as excelentes ativadoras do sistema complemento porém com fraca capacidade de se prenderem à superfície celular, sendo facilmente removidos com os procedimentos de lavagem. A temperatura é uma variável importante para a capacidade de fixação das IgM, por isso a hemaglutinação direta deverá ser observada em diferentes temperaturas para se determinar a amplitude térmica desta AIHA, quanto maior a amplitude térmica maior a gravidade da CAIHA, mesmo que os títulos das autocrioaglutininas não estejam muito elevados.⁵²

2.4.2.4 Perfil laboratorial das WAIHA:

Os pacientes com WAIHA apresentam em sua maioria evidências laboratoriais de hemólise e um DAT poliespecífico com sensibilidade em torno de 95% para AIHA por anticorpos quentes². O teste de antiglobulina direta monoespecífico para IgG é positivo, contando com uma especificidade de 100%.^{2, 52} Este DAT monoespecífico para IgG pode estar associado à um DAT monoespecífico positivo para IgA e menos frequentemente para IgM. O DAT positivo revela a presença de anticorpos com elevada afinidade hemática, enquanto o IAT positivo revela a presença de anticorpos no soro com potencial capacidade de fixação hemática, este espectro de afinidade deve ser analisado, onde um DAT fortemente reativo fala a favor de um processo autoimune, enquanto somente um IAT positivo (e um DAT negativo) fala a favor de um processo aloimune.³²

2.4.2.5 Perfil laboratorial das CAIHA:

Segundo o Ministério da Saúde, os critérios para o diagnóstico de AIHA por anticorpos frios incluem as evidências laboratoriais gerais de AIHA e o diagnóstico do subtipo de AIHA, de forma que são necessários: 1) hemograma que comprove anemia, no mínimo moderada < 10g/dl; 2) DAT poliespecífico positivo; 3) sinais laboratoriais de hemólise, como reticulocitose, diminuição de haptoglobinas e aumento de LDH; 4) teste de antiglobulina direta monoespecífico para C3d positivo ou teste de Donath-Landsteiner positivo e 5) pesquisa do título de crioglutinas superior a 1:40.⁴⁶ Na CAIHA é muito frequente a presença de autoanticorpos benignos, de baixa amplitude térmica, e muitas vezes responsáveis por resultados falsos positivos na tipagem sanguínea ABO e Rh

2.4.2.5.1 Perfil laboratorial da CAS:

Na síndrome das crioglutinas os autores observam comumente uma anemia moderada com hemoglobina entre 11-9 g/dl, haptoglobina moderadamente diminuída, reticulócitos, bilirrubina indireta e LDH moderadamente elevados e uma contagem de plaquetas e leucócitos normais na maioria dos casos. No exame de esfregaço de sangue periférico, aglutinação, policromasia, esferócitos, poiquilócitos

e anisocitose são achados usuais. O DAT é positivo para anticorpo anti-C3. Sabida a possibilidade de uma CAS através do DAT positivo para C3, deve-se estar atento às crises hemolíticas intravasculares com elevado consumo de haptoglobinas, hemoglobinúria e possível queda da função renal.² A pesquisa do título de crioaglutininas e sua amplitude de reação térmica são muito importantes e fatores determinantes do prognósticos destes pacientes. Na CAS os títulos frequentemente encontrados são superiores e 1:1000 numa amplitude térmica de 0-4°C, quanto maiores os títulos e a amplitude térmica mais reservado é o prognóstico da doença.²

2.4.2.5.2 Perfil laboratorial da PCH:

Como dito em tópicos anteriores, a hemoglobinúria paroxística fria (PCH) cursa com o aumento de anticorpos IgG atípicos, que se comportam como IgM de elevada amplitude térmica. Na PCH o hematócrito e hemoglobina apresentam níveis muito diminuídos,² a hemoglobina geralmente encontra-se em torno de 5g/dL.⁴⁵ É usual encontrar reticulopenia e leucopenia na fase aguda da doença^{2, 45} e reticulocitose somada a leucocitose na fase tardia.² Os sinais laboratoriais de hemólise são bem pronunciados, com aumento importante de LDH, bilirrubina indireta, e esfregaço de sangue periférico contendo esferocitose, anisocitose, poiquilocitose e pontilhados basofílicos e muitas vezes eritrofagocitose.⁴⁴ Apesar da queda inicial da hemoglobina, uma hemoglobina elevada associada a redução intensa de haptoglobina ao hemograma e ainda, hemoglobinúria e metemoglobina ao EAS revelam hemólise aguda e os profissionais devem estar atentos para o risco de falência renal com elevação das escórias nitrogenadas e em última instância necrose tubular aguda.²

As hemolisinas bifásicas de Donath-Landsteiner são positivas ao DAT para C3 e negativas para IgG em temperatura ambiente. O DAT monoespecífico para IgG só é positivo se realizado a baixas temperaturas, pois nestas temperaturas os autoanticorpos atípicos estão sobre a superfície das hemácias iniciando a fixação do sistema complemento, e a hemólise ocorre posteriormente por volta dos 37°C.² O teste específico para as hemolisinas bifásicas é chamado teste de Donath-Landsteiner, e consiste em incubar hemácias normais no soro do paciente a 0°C,⁴⁴

por 30 minutos,² e depois transferir o recipiente para nova incubação a 37°C,⁴⁴ por 1h,² ao final observa-se a presença da hemaglutinação e sua intensidade.

