



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

PESQUISA DE CLONES DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA EM MEDULA ÓSSEA DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

DIANA ANDREIA DA CRUZ FERREIRA DOS SANTOS

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de
Coimbra**

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



PESQUISA DE CLONES DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA EM MEDULA ÓSSEA DE SINDROMES MIELODISPLÁSICAS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica de Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Coimbra e Assessor da Carreira Técnica Superior de Saúde no Instituto Português do Sangue e da Transplantação e coorientação de Doutor Armando José Cerejo Caseiro, Professor adjunto do Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública na Escola Superior de Tecnologia de Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, aos Professores Doutores Artur Paiva e Armando Caseiro.

Agradeço à Diretora do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, Dra. Maria Luísa Pais, por ter permitido a realização dos estudos subjacentes a esta Dissertação.

Agradeço à equipa do laboratório de Citometria de fluxo, do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (por ordem alfabética): Dra. Ana Henriques, Dra. Isabel Melo Silva, Dra. Maria Jesus Inácio, e Dr. Tiago Carvalheiro, pela ajuda prestada.

Ao Serviço de Hematologia dos CHUC e do Centro Hospitalar Tondela Viseu e serviço de Medicina do HD Figueira da Foz.

À equipa clínica do Serviço de Hematologia dos CHUC e do Centro Hospitalar Tondela Viseu e do serviço de Medicina do HD Figueira da Foz.

Um agradecimento especial à minha família, ao meu namorado e à amiga Raquel, pela força e apoio que me deram ao longo deste tempo.

Júri

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública, Fernando José F. Agostinho d'A. Mendes, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutor Martin Pérez-Andrés, Professor Assistente da Universidade de Salamanca.

Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Doutor Armando José Cerejo Caseiro, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Resumo

Introdução A Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença clonal da célula mãe hematopoiética pluripotente, que origina um clone de células que adquirem uma mutação somática no gene *PIG-A*, condicionando assim a expressão de proteínas ancoradas à membrana através do GPI (Glicosil- Fosfatidil-Inositol). A presença de clones de HPN em síndromes mielodisplásicas (SMD) demonstrou ter implicações no prognóstico e terapêutica.

Objetivos Com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para o melhor conhecimento da frequência de casos HPN em amostras de medula óssea com suspeita de SMD e que a frequência encontrada nas células de linha a neutrófilo, monocítica e eritróide no último estágio da maturação na medula óssea (MO) é similar à observada nas células da mesma linha no sangue periférico (SP).

Material e Métodos O estudo fenotípico foi realizado em 826 amostras de MO com suspeita de SMD e com rasgos fenotípicos sugestivos desta entidade por citometria de fluxo, de acordo com o painel EUROFLOW para diagnóstico de SMD, para estudo da maturação da linha a Neutrófilo, linha a Monócito, e Eritróide.

Resultados Nas 826 amostras de MO detetaram-se 7 casos com presença de clones HPN, o que corresponde a uma frequência de 0.8%. A percentagem de células HPN, determinada simultaneamente no SP e na MO, foi idêntica nas 3 linhas hematopoiéticas estudadas. Verificou-se, ainda, que a expressão de IREM-2 no clone maduro normal e no clone HPN nos monócitos, em SP e MO, encontrava-se estatisticamente diminuída no clone HPN.

Conclusão Os resultados do presente estudo indicam uma menor incidência de clones HPN em SMD comparativamente com outros estudos prévios e que é válida a sua determinação em amostras de aspirados de medula óssea. Verificaram-se diferenças claras na expressão de IREM-2 entre clone HPN e células normais da linha monocítica, o que sugere que este possa ser uma proteína ancorada por GPI.

Palavras-chave Síndromes Mielodisplásicas, Hemoglobinúria Paroxística Noturna, gene *PIG A*, clone HPN, medula óssea, sangue periférico, citometria de fluxo.

Abstract

Introduction The Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a clonal stem cell disorder, which leads to a cell clone that acquires a somatic mutation in the *PIG-A* gene, thus conditioning the partial or total lack of expression of proteins anchored to the membrane through the GPI (glycosyl-phosphatidyl inositol). PNH arises in association with other syndromes including Bone Marrow failure, Aplastic Anemia, and Myelodysplastic Syndromes (MDS). The presence of PNH clones in MDS has been shown to have prognostic and therapeutic implications. Immunophenotyping by flow cytometry has become a technique of choice in the diagnosis and disease monitoring, providing detection of PNH clones.

Aims The present work aims to contribute to a better knowledge about the frequency of PNH in patients with suspected MDS, and to demonstrate that detection of PNH clones in bone marrow sample is viable, by simultaneously evaluating the presence of cells with GPI-anchored protein defects in BM and peripheral blood.

Material and Methods The phenotypic study was performed in 826 bone marrow samples from patients with a possible MDS diagnosis and with phenotypic abnormalities in different hematopoietic cell lineages (Neutrophil, monocyte, and erythroid), by flow cytometry, according to EUROFLOW panel for MDS diagnosis.

Results We found 7 cases with the presence of PNH clones, which represents a frequency of 0.8%. We also observed a statistically significant decrease in the expression of IREM-2 in PNH clones from monocytic lineage when compared with normal mature monocytes.

Conclusion The results of this study indicate a lower incidence of PNH clones in MDS compared with other previous studies and that PNH determination in bone marrow samples is a valid procedure. There were clear differences in IREM-2 expression between PNH clone and normal cells from monocytic lineage, which suggests that this could be another GPI-anchored protein.