A determinação da especificidade do anticorpo tem sido relevante para pesquisas e produção científica. Estas imunoglobulinas em sua maioria expressam especificidade para o antígeno P da membrana eritrocitária.⁴⁴ A tabela 10, faz uma comparação entre os anticorpos encontrados na CAS e PCH:

Tabela 10: Comparação entre anticorpos na CAS e PCH:

	CAS	PCH
Títulos (a 4°C)	Elevados (>500)	Moderado (~ 64)
Amplitude térmica	Elevada (>30°C)	Moderada (>20°C)
Teste de Donath-Landsteiner	Negativo	Positivo
Classe de imunoglobulina	IgM	IgG
Especificidade	Anti-I ou i	Anti-P

Lawrence Petz, 2008⁴⁴

2.4.2.6 Perfil laboratorial da MAIHA:

As anemias hemolíticas mistas possuem um DAT monoespecífico positivo para C3d e IgG e apresentam hemaglutinação a 37°C e entre 0-10°C.²⁸ O lavado eritrocitário apresenta um autoanticorpo IgG panreativo de modo semelhante à WAIHA.²

2.4.2.7 Perfil laboratorial da DIAIHA:

O diagnóstico de cada um dos subtipos de DIAIHA pode ser presumido pela análise da história clínica e exames laboratoriais. Nela o DAT poliespecífico é usualmente positivo e os DAT monoespecíficos podem apresentar uma ampla variedade de configurações, sendo IgG+, IgG e C3d+ ou C3d+ isoladamente, porém a frequência de IgG é muito maior em relação às outras imunoglobulinas.³⁴ Gehrs & Friedberg propõem que na suspeita de DIAIHA, o DAT seja realizado na presença e na ausência do fármaco, possibilitando a detecção de autoimunidade em um espectro mais amplificado.²

2.5 Diagnóstico diferencial:

O raciocínio do diagnóstico diferencial deve ser feito em três frentes, primeiro o médico faz a triagem dentre as anemias hemolíticas, segundo, faz o diagnóstico diferencial entre os tipos de AIHA (discutidos no item sobre diagnóstico) e terceiro busca diferenciar as AIHA primárias das secundárias.

2.5.1 A AIHA e as anemias hemolíticas hereditárias:

À análise de esfregaço sanguíneo, as AIHA podem se parecer às anemias hemolíticas hereditárias que cursam com esferocitose, especialmente a esferocitose hereditária, uma doença causada pela deficiência de proteínas do citoesqueleto, como a espectrina, anquirina, proteínas banda 3 e proteína 4.2, fazendo com que as hemácias percam sua conformação bicôncava, e assumindo a forma de esferócitos. Estes esferócitos ficam capturados no baço, onde ocorre hemólise extravascular. As hemácias que escapam da hemólise, perdem partes de suas membranas e se tornam microesferócitos. Na esferocitose hereditária assim como na eliptocitose hereditária, na ovalocitose do sudeste da Ásia, xerocitose ou estomatocitose hereditárias, um DAT negativo afasta a hipótese de AIHA.⁵³

A deficiência de G6PD (glicose 6-fosfato) também é uma anemia hemolítica hereditária, que leva à redução da meia-vida eritrocitária; as crises hemolíticas nesta doença são causadas mais frequentemente por infecções ou uso de medicamentos. Ao esfregaço sanguíneo a oxidação precoce da hemoglobina forma os corpúsculos de Heinz, que fixam-se às proteínas banda 3 de membrana tornando-se neoantígenos que estimulam reações autoimunes por IgG. No baço estes neoantígenos associados aos anticorpos são fagocitados, gerando hemólise e células mordidas; a oxidação dos lipídeos de membrana também pode levar à ruptura eritrocitária e hemólise intravascular; na deficiência de G6PD o diagnóstico diferencial é feito não pelo DAT, mas pela dosagem sérica de G6PD.⁵³

No rol das anemias hemolíticas congênitas estão também as hemoglobinopatias, como a anemia falciforme, a metemoglobinemia, as policitemias familiares congênitas e as síndromes de hemoglobinas instáveis.⁵³

2.5.2 A AIHA e os distúrbios linfoproliferativos:

A CLL (leucemia linfocítica crônica) é uma neoplasia monoclonal resultante da proliferação de células linfoides maduras, e que desencadeia AIHA em aproximadamente 4,5-11% dos pacientes. O paciente com CLL pode muitas vezes apresentar um DAT positivo e não ter AIHA.¹² Assim, uma vez diagnosticada WAIHA, ou uma vez que um DAT esteja positivo na presença de anemia hemolítica, é necessário prosseguir a investigação para excluir CLL. O exame físico de um paciente com CLL pode cursar com linfadenomegalias generalizadas, encontradas em 2/3 dos casos, hepatomegalias e esplenomegalia em 10-40% dos casos, ocasionalmente há linfedema (pela obstrução dos canais linfáticos). Laboratorialmente, observa-se geralmente um hemograma com linfocitose persistente $>10000\text{mm}^3$ e aspirados de medula óssea com mais que 30% de linfócitos, ou linfocitose maior que $5000/\text{mm}^3$, biópsia de medula óssea com mais que 30% de linfócitos e imunofenotipagem positiva para CD5, CD23 e CD19.⁵⁴

A associação entre os linfomas não-Hodgkin (LNH) e AIHA é bem conhecida, Sallah et al, 2000 em uma amostra de 517 pacientes com linfoma não-Hodgkin encontrou 3% de casos de AIHA, onde destes, 81% apresentavam WAIHA e 19% CAIHA.⁵⁵ Após um diagnóstico de AIHA, deve-se sempre ao exame físico atentar para a presença de linfadenomegalias, esplenomegalias, hepatomegalias ou qualquer tumoração encontrada à palpação, especialmente em região de cabeça e pescoço. Linfadenomegalias devem ser biopsiadas, bem como a medula óssea. Deve-se realizar exames de imagem desde a radiografia de tórax, tomografia ou ressonância magnética de pescoço, tórax, abdome e pelve em busca de outras tumorações ocultas. De grande valia atualmente é a imunofenotipagem ou imunohistoquímica do material biopsiado, para confirmação e classificação do linfoma, bem como a citogenética que auxilia no diagnóstico do tipo de linfoma pela presença de translocações, deleções ou outras alterações de cariótipo.⁵⁶ Um tipo específico de LNH e muito frequentemente associado à AIHA é a macroglobulinemia de Waldenström, um linfoma de células B produtor de uma macroglobulina de tipo IgM, envolvido no desenvolvimento de CAIHA. Para os linfomas de Hodgkin a mesma investigação deverá ser realizada.

2.5.3 A AIHA e outras doenças autoimunes:

Embora na amostra de Sokol et al, 1992, tenha sido encontrada uma maior proporção de artrite reumatoide associada à AIHA em relação ao LES, o lúpus eritematoso sistêmico é citado em todos os artigos de revisão como a principal doença autoimune associada à AIHA. Pode-se encontrar na amostra de Sokol, que aproximadamente 1,6% dos casos de AIHA é secundário ao LES.³³ Por outro lado, nas várias amostras de casos de LES revisadas por Bashal, 2013, pode-se observar que mais de 10% dos pacientes desenvolvem AIHA.⁵⁷ Uma vez diagnosticada AIHA é importante prosseguir a investigação solicitando o FAN, anticorpos anti-sd-DNS, anti-SM, anti-La, anti-Ro afim de encontrar qualquer processo autoimune contra partículas nucleares. Uma vez encontradas evidências de LES, o profissional deve se lembrar de descartar a síndrome antifosfolípide que acompanha o lúpus em aproximadamente 30% dos casos.⁵⁷

A artrite reumatoide (RA) é também uma importante causa de AIHA secundária, correspondendo a aproximadamente 2,6% do total de casos de AIHA.³³ Dentre outras doenças autoimunes presentes em menor escala estão a colite ulcerativa, a doença de Crohn, a síndrome de Sjögren, hepatite autoimune e esclerodermia.^{2, 32}

2.5.4 A AIHA e as doenças infecciosas:

A AIHA por IgM também está especialmente associada à infecção subjacente por *Mycoplasma*, principalmente por *Mycoplasma pneumoniae*, na qual é produzido um anticorpo com especificidade anti-I típica. Pode também ocorrer subjacente à outras infecções como as por citomegalovírus.⁴⁴

A hemoglobinúria paroxística ao frio pode muitas vezes ser confundida com uma síndrome das crioglobulinas de forma aguda. Para elucidar a dúvida é necessário identificar a imunoglobulina de Donath-Landsteiner. A PCH ainda pode ser secundária a sífilis congênita ou à sífilis em estágio tardio, sendo observadas e descritas inicialmente em conjunto durante o século XIX. Também pode ocorrer após quadros infecciosos como as infecções do trato respiratório, após infecções

virais por sarampo, caxumba, EBV, CMV, VZV, Adenovirus, Influenza A, *M. pneumoniae*, *H. influenzae*, *E. coli*.² Nestes casos é sempre importante debelar o quadro infeccioso para que ocorra a remissão dos sintomas.

2.5.5 A AIHA e outras neoplasias não hematológicas:

Dentre as neoplasias não hematológicas, os tumores de ovário e seminomas são os mais frequentemente encontrados em relatos de casos, porém poucas análises de grupos de casos foram descritas na literatura.²

2.6 Tratamento:

Atualmente busca-se um consenso sobre o tratamento das anemias hemolíticas autoimunes, porém o que vemos é que ainda faltam muitos estudos sobre a definição terapêutica, dosagem de medicamentos, definição de termos como remissão completa ou parcial da doença e refratariedade ao tratamento. A maioria dos dados em que os profissionais se baseiam para o tratamento de AIHA são resultados de séries de casos, ou relatos de casos isolados, com baixos níveis de evidência.