Keywords Myelodysplastic syndromes, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *PIG A* gene, PNH clone, bone marrow, peripheral blood, flow cytometry.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
I. INTRODUÇÃO	12
1. Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN).....	12
1.1. Fenótipo.....	12
1.2. Genética - Mutação no Gene <i>PIG-A</i>	14
1.3. Proteínas GPI	16
1.4. Patologias associadas a HPN	19
1.4.1. Síndromes Mielodisplásicas	19
1.4.2. Anemia Aplástica.....	24
1.4.3. Diagnóstico de Hemoglobinúria Paroxística Noturna	25
1.4.3.1. Teste de Ham e Teste de lise da sacarose	26
1.4.3.2. Citometria de fluxo	26
1.4.4. Tratamento	31
II. OBJETIVOS	34
1. Objetivos gerais.....	34
2. Objetivos específicos.....	34
III. MATERIAL E MÉTODOS	36
1. População em estudo.....	36
2. Caracterização fenotípica da expressão de proteínas membranares em amostras de sangue periférico e medula óssea	36
2.1. Procedimento 1: Pesquisa de clones HPN em Medula óssea e Sangue Periférico	38
2.1.1. Screening para pesquisa de clones HPN em Medula óssea.....	38
2.1.2. Screening para pesquisa de clones HPN no sangue periférico.....	39
2.2. Procedimento 2: Pesquisa de clones HPN na serie eritróide e plaquetária	40
3. Análise Estatística	41
IV. RESULTADOS	42
V. DISCUSSÃO	46
VI. CONCLUSÃO.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da HPN.....	14
Tabela 2: Classificação de SMD da Organização Mundial de Saúde (WHO) – 2008..	21
Tabela 3: Pontuação da doença de acordo com o IPSS.....	22
Tabela 4: Grupos de Risco de acordo com o <i>IPSS</i>	23
Tabela 5: Painel EuroFlow para a classificação de SMD: diagnóstico de células deficitárias de proteínas associadas a GPI.	29
Tabela 6: Combinação de anticorpos monoclonais usados para a caracterização fenotípica de proteínas membranares em Medula Óssea e Sangue Periférico para diagnóstico de SMD.....	37
Tabela 7: Combinações de anticorpos monoclonais usados para continuação do estudo, caso se verifique suspeita de HPN.	39
Tabela 8: Combinação de anticorpos monoclonais usados para a série eritróide e plaquetária.....	40
Tabela 9: Análise comparativa das percentagens de clones HPN, nas células de linha a neutrófilo, monocítica e eritróide, com fenótipo de célula madura, em sangue periférico (SP) e medula óssea (MO).....	42
Tabela 10: Análise comparativa das percentagens de clones HPN, nas células de linha a neutrófilo, monocítica e eritróide, com fenótipo de célula madura, em apenas medula óssea (MO).	43
Tabela 11: Ratio da expressão (MIF) de diferentes moléculas nas células com fenótipo de célula madura entre Clone HPN/ célula normal nas linhas a neutrófilo e monócito.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da GPI.....	15
Figura 2: Cascata do complemento.....	17
Figura 3: Expressão de IREM-2 nas células maduras normais e no clone HPN nos monócitos em sangue periférico e medula óssea.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Anemia Aplástica

AREB- Anemia refratária com excesso de blastos

AREB-T – Anemia refratária com excesso de blastos em transformação

ARSA - Anemia refratária com sideroblastos em anel

ATG – Imunoglobulina antitimócito

CFM – Citometria de fluxo multiparamétrica

CSA – Ciclosporina

CV – Coeficiente de variação

DAF – Decay Accelerating Factor

FAB – French-American-British

FDA – Food & Drug Administration

FSC- Forward Scatter

G-CSF – Estimuladores de colónias de granulócitos

GM-CSF – Estimuladores de colonias de macrófagos

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

GPI – Glicosil-fosfatidil-inositol

HIV – Human immunodeficiency virus

HPN – Hemoglobinúria Paroxística Noturna

INF - γ – Interferon

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-3 – Interleucina 3

IREM-2 – Immune receptor expressed on myeloid cells 2

IPSS – Índice internacional de prognóstico

INR – Razão normalizada internacional

LMMC – Leucemia mielomonocítica crónica

LMA – Leucemia mielóide Aguda

LDH – Lactato desidrogenase

MAC – Complexo de ataque membranar

MIF – Média de intensidade de fluorescência

MIRL – Membrane Inhibitor of Reactive Lysis

MO – Medula Óssea

NO – Óxido nítrico

NMP – Neoplasia mieloproliferativa
PIG-A – Fosfatidil Inositol Glicano complemento grupo A
RORENO – Registo Oncológico Regional do Norte
SC – Sistema Complemento
SMD – Síndromes Mielodisplásicas
SMD/ NMP – Neoplasias mielodisplásicas ou mieloproliferativas
SP – Sangue Periférico
SSC – Side Scatter
TCEH – Transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas
TCTH – Transplante de células-tronco hematopoéticas
TNF- α – Fator de necrose tumoral
t-SMD – Síndromes Mielodisplásicas secundárias
UDPGlcNAc: PI- α -1,6-GlcNAc-transferase – N-acetylglucosaminyltransferase
u-PAR – Ativador do plasminogénio tipo uroquinase
WHO – World Health Organization
WPSS – Prognostic Scoring System

I. INTRODUÇÃO

1. Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN)

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) também conhecida por síndrome de Marchiafava Michelli é uma doença rara e grave, que apresenta uma incidência de 0,05 – 0,13 casos por 100.000 habitantes por ano, com uma prevalência calculada de 0,7 casos por 100.000 habitantes (3, 8).