Os objetivos dos tratamentos propostos são basicamente diminuir os impactos e prevenir a ocorrência de crises hemolíticas, diminuir a hiper-reatividade dos glóbulos brancos, aumentar os níveis de hemoglobina para valores fisiológicos, e a remissão dos sintomas.^{45, 46}

2.6.1 AIHA de início agudo, medidas emergenciais:

A primeira crise de anemia hemolítica autoimune é geralmente aguda e com elevada mortalidade. O paciente refere dispneia e astenia e muito frequentemente necessita de internação hospitalar.

A primeira importante questão a ser decidida diz respeito à transfusão sanguínea imediata. Para isso é preciso avaliar o grau de anemia, o tipo de anemia hemolítica e as condições clínicas do paciente. Caso tais pacientes já tenham sido

transfundidos anteriormente ou se a mulher já tiver gestado faz-se necessária uma fenotipagem estendida para tipagem dos subgrupos Rh.⁴⁵ Alguns hospitais com bancos de sangue adotam em seus protocolos a transfusão leucorreduzida. Em programações de cirurgias extensas pode-se lançar mão de transfusões autólogas programadas - pré-depósito – e as intraoperatórias, como a hemodiluição normovolêmica aguda intraoperatória e a transfusão autóloga intraoperatória. Quanto à temperatura, pode-se utilizar bolsas de hemácias previamente aquecidas, especialmente em casos de CAIHA com autoanticorpos de elevada amplitude térmica.⁵⁸

Mesmo que o serviço não disponha dos recursos supracitados, ou mesmo que não se consiga transfundir a quantidade necessária para elevação dos níveis de Hb, a infusão de pequenos volumes (100ml), pode salvar vidas, diminuir alguns sinais e sintomas e recuperar a capacidade de oxigenação do organismo. Enquanto o paciente recebe a transfusão sanguínea, laboratorialmente já deve ser definido o tipo de anemia hemolítica em questão.^{39, 45}

2.6.2 Mecanismos de ação gerais das terapias utilizadas:

Os glicocorticoides são os fármacos de primeira linha utilizados no tratamento do AIHA, seu mecanismo de ação se dá pela ativação de promotores de transcrição gênica ao acoplar-se ao seu receptor celular hGR α . Possuem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, inibindo a diapedese dos leucócitos para os tecidos periféricos, o que aumenta transitoriamente o número de leucócitos circulantes, retornando a níveis normais em 24h. O glicocorticoides diminuem os níveis séricos de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos pela indução da migração destas células para os tecidos linfoides. Inibem também a atividade das células apresentadoras de antígenos e de toda a cascata de citosinas indutoras dos linfócitos Th1. Em humanos, a ativação do complemento não é alterada e doses moderadas, por ex. 20mg/dia de prednisona, não são suficientes para reduzir a produção de anticorpos pelas células B.⁵⁹ A este fato deve-se a elevada refratariedade do tratamento com os glicocorticoides e a dificuldade de manutenção da remissão com baixas doses do medicamento, como veremos a seguir.

O rituximabe é um medicamento composto por anticorpos monoclonais quiméricos contra as proteínas transmembrana CD20 das células B. Possui vários mecanismos para induzir a depleção das células B, como reconhecimento de fagocitose pelas células NK, indução de apoptose direta pela ativação de MAP quinase e p38, indução de células T CD8+ contra células B, fagocitose pelo sistema reticuloendotelial e a indução da ativação do sistema complemento contra células B; o mecanismo regulatório da ativação do sistema complemento tem sido alvo de estudos crescentes, suspeita-se ser este o mecanismo pelo qual algumas neoplasias e doenças autoimunes desenvolvem resistência ao medicamento. O rituximabe foi aprovado para o tratamento de alguns tipo de LNH de baixo grau, CLL, e artrite reumatoide não responsiva aos bloqueadores de TNF. No trabalho de Güncan et al, 2009 foram demonstrados o crescente número de séries de relatos de casos do uso de rituximabe para outras doenças autoimunes como LES, AIHA, PTI, vasculite associada à ANCA, pênfigo vulgar, doença de Graves, PTT, dentre outras.^{60, 61}

A ciclofosfamida, azatioprina e o clorambucil são fármacos citotóxicos, muito utilizados como agentes antineoplásicos e imunossupressores. A ciclofosfamida e o clorambucil pertencem à família dos agentes alquilantes, que atuam paralisando inespecificamente o ciclo celular; o uso de tais medicações no tratamento de AIHA ainda é muito controverso, pois apesar da excelente imunossupressão produzida pela ciclofosfamida, ambos medicamentos produzem muitos efeitos colaterais agudos, como náuseas e vômitos 30 a 60 minutos após a administração e tardios como depleção da eritropoiese, leucopenia, trombocitopenia e sangramento, corroboram o desenvolvimento de alopecia e cistite hemorrágica.^{61, 62} A azatioprina é um agente citotóxico antimetabólico, com paralização específica do ciclo celular pela interferência no metabolismo das purinas. Em altas doses o tratamento continuado exhibe efeitos colaterais semelhantes aos da ciclosporina, somados à disfunção hepática.⁶²