Trata-se de uma doença hemolítica adquirida rara, de natureza clonal, caracterizada por hipersensibilidade mediada pelo complemento das células eritrocitárias, levando à sua lise (1).

O progresso na compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela doença tem sido contínuo nas últimas duas décadas com implicações quer, nos métodos de diagnóstico quer, no tratamento (1).

A primeira descrição da doença foi feita por Strübing, em 1882, que propôs que a hemoglobinúria seria consequência da sensibilidade anormal dos eritrócitos à acidose sistêmica, resultante da acumulação de dióxido de carbono durante o sono. Em 1939, Ham e Dingle observaram que os eritrócitos eram hemolisados quando incubados em soro acidificado, levando à introdução do teste de Ham, que se tornou o principal meio de diagnóstico durante muito tempo. Posteriormente, com a descoberta da via alternativa do complemento, a sensibilidade aumentada dos eritrócitos HPN foi então atribuída à lise mediada pelo complemento (3).

1.1. Fenótipo

Uma das principais características da HPN é o mosaicismos fenotípico. Esta característica foi primeiro elucidada por Dacie e Rosse, em 1966, e depois por Rosse, em 1973, com o teste de lise ao complemento, que demonstrou três populações diferentes de eritrócitos.

A diferença na sensibilidade dos eritrócitos à lise mediada pelo complemento é explicada pela deficiência das proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) (17).

O fenótipo HPN I apresenta sensibilidade normal ao complemento e tem expressão normal das proteínas ancoradas ao GPI (23). Os eritrócitos HPN II apresentam apenas uma deficiência parcial destas proteínas e os eritrócitos HPN III são mais suscetíveis à lise pelo complemento tendo deficiência completa das mesmas (2).

A variabilidade na gravidade da deficiência bem como a proporção de células afetadas é relevante nas manifestações clínicas da doença (23).

A suscetibilidade aumentada dos eritrócitos ao complemento é atribuída à deficiência parcial ou total da expressão de proteínas da membrana, reguladoras da atividade lítica do complemento, especialmente o CD55 (Decay Accelerating Factor, DAF) e o CD59 (Membrane Inhibitor of Reactive Lysis, MIRL). Esta deficiência afeta também a série granulocítica, monocítica e megacariocítica.

Os sintomas associados à doença caracterizam-se por crises de hemólise intravascular e hemoglobinúria, que ocorrem predominantemente durante a noite, enquanto o doente dorme. Este padrão clássico, contudo, está ausente na maioria dos doentes no momento do diagnóstico (2).

Clinicamente, a doença caracteriza-se por hemólise intravascular, trombose e falência da medula óssea (MO) (3,4). A hemólise intravascular é um processo crônico que ocorre em baixo grau, com episódios ocasionais de hemoglobinúria que, normalmente surgem associados a um quadro infeccioso ou situações de *stress* (2). Os sintomas característicos da HPN como dor abdominal, disfagia e fadiga podem ser atribuídos à hemólise intravascular intensa e consequente libertação de hemoglobina livre, tendo um grande impacto na qualidade de vida dos doentes (5). Após o diagnóstico, a sobrevivência média é de 10 a 15 anos, contudo uma proporção significativa de doentes sobrevive por períodos mais prolongados como 25 anos (6). A complicação mais frequente é a trombose venosa que ocorre em mais de metade dos doentes com doença hemolítica e é causa de morte num terço dos doentes (6,7).

A HPN pode surgir de novo ou no contexto de outra doença. Foi criado um sistema de classificação, apresentado na Tabela 1, com base nas características, manifestações clínicas e história natural dos doentes com HPN, sendo classificados como: HPN Clássica, HPN associada a outras desordens da MO e HPN subclínica.

Tabela 1: Classificação da HPN.

CLASSIFICAÇÃO HPN			
Categoria	Hemólise	HPN	Medula Óssea
Clássica	+++	População grande de células GPI negativas	Hiperplasia eritróide com morfologia normal
HPN associada a outra patologia hematológica	+ / ++	População de tamanho variável	Diagnóstico associado a outra patologia hematológica
Subclínica	-	População pequena, normalmente <0.1% de células GPI negativas	Diagnóstico associado a outra patologia hematológica

A HPN clássica inclui os doentes com evidência clínica de hemólise intravascular, com um clone de granulócitos HPN de cerca 50% e sem outra patologia medular (8). A HPN associada a outras desordens da MO refere-se a doentes com evidência clínica e laboratorial de hemólise intravascular e que, concomitantemente têm ou tiveram outra doença: anemia aplástica (AA), síndromes mielodisplásicas (SMD) ou outra mielopatia, sendo que o tamanho do clone de granulócitos HPN é geralmente inferior a 30%.

Por fim a HPN subclínica caracteriza-se por inexistência de evidência clínica e laboratorial de hemólise, mas com pequenas populações de células hematopoiéticas (eritrócitos, granulócitos ou ambos) deficientes em proteínas ancoradas ao GPI detetadas através da citometria de fluxo, em que o clone de granulócitos HPN é inferior a 1%.