A esplenectomia é um tratamento cirúrgico considerado segunda opção para tratamento de AIHA refratária aos corticosteroides. Se baseia na remoção do maior sítio de captura de hemácias opsonizadas, remoção do sistema macrófágico reticuloendotelial e de células B produtoras de autoanticorpos. Em média, 50-60%

dos pacientes refratários à corticoterapia inicial tem resposta boa a excelente à esplenectomia a curto prazo.⁶¹ Lechner & Jäger relatam uma boa resposta em 38-82% dos casos, incluindo remissões parciais e completas.⁴⁵

2.6.3 Tratamento da WAIHA:

Na WAIHA primária a primeira linha de tratamento preconizada são os glicocorticoides. Inicia-se o tratamento com Prednisona (PDN) 1mg/Kg/dia via oral, por um período de 3 semanas (ou até que o hematócrito esteja acima de 30% e/ou hemoglobina igual ou maior a 10mg/dl). Pacientes com hemoglobina menor ou igual a 7mg/dl devem receber metilprednisona intravenosa em pulsoterapia com dosagem de 1g/dia/3dias e fazer nova avaliação.⁴⁵ Neste período de 3 semanas com PDN, estudos de séries de casos apontam que 80 a 90% dos pacientes respondem favoravelmente à terapêutica, com remissão completa ou parcial do quadro (Pirofsky apud Lechner & Jäger).⁴⁵ Ainda, Zupanska observou que pacientes respondem melhor aos glicocorticoides na fase aguda da hemólise (68,6% de resposta) e são menos responsivos na fase crônica (com 35% de resposta).⁶⁴

Os níveis máximos de Prednisona preconizados para dose de manutenção são de até 15mg por dia. Não havendo resposta em 3 semanas, ou caso a dose de manutenção da prednisona seja maior que 15mg/dia após 3-4 meses de terapia, deve-se iniciar uma medicação imunossupressora de segunda linha. Casos indolentes que necessitam de doses intermediárias entre 0,1-15 mg por dia por um longo período também podem receber o tratamento de segunda linha.⁴⁵

Deve-se lembrar de que estes pacientes devem receber desde o começo da terapia, bifosfonados, vitamina D e suplementação de Cálcio, segundo o Colégio Americano de Reumatologia. A suplementação com ácido fólico ainda não é um consenso entre os autores, mas pode ser utilizada para um maior suporte na prevenção de crises megaloblásticas.⁴⁵

Dentre os tratamentos de segunda linha, a esplenectomia associada ao uso de rituximabe tem sido a única com eficácia comprovada a curto prazo. Com a

esplenectomia isolada, uma remissão total ou parcial é esperada em 2/3 dos pacientes anteriormente refratários aos glicocorticoides. Relatos de séries de casos concluem que a doença se mantém em remissão por anos sem necessidade de intervenção médica. O risco perioperatório é baixo, porém o risco a longo prazo de infecção por germes encapsulados é elevado (mas menores que os riscos das complicações da doença sem a esplenectomia), há também descrição de elevação das ocorrências de tromboembolismo e em menor escala hipertensão pulmonar. A vacinação contra *S.pneumoniae* (a cada 5 anos), contra *N. meningitidis*, *H. influenzae*, também são preconizadas e devem ser realizadas com um mínimo de 2 semanas antes do procedimento. Por fim, a esplenectomia possibilita uma remissão clínica por, em média 2 anos e confere uma taxa aproximada de 20% de cura definitiva.⁴⁵

Alguns estudos de grupos de casos, têm documentado uma elevada taxa de respostas para o tratamento de WAIHA refratária em crianças e adultos. No estudo de Quartier et al apud Liu & Gu, foi observado 100% de respostas completas num grupo de 6 crianças com WAIHA refratária. Nos estudos de Zecca et al apud Liu & Gu foi observado o segmento do tratamento de 13 crianças com rituximabe, foram obtidos 11 casos de remissão completa e 2 casos não responsivos. Os estudos de D'Arena et al apud Liu & Gu se basearam em análises retrospectivas do tratamento de 11 pacientes adultos com WAIHA refratária, nele foram observados 8 casos de remissão completa e 3 de remissão parcial em que os pacientes apresentavam sinais discretos de hemólise.⁶⁵ Ainda no trabalho de revisão de Liu & Gu foi relatada uma resposta favorável ao uso de rituximabe em mais de 82% dos casos acompanhados. Porém os melhores resultados foram conquistados com o uso de baixas doses de rituximabe associada a baixas doses de glicocorticoides, 100% de remissão para WAIHA em 4 meses e 60% de remissão para CAIHA em 4 meses, porém não existem dados sobre quão duráveis são os resultados desta combinação até o momento.⁶⁵ No Brasil ele ainda não está formalmente indicado no tratamento da AIHA refratária pelo Ministério da Saúde.⁴⁶

2.6.4 Tratamento da CAIHA:

A terapia para AIHA por anticorpos frios é frequentemente insatisfatória. Ao

contrário da WAIHA, a CAIHA não possui uma boa resposta à corticoterapia, nem à esplenectomia. As AIHA por anticorpos frios estão muitas vezes acompanhadas por doenças linfoproliferativas, e por este motivo teve início o emprego do clorambucil, assim como da ciclofosfamida em seu tratamento. O clorambucil ou a ciclofosfamida podem ser instituídos, porém com cautela e em baixas doses, pois provoca grande diminuição da eritropoiese na medula óssea; pacientes com hemólise moderada a severa podem piorar rapidamente gerando resultados catastróficos. Os melhores resultados têm sido obtidos com o emprego do rituximabe^{45,63} e pela plasmaférese como medida emergencial.^{43, 62} Deve-se também lembrar de não expor o paciente ao frio esta é a medida essencial a todos os casos de CAIHA. A PCH em sua maioria tem um bom prognóstico, necessitando somente medidas suportivas e monitoramento. As crises são raras mas muito severas, com hemólise intra e extravascular.⁴⁴