1.2. Genética - Mutação no Gene *PIG-A*

A HPN caracteriza-se geneticamente por uma mutação somática no gene *PIG-A* (Fosfatidil Inositol Glicano complemento grupo A), localizado no braço curto do cromossoma X (Xp22.1), tendo aproximadamente 17 kb de comprimento e 6 exões.

O gene *PIG-A* codifica uma enzima necessária para o primeiro passo na síntese da âncora glicosilfosfatidilinositol, a transferência de N-acetil glucosamina para o fosfatidilinositol, apresentado na Figura 1.

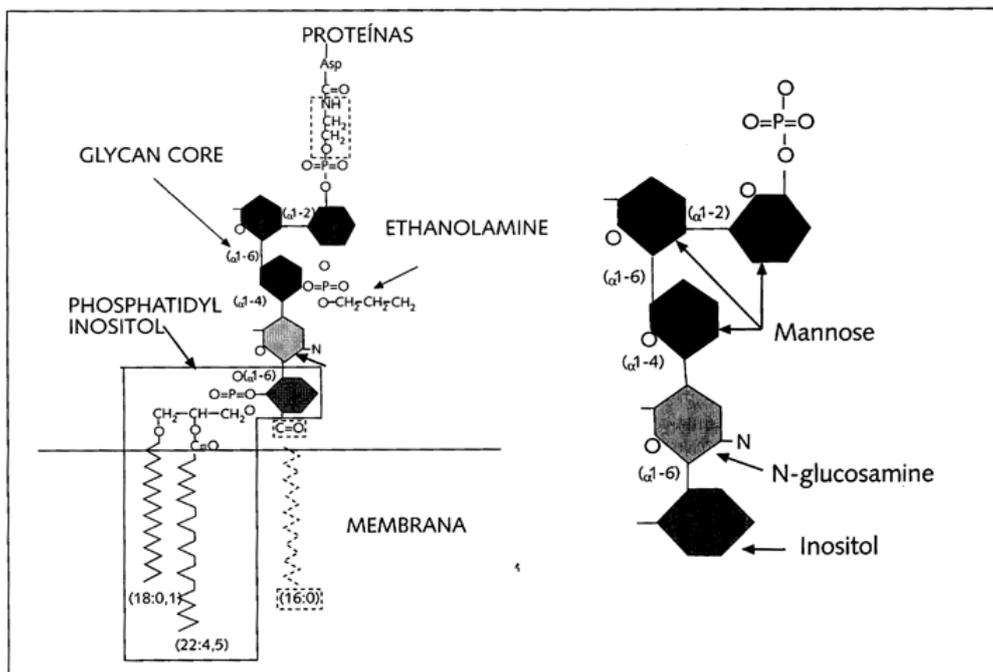


Figura 1: Estrutura molecular da GPI, adaptado de E. Sánchez Pérez, et al, 2001.

Como consequência da mesma as células afetadas são deficientes em várias proteínas que se ligam à superfície à membrana celular através do GPI (10,17).

O gene *PIG-A* num indivíduo normal codifica uma subunidade proteica essencial para a atividade da N-acetylglucosaminyltransferase (UDPGlcNAc: PI- α -1,6-GlcNAc-transferase), uma enzima necessária para a biossíntese da molécula de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), responsável pela ancoragem e fixação de determinados antígenos na superfície da membrana celular externa de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Portanto, em decorrência da deficiência da GPI, importantes antígenos reguladores do sistema complemento (SC) não se expressam na superfície das células de portadores de HPN, tornando-as excepcionalmente suscetíveis ao efeito lítico por ele exercido. Entre os antígenos mais conhecidos estão o DAF (*decay accelerating factor*) e o MIRL (*membrane inhibitor of reactive lysis*), denominados também como CD55 e CD59, respetivamente (32).

1.3. Proteínas GPI

As glicosilfosfatidilinositol (GPI) são um grupo heterogêneo de proteínas que apresentam diferentes funções e padrões de expressão em compartimentos distintos de células hematopoéticas normais maduras, que são expressos deficientemente em pacientes com HPN.

O defeito bioquímico da HPN envolve a síntese deficiente de proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) (31).

As proteínas GPI são responsáveis pela ancoragem e fixação de determinados antígenos na superfície da membrana celular externa de eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Na deficiência destas proteínas, importantes antígenos reguladores do sistema complemento (SC) não se expressam na superfície das células de portadores de HPN, tornando-as excepcionalmente suscetíveis ao efeito lítico exercido pelo SC (31).

O CD55 e o CD59 são proteínas ancoradas ao GPI, muito expressas nas células hematopoéticas e suas linhagens (31).

Como resultado deste defeito, as células afetadas são ausentes de todas as proteínas de superfície que utilizam ligação GPI, incluindo as proteínas envolvidas na regulação do complemento, receptores imunológicos, enzimas, e várias com função desconhecida. Todas as células sanguíneas são afetadas, incluindo eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e linfócitos (31).

O sistema complemento consiste em mais de 30 proteínas que interagem de forma precisa levando à geração de produtos com propriedades imunoprotectoras, imunoreguladoras, pró-inflamatórias e citolíticas. Existem três vias pelas quais o complemento é ativado: a via clássica, a via da manose e a via alternativa. Todas elas resultam na geração de C3 convertase que cliva o C3 em C3a e C3b (37).

O CD59 interage diretamente com o complexo de ataque membranar (MAC) para prevenir a formação dos poros líticos bloqueando a agregação do C9, enquanto o CD55 acelera a destruição da C3 convertase (32,33), ilustrado na figura 2.

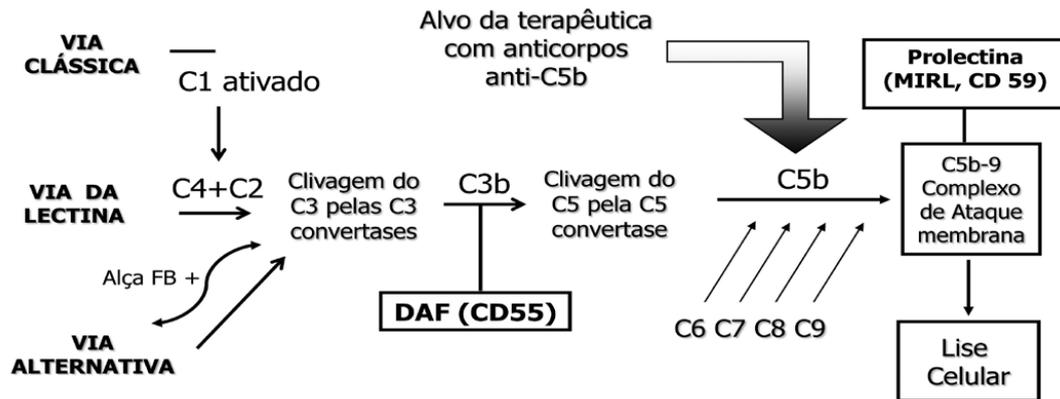


Figura 2: Cascata do complemento, adaptado de Martha Arruda. (2010)

As proteínas reguladoras do complemento, CD55 e CD59, são as mais relevantes na fisiopatologia da HPN e a sua ausência explica a hemólise intravascular mediada pelo complemento e, provavelmente, a propensão para a trombose (34,35). No entanto, a expressão diminuída do CD55 e CD59 não é específica da HPN e pode ser encontrada em doentes com diversas doenças autoimunes (36).

Os eritrócitos HPN são vulneráveis à ativação do complemento através de qualquer uma das vias, no entanto, a via alternativa está num estado contínuo de ativação de baixo grau que explica porque é que a maioria dos doentes tem hemólise crónica (38).

O tempo de vida dos eritrócitos HPN encontra-se reduzido em 10% relativamente às células normais, (39) e correlaciona-se com a externalização de fosfatidilserina e perda de glicoforinas da sua superfície membranar (40).

O CD55 e o CD59 também são deficientes nos leucócitos e nas plaquetas (10,41). Contudo, não há evidência de uma redução na semivida dos leucócitos, provavelmente porque expressam um inibidor do complemento adicional, o CD46 (42).

O óxido nítrico (NO) é um regulador potente da fisiologia vascular e muitas das manifestações clínicas da HPN são explicadas pela depleção do NO a nível dos tecidos (5,43).

No endotélio, o oxigénio e a arginina reagem com a enzima óxido nítrico sintetase produzindo NO e citrulina. O NO mantém o tónus da parede vascular e limita a ativação das plaquetas. A hemoglobina livre do plasma tem uma enorme afinidade para o NO (10,38).

Em condições normais, a hemoglobina livre é rapidamente transportada pela membrana celular do eritrócito mas, na HPN, a sensibilidade dos eritrócitos ao complemento leva a hemólise intravascular massiva com libertação de grandes

quantidades de hemoglobina e arginase para o plasma (5,10,38,43). Isto resulta em “*scavenging*” do NO e diminuição do substrato arginina para a produção do NO (5,43,44). A haptoglobina é um mecanismo compensatório para a remoção da hemoglobina livre, mas a concentração desta na HPN excede a capacidade da haptoglobina remover a hemoglobina do plasma (5,43).

A depleção do NO leva a manifestações clínicas como fadiga, dor abdominal, espasmo esofágico, e, possivelmente, trombose que são muito mais comuns nos doentes com clones grandes HPN (45).

A trombose é uma das complicações da HPN e a principal causa de morte, que ocorre em cerca de 40% dos doentes e envolve predominantemente o sistema venoso (6).

Apesar do mecanismo de trombose não ser completamente conhecido, parece ter um papel na hemólise intravascular e suas consequências. O NO inibe a agregação plaquetária, induz a desagregação das plaquetas agregadas e inibe a adesão das plaquetas através do aumento dos níveis de cGMP (5,47). De facto, fármacos que aumentam os níveis sistémicos de NO mostraram inibir a agregação plaquetária (46).

Pelo contrário, o “*scavenging*” do NO pela hemoglobina ou a diminuição da sua produção pela inibição do metabolismo da arginina resulta no aumento da agregação plaquetária (48).

Além disso, o NO também interage com componentes da cascata da coagulação para regular a formação de coágulos (5).

As plaquetas HPN são significativamente mais sensíveis à ativação pelas proteínas C5b-9 do complemento levando à geração de trombina, que poderá contribuir para o risco trombótico da doença (39,49). As plaquetas ativadas libertam pequenas vesículas com fosfatidilserina, um potente procoagulante e estão presentes em elevados níveis nos doentes com HPN (39,50,51). Além disso, as células endoteliais também libertam micropartículas quando estimuladas, presentes igualmente em níveis elevados na HPN, e cujo fenótipo pró-trombótico e pró-inflamatório é consistente com um processo vascular inflamatório crónico (52).