2.6.5 Tratamento da MAIHA:

O tratamento para MAIHA é semelhante ao tratamento usado para as AIHA por anticorpos quentes, diferindo apenas na sua intensa resposta inicial à corticoterapia e apresentando um curso clínico que tende à cronicidade.⁴⁴

2.6.6 Tratamento da DIAIHA:

Nas DIAIHA, a primeira medida a ser tomada é descontinuar a medicação utilizada pelo paciente. O uso de corticoterapia é controverso, e a esplenectomia e o rituximabe não são usualmente considerados neste caso.³¹

3 CONCLUSÃO:

No que tange à epidemiologia das anemias hemolíticas autoimunes há a necessidade premente de pesquisas estatísticas sobre a incidência de AIHA na população brasileira, bem como pesquisas das causas secundárias mais frequentes, análise estatística dos sintomas mais frequentemente relatados e dos sinais mais frequentemente observados pelos profissionais de saúde durante o exame físico. Durante este trabalho foi observado que a epidemiologia da AIHA difere bastante de acordo com a região em que os dados são coletados. O que nos permite indagar se as variáveis genéticas e ambientais não possuem alguma influência sobre a gênese da doença.

Quanto à fisiopatologia e tratamento, os estudos mais recentes têm se voltado para a elucidação do funcionamento do sistema inativador do complemento, visto ser o este o mecanismo pelo qual alguns tipos de AIHA, bem como alguns tipos de linfomas adquirem resistência ao rituximabe. Alguns pontos cruciais sobre o tratamento da AIHA têm avançado com o uso dos anticorpos monoclonais, como o desuso dos agentes alquilantes antineoplásicos e a possibilidade do uso de doses cada vez mais reduzidas de glicocorticoides. Outras linhas importantes de pesquisas estão sobre a atuação dos linfócitos T reguladores, tanto na elucidação da patogênese de processos autoimunes quanto para os estudos mais recentes sobre carcinogênese.

Podemos concluir também a importância da atuação dos bancos de sangue no sucesso do tratamento dos pacientes com AIHA, sendo necessários consensos, definições de protocolos laboratoriais e otimização de infraestrutura e serviços, para que tais pacientes sejam rapidamente triados e conduzidos da forma mais assertiva possível.

REFERÊNCIAS

- 1 ENGELFRIET, C. P.; OVERBEEKE, M. A.; BORNE, A.E. *Autoimmune hemolytic anemia*. Semin. Hematol. 1992 v.29, n°1 p.3-12.
- 2 GEHRS, B. C. & FRIEDBERG, R. C. *Autoimmune hemolytic anemia*. Am. J. Hematol., 2002, v.69, p.258–271.
- 3 FAGIOLO, E. *Immunological tolerance vs. erythrocyte self antigens and cytokine network dysregulation in autoimmune hemolytic anemia*. Autoimmunity reviews. 2004. v.3, p.53-59.
- 4 LAMBERT, J.F. NYDEGGER, U.E. *Geoepidemiology of autoimmune hemolytic anemia*. Autoimmunity reviews. 2010. v.9, p.A-350-A-354.
- 5 http://www.cureresearch.com/a/autoimmune_hemolytic_anemia/stats-country.htm
- 6 GOODACRE, J. A. WARNOCK, M. G. *Cryptic T-cell epitopes and their role in the pathogenesis of autoimmune diseases*. British Journal of Rheumatology. 1997. v.36, p.1144-1150.
- 7 BARKER, R. N.; ELSON, C. J. *Multiple self epitopes on the Rhesus polypeptides stimulate immunologically ignorant human T cells in vitro*. Eur. J. Immunol. 1994, v.24, p.1578-82.
- 8 BARKER, R. N.; HALL, A. M.; ELSON, C. J. *Identification of T cell epitopes on the Rhesus polypeptides in autoimmune hemolytic anemia*. Blood. 1997, v.90, p.2701-2715.
- 9 MALHOTRA, V. ABRAHAM, T. et al. *Infectious mononucleosis with secondary cold agglutinin disease causing autoimmune haemolytic anaemia*. BMJ Case Reports. 2009. Doi:10.1136/bcr.12.2008.1390.
- 10 RIBEIRO-SILVA, A. ZUCOLOTO, S. *O Papel do Vírus Epstein-Barr na*

Tumorigênese Humana. Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2003. v.36, p.16-23

11 SADEGHI, B. AL-HASHMI, S. HASSAN, Z. *Expansion and Activation Kinetics of Immune Cells during Early Phase of GVHD in Mouse Model Based on Chemotherapy Conditioning*. Clinical and Developmental Immunology. 2010. v.2010. Doi:10.1155/2010/142943.

12 ARENA, G. D. et al. *Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Clinical and Developmental Immunology. 2013. v.2013. Doi:10.1155/2013/730131

13 GILLILAND, B. C. Hemolytic anemia. In: Mackay, I. R.; Rose, N. R. *The autoimmune diseases*. 4ª Ed. St.Louis: Elsevier Academic Press, 2006. p.557-574.

14 POWDERS, A.; SILBERSTEIN, L. E. Autoimmune hemolytic anemia. In: Hoffman, R. et al. *Hematology: basic principles and practice*. 6ª Ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2012, p.645-658.

15 JANNEY, F. A.; LEE, L. T.; HOWE, C. *Cold hemagglutinin cross-reactivity with Mycoplasma pneumoniae*. Infection and Immunity, 1978, v.22, p.29-33.

16 MESQUITA, D. Jr. et al. *Sistema imunitário – Parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B*. Revista brasileira de reumatologia. São Paulo, 2010, v.50, nº5, p.552-80.

17 ETZIONI, A. *Immune deficiency and autoimmunity*. Autoimmunity review. 2003, v.2, p.364-369.

18 DEFRANCO, A. L. Desenvolvimento de células B e resposta imunológica humoral. In: PARSLOW, T. G. et al. *Imunologia médica*. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2004, p.99-126.

19 KOKRON, C. M. ERRANTE, P. R. BARROS, M. T. *Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency*. Academia Brasileira de Ciências.

2004. v.76, capt.4, p.707-726.

20 WATANABE, N. et al. *Activation and Differentiation of Autoreactive B-1 Cells by Interleukin 10 Induce Autoimmune Hemolytic Anemia in Fas-deficient Antierthrocyte Immunoglobulin Transgenic Mice*. Journal of Experimental Medicine. 2002. v.196, nº1, p.141-146.

21 RIBATTI, D. *The fundamental contribution of Robert A. Good to the discovery of crucial role of thymus in mammalian immunity*. Immunology. 2006, v.119, p.291-195.

22 MILLER, J. F. A. P. *Immunological function of the thymus*. Lancet. 1961, v.2, p.748-9.

23 RIBATTI, D. CRIVELATTO, E. VACCA, A. *Miller's seminal studies on the role of thymus in immunity*. Clinical and experimental immunology. 2006, v.144, p.371-375.

24 SAKAGUCHI, S. TAKAHASHI, T. NISHIZUKA, Y. *Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice*. Journal of Experimental Medicine. 1982, v.156, p.1577-1585.

25 SAKAGUCHI, S. FUKUMA, K. KURIBAYASHI, K. MASUDA, T. *Organspecific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T-cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance: deficit of a T-cell subset as a possible cause of autoimmune disease*. Journal of Experimental Medicine. 1985, v.161, p.72-87.

26 SAKAGUCHI, S. YAMAGUCHI, T. NOMURA, T. *Regulatory T Cells and Immune Tolerance*. Cell. 2008, v.133, p.775-787.

27 HANNIBAL, M. C. TOGERSON, T. IPEX Syndrome. In: Pagon, R. A. et al. *GeneReviewsTM*. Universidade de Washington, Seattle. Ed. Seattle WA. 1993-2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1118/>

28 XU, L. et. al. *Critical role of Th17 cells in development of autoimmune hemolytic*

anemia. Experimental Hematology. 2012, v.40, p.994-1004.

29 TERENCEZI, C.T. FAGIOLO, E. *IL-10 and the Cytokine Network in the Pathogenesis of Human Autoimmune Hemolytic Anemia*. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005, v.1051, p.29-44

30 ALWAR, V. et al. *Clinical Patterns and Hematological Spectrum in Autoimmune Hemolytic Anemia*. Journal of Laboratory Physicians. 2010. v.2, n°.1, p.17-20. Doi: 10.4103/0974-2727.66703

31 BASS, G. F. et al. *Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia*. Autoimmunity Reviews. 2014, doi.org/10.1016/j.autrev.2013.11.010

32 PACKMAN, C. H. *Hemolytic anemia due to warm autoantibodies*. Blood Reviews. 2008, v.22, p.17-31.

33 SOKOL, R. J. BOOKER, D. J. STAMPS, R. *The pathology of autoimmune hemolytic anemia*. J. Clin. Pathol. 1992. v.45, p.1047-1052.

34 GARRATTY, G. *Drug-induced hemolytic anemia*. American Society of Hematology. 2009. p.73-9. Doi: 10.1182/asheducation-2009.1.73.

35 GARRATTY, G. *Immune hemolytic anemia associated with drug therapy*. Blood reviews. 2010, v.24, p. 143-150

36 CUNNION, K. M. et al. Complemento e Cinina. In: PARSLOW, T. G. et al. *Imunologia Médica*. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, p.151-162.

37 SCHREIBER, A. D. Anemias hemolíticas autoimunes e intravasculares. In: GOLDMAN, L. AUSIELLO, D. *Cecil – Tratado de Medicina Interna*. 22ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p. 1173-1183.

38 KLEIN, H. G. ANSTEE, D. J. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 12ª Ed. Oxford: Wiley Blackwell. 2014, capt.7, p. 259-295.