Por sua vez, a fibrinólise também parece estar afetada, uma vez que monócitos e granulócitos de doentes com HPN são deficientes num recetor celular do ativador do plasminogénio tipo uroquinase (u-PAR), ligado ao GPI, e que poderá estar relacionado com a elevada incidência de trombose nestes doentes (53).

A variabilidade na gravidade da deficiência bem como na proporção das células afetadas é relevante nas manifestações clínicas da doença (23).

1.4. Patologias associadas a HPN

Esta patologia é observada em associação com outras síndromes de falência da MO principalmente com Anemia aplástica e Síndromes Mielodisplásicas (3).

1.4.1. Síndromes Mielodisplásicas

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de neoplasias mielóides cuja principal característica é a existência de alterações na proliferação e diferenciação da mielopoiese a partir de células estaminais (49,50). A hematopoiese ineficaz tem como consequência o aparecimento de citopenias no sangue periférico e as alterações na diferenciação levam a displasia numa ou várias linhagens mielóides a nível da medula óssea (MO), com um risco variável de progressão para leucemia mieloblástica aguda (LMA) (51,52).

Quanto à sua etiologia, as SMD podem ser classificadas como primárias ou *de novo* e secundárias ou relacionadas com a terapia (t-SMD). A doença primária não possui uma etiologia totalmente elucidada, sabe-se que pode advir de infeções virais, exposição ao benzeno, radiações ionizantes (52,53,54) e, mais raramente, de anormalidades congénitas (54,55). Alguns trabalhos relatam que mutações em genes que participam nas vias de sinalização celular e defeitos nos mecanismos de reparação do DNA são fatores de risco para o desenvolvimento de SMD *de novo* (56,57).

A SMD secundária (SMD-t) resulta do tratamento quimioterápico, principalmente com agentes alquilantes, ou radioterápico, (52,55) e apresenta um curso clínico mais agressivo que a SMD *de novo*. O seu desenvolvimento, geralmente, ocorre de quatro a sete anos após a exposição inicial ao agente e corresponde a, aproximadamente 10% do total de casos de SMD (52,58).

Clinicamente, os doentes com SMD apresentam citopenias (anemia, neutropenia, trombocitopenia), de gravidade variável, de que resultam diversas manifestações clínicas possíveis tais como: cansaço, dispneia de esforço, infeção, hemorragia (49).

As análises morfológicas são efetuadas para determinar a percentagem de mieloblastos e a presença ou ausência de anomalias citológicas específicas na medula óssea e no sangue periférico (63). A medula óssea é geralmente hiper ou normocelular, e numa minoria dos casos, aproximadamente 10%, hipocelular (50).

O diagnóstico é realizado através da análise do sangue periférico e da MO, por aspiração, biópsia, citogenética e citometria de fluxo (49).

A detecção de células CD34+ por citometria de fluxo ou por imunohistoquímica pode fornecer informação diagnóstica e prognóstica. Os estudos por citometria de fluxo multiparamétrica podem também evidenciar maturações anômalas em diferentes linhas mielóides (59).

O critério morfológico mínimo para o diagnóstico de SMD é a existência de displasia $\geq 10\%$ das células de qualquer linhagem celular mielóide (eritróide, granulocítica, megacariocítica) (49).

As características morfológicas das SMD geralmente incluem hiperplasia da MO com alterações dos megaloblastos, megacariócitos atípicos, hiperplasia eritróide, defeitos da maturação na série mielóide e número aumentado de blastos ou sideroblastos em anel (em alguns doentes) (50).

A displasia eritrocitária pode ser secundária a uma variedade de patologias que devem ser excluídas antes do diagnóstico de SMD, tais como: deficiências de vitamina B12, folatos e cobre; infecções víricas (incluindo infecção pelo HIV); tratamento com hidroxiureia ou outros agentes quimioterapêuticos; alcoolismo crônico; envenenamento por chumbo ou arsénio (49,59).

Várias classificações e sistemas prognósticos foram criados para melhor definir as SMD quanto à sobrevida global e risco de transformação leucêmica. Os principais são a Classificação Franco-Americana-Britânica (FAB), a Classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO), o Escore MDS/WHO, o Escore Prognóstico Internacional (IPSS) e o Escore WPSS.

a) Classificação FAB

Em 1982, o French-American-British (FAB) Cooperative Group propôs um sistema de classificação em que eram distinguidas cinco subcategorias de SMD:

1. Anemia refratária;
2. Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA);
3. Anemia refratária com excesso de blastos (AREB);
4. Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T);
5. Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC);

A principal característica que permite distinguir estes subgrupos é a proporção de mieloblastos na MO: menos de 5% na anemia refratária e na ARSA, 5 a 20% na AREB, 21 a 30% na AREB-T e 0 a 20% na LMMC. E ainda, na ARSA existem mais de 15% de sideroblastos em anel na população precursora eritrocitária, e na LMMC verifica-se a presença de monocitose ($> 1,0 \times 10^9$ células por litro) (60).

Em 2001, um comitê da OMS modificou a classificação FAB (56). A quantidade de mieloblastos necessária para o diagnóstico de LMA foi reduzida para 20% (passando as doenças anteriormente classificadas como AREB-T a ser incluídas nas LMA); a LMMC foi integrada numa nova categoria de neoplasias mielóides que têm características mielodisplásicas e mieloproliferativas (SMD-NMP); a citopenia refractária com displasia de múltiplas linhagens e as SMD isoladas com del (5q) foram reconhecidas como formas distintas da doença com baixa contagem de blastos (56). Em 2008 foram efectuados mais ajustes e as SMD foram distribuídas em seis subcategorias de acordo com a Tabela 2 (61).

Tabela 2: Classificação de SMD da Organização Mundial de Saúde (WHO) – 2008.

SUBTIPOS	CARACTERÍSTICAS DO SANGUE PERIFÉRICO	CARACTERÍSTICAS DA MEDULA ÓSSEA
AR	Anemia com ausência de blastos.	<Displasia eritróide isolada; 5%deblastos; <15%de sideroblastos em anel.
ARSA	Anemia com ausência de blastos.	Displasia eritróide isolada; <5%deblastos; ≥15%desideroblastosemanel.
Citopenia refratária c/displasia multilinha (ARDM)	Bicitopenia ou pancitopenia com ausência de blastos; Ausência de bastonetes de Auer Monocitose <1x10 ⁹ /L.	Displasia em ≥10% de células de ≥ 2 linhas mieloides; <5% de blastos; Ausência de bastonete de Auer; <15%de sideroblastos em anel.
Citopenia refratária displasia multilinha e sideroblasto em anel	Bicitopenia ou pancitopenia com ausência de blastos; Ausência de bastonetes de Auer; Monocitose <1x10 ⁹ /L.	Displasia em ≥10% de células de ≥ 2linhas mieloides; ≥15%de sideroblastos em anel; <5%deblastos; Ausência de bastonetes de Auer.
AREB-1	Citopenias; <5% de blastos; Ausência de bastonetes de Auer; Monocitose <1x10 ⁹ /L.	Displasia de ≥1 linha ou multilinha; ≥5% e <10%deblastos; Ausência de bastonetes de Auer.
AREB-2	Citopenias; >5% e <20% de blastos; Bastonetes de Auer ± Monocitose <1x10 ⁹ /L.	Displasia de uma linha ou multilinha; ≥10% e <20% de blastos; Bastonetes de Auer ±.
SMD não classificado	Citopenias; Ausência de blastos; Ausência de bastonetes de Auer.	Displasia de uma linha; <5%deblastos; Ausência de bastonetes de Auer.
SMD associado com del (5q)	Anemia; <5%deblastos; Número de plaquetas normal ou aumentado.	Megacariócitos normais ou aumentados c/ núcleo hipolobulado; <5% de blastos; Ausência de bastonetes de Auer.

AR: anemia refratária; ARS: AR com sideroblastos; AREB: AR com excesso de blastos; SMD: síndromes mielodisplásicos. Adaptado de Vardiman y col. (2002)

b) Sistema Internacional de “SCORE” Prognóstico (IPSS)

O Sistema Internacional de “Score” Prognóstico (IPSS) é um sistema usado para classificar a gravidade da SMD.

É um sistema de avaliação do prognóstico de doentes com SMD classificados com base nos critérios da WHO (a doença é “pontuada” em termos do risco para o doente), mencionado na Tabela 4. Baseia-se na percentagem de blastos na medula, no padrão citogenético e no número de citopenias, sendo útil para a avaliação da sobrevivência e do risco de evolução para leucemia aguda, facilitando deste modo a decisão clínica (62), indicado na Tabela 3.

Tabela 3: Pontuação da doença de acordo com o IPSS.

Variável	PONTUAÇÃO				
	0	0.5	1	1.5	2
Blastos MO (%)	<5	5-10	...	11-20	21-30
Cariótipo ^a	Bom	Intermédio	Mau
Citopenias ^b	0-1	2-3

(Adaptado de U. Germing et al. Leukemia 2005).

► **Legenda:**

^a Bom: normal, del (5q) isolada, del (20q) isolada, -Y isolada;

• Intermédio: outras anomalias únicas, duas anomalias;

• Mau: anomalias complexas (≥3) anomalias do cromossoma 7.

^b Citopenias: hemoglobina <10g/dL, plaquetas <100 x 10⁹/L; neutrófilos <1,8 x 10⁹/L. MO: medula óssea.

Nota: IPSS + LDH. De acordo com o German MDS Registry Düsseldorf, o valor da LDH, normal ou elevada, estabelece 2 subgrupos dentro de cada grupo de risco (IPSS), os últimos com sobrevivência marcadamente diminuída. U Germing et al.

Tabela 4: Grupos de Risco de acordo com o IPSS.

GRUPO DE RISCO				
	Baixo	Intermédio 1	Intermédio 2	Alto
Pontuação IPSS	0	0.5-1	1.5-2	≥2,5
Sobrevivência	5.7	3.5	1.2	0.4
Transformação a LMA (%)	19	30	33	45
Intervalo de evolução a LMA ^c	9.4	3.3	1.1	0.2

^cMediana (anos). IPSS: *International Prognostic Scoring System*. LMA: leucemia mieloblástica aguda. *Adaptado de Greenberg et al (Blood 1997; 89: 2079)*

O índice internacional de prognóstico (IPSS) é atualmente o *gold standard* na avaliação do risco dos doentes com SMD. Contudo, este sistema não considera a influência da dependência de transfusões de eritrócitos ou da displasia multilinha no prognóstico (62).

c) Índice de prognóstico WPSS

Foi criado em 2007, um sistema de índice prognóstico (WPSS) com base nas categorias da classificação da OMS, nos grupos de risco do cariótipo e na necessidade de transfusão de eritrócitos (62). Em contraste com os 4 grupos de risco identificados pelo IPSS, o WPSS estratifica os doentes com SMD em 5 categorias de risco diferentes: muito baixo (score=0), baixo (score=1), intermédio (score=2), alto (score=3-4) ou muito alto (score=5-6) (63).

O modelo WPSS estima a relação entre as variáveis medidas repetidamente durante o *follow-up* da doença, fornecendo uma informação prognóstica dinâmica ao longo do curso clínico (63). Assim, é possível estabelecer o prognóstico de um dado doente durante o curso da doença, inclusive no momento da progressão, enquanto o IPSS é apenas válido para estabelecer o prognóstico no momento do diagnóstico (62). De acordo com este modelo, um doente é classificado num grupo de risco no momento do diagnóstico e permanece nesse grupo enquanto o *score* não se alterar. Se o doente progredir, a categoria do WPSS altera de acordo com os resultados do *score* e o doente é seguido, subsequentemente, pelo novo grupo de risco (63).

☞ Índice de prognóstico WPSS- Grupos de risco:

1. Muito baixo
2. Baixo- Sobrevivência
3. Intermédio
4. Alto- Evolução para LMA
5. Muito alto

1.4.2. Anemia Aplástica

A anemia aplástica (AA) é uma doença da medula óssea que resulta da falência da “stem-cell” medular, caracterizada por pancitopenia (défice de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) no sangue periférico, secundária a uma medula óssea marcadamente hipocelular, afetando as três linhas celulares granulocítica, eritróide e megacariocítica. De acordo com o grau de citopenia periférica e da celularidade medular, pode ser classificada como moderada ou grave (66).

- **Moderada:** medula óssea <30% de celularidade e presença de citopenia em pelo menos duas linhas (hemoglobina <10 g/dl, plaquetas <50.000/mm³ ou neutrófilos <1.500/mm³), com ausência de pancitopenia grave. (64)
- **Grave:** medula óssea <25% de celularidade, <50% de celularidade e em que menos de 30% das células são precursores hematopoiéticos, e presença de no mínimo 2 dos 3 critérios: contagens de reticulócitos <20.000/mm³, neutrófilos <500/mm³ e plaquetas <20.000/mm³. O número de neutrófilos ao diagnóstico <200/mm³ caracteriza a AA como muito grave (66).

Genericamente podem ter etiologia hereditária ou adquirida. As hereditárias compreendem a Anemia de Fanconi, Anemia de Diamond-Blackfan, Síndrome de Shwachman-Diamond. As anemias aplásticas com causa adquirida podem ter causas Idiopática, farmacológicas, Infecções por vírus, Benzeno, Radiações ou Citotoxicidade por quimioterapia.

Devido à diversidade etiológica, a fisiopatologia da anemia aplástica é complexa, no entanto, sabe-se que a falência da hematopoiese possivelmente mediada pelo sistema imune, podendo ser secundária a fatores ambientais ou idiopáticos (67).

O sangue periférico e a medula óssea de indivíduos com anemia aplástica têm número elevado de linfócitos T citotóxicos (ativados) que atuam diretamente nas células progenitoras hematopoéticas CD34+ (stem cells) induzindo a expressão do recetor Fas e acelerando a morte celular programada (apoptose) dessas células (68). Indiretamente, estes linfócitos T produzem e libertam citocinas tais como: interferon (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), e interleucina (IL-2), que suprimem a hematopoiese por efeitos no ciclo mitótico e induzem a expressão do recetor Fas nas células CD34, ativando o Fas-ligando e iniciando a apoptose, com destruição das células progenitoras hematopoéticas e células maduras. O IFN- γ e TNF- α também podem induzir a produção da sintetase do óxido nítrico e de óxido nítrico pelas células medulares CD34, contribuindo para a citotoxicidade imunomediada e consequente apoptose. Pode ocorrer expansão clonal de linfócitos T que são responsáveis pela mielossupressão e falência das stem-cell.

A proliferação e a sobrevivência das células hematopoéticas dependem das células do estroma, que geralmente é normal e sustenta o crescimento das células CD34 normais. No entanto, as células CD34 de indivíduos com anemia aplástica não proliferam em estroma normal (68). Nestes pacientes, há uma elevada produção de fatores de crescimento hematopoéticos e níveis séricos de eritropoetina, trombopoetina, fatores estimuladores de colónias de granulócitos e macrófagos (G-CSF e GM-CSF) são geralmente elevados. A única citocina deficiente na anemia aplástica é a IL-1, que é produzida primariamente por monócitos e causa libertação de outras citocinas como G-CSF, GM-CSF e IL-3 a partir de fibroblastos e células endoteliais (68).

O diagnóstico de AA é realizado pela associação dos seguintes requisitos: pancitopenia no sangue periférico (hemoglobina <10 g/dl, plaquetas <50.000/mm³ e neutrófilos <1.500/mm³), baixa contagem de reticulócitos e a medula óssea hipocelular à biópsia, com diminuição de todos os elementos hematopoéticos