- 39 HARMENING, D. M. PRIHODA, L. A. GREEN, R. E. B. Doenças Hemolíticas Auto-Imunes. In: HARMENING, D. M. *Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão*. 4ª Ed. Revinter. 2006, p.436-473.
- 40 GIRELLO, A. L. KÜHN, T. I. B. B. *Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária*. 3ª Ed. São Paulo: Editora SENAC São Paulo. 2011, p.243-287.
- 41 HOFFBRAND, A. V. MOSS, P. A. H. *Fundamentos em Hematologia*. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed. 2013, p.73-82.
- 42 ZUCKERMAN, K. S. Enfoque sobre anemias. In: GOLDMAN, L. AUSIELLO, D. *Cecil – Tratado de Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Elsevier. 22ª Ed. 2005. p. 1116-1126.
- 43 BERENTSEN, S. TJONNFJORD, G. E. *Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia*. Blood Reviews. 2012, v.26, p.107-115.
- 44 PETZ, L. D. *Cold antibody autoimmune hemolytic anemias*. Blood Reviews. 2008, v.22, p.1-15.
- 45 LECHNER, K.; JÄGER, U. *How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults*. Blood. 2010, v.116, n.11, p.1831-1838.
- 46 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas - Anemia hemolítica autoimune. Brasília-DF. 2010.
- 47 NYDEGGER, U. E. Autoimmune Hemolytic Anemia. In: SHOENFELD, Y. CERVERA, R. GERSHWIN, M. E. *Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases*. Humana Press. 2008. capt.93 p.509-512.
- 48 NAOUM, P. C. et al. *Doenças dos eritrócitos*. Academia de Ciência de Tecnologia de São José do Rio Preto. São Paulo. Disponível em:

<http://www.ciencianews.com.br/index.php/publicacoes/doenca-dos-eritrocitos/>

49 BRAGA, G. W. BORDIN, J. O. MOREIRA, Jr. KURODA, A. *Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica autoimune: características do teste manual direto do Polybrene*. Revista da Associação Médica Brasileira. 2008, v.44, n.1, p.16-20.

50 AROSA, F. A. CARDOSO, E. M. PACHECO, F. C. *Fundamentos de Imunologia*. Portugal. Ed. LIDEL. 2ªEd. 2007. P.578.

51 CHAUDHARY, R. DAS, S. S. KHETAN, D. *A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test*. Hematology. 2007, v.12, n.2, p.175-178. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10245330601111862>.

52 ZEERLEDER, S. *Autoimmune Haemolytic Anaemia – a practical guide to cope with a diagnostic and therapeutic challenge*. The Netherlands Journal of Medicine. 2011, v.69, n.4, p.177-183

53 GOLAN, D. E. Anemias hemolíticas: defeitos da membrana e do metabolismo dos eritrócitos. In: GOLDMAN, L. AUSIELLO, D. *Cecil – Tratado de Medicina Interna*. 22ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p.1183-1192

54 LORAND-METZE, I. *LLC: Critérios diagnósticos, imunofenotipagem e diagnóstico diferencial*. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. 2005. v.27, n.4. p.233-235

55 SALLAH, S. et al. *Autoimmune hemolytic anemia in patients with non-Hodgkin's lymphoma: characteristics and significance*. Annals of oncology. 2000. v.11, p.1571-1577.

56 PALLADINO, A. NOBRE, A. C. RODRIGUES, D. *Desafios no diagnóstico de linfomas indolentes*. Onco&. 2011.

57 BASHAL, F. *Hematological Disorders in Patients with Systemic Lupus Erythematosus*. The Open Rheumatology Journal. 2013. v.7, p.87-95.

- 58 ACHKAR, R et al. *Guia de Conduas Hemoterápicas*. HSL. 2ªEd. 2010
- 59 CHROUSOS, G. P. Adrenocorticosteróides e antagonistas adrenocorticiais. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. AMGH Editora Ltda. 10ªEd. 2010. p. 573-588.
- 60 GÜRCAN, H. M. et al. A review of the current use of Rituximab in autoimmune diseases. *International Immunopharmacology*. 2009, v.9, p.10-25.
- 61 LAKE, D. F. BRIGGS, A. D. AKPORAIYE, E. T. Imunofarmacologia. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. AMGH Editora Ltda. 10ªEd. 2010. p.825-846.
- 62 CHU, E. SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. AMGH Editora Ltda. 10ªEd. 2010. p.797-823.
- 63 SILBERSTEIN, L. E. CUNNINGHAN, M. J. Autoimmune Hemolytic Anemias. In: HILLYER, C. D. *Blood Banking and Transfusion Medicine: Principles and Practice*. Elsevier. Philadelphia. 2ªEd. 2007. Capt.41, p. 557-570.
- 64 ZUPAŃSKA, B.; SYLWESTROWICZ, T.; PAWELSKI, S. The results of prolonged treatment of autoimmune haemolytic anaemia. *Haematologia (Budap.)*. 1981, v.14, n.4, p.425-433.
- 65 LIU, B.; GU, W. Immunotherapy treatments of warm autoimmune hemolytic anemia. *Clinical and developmental immunology*. 2013, v.2013, p.1-6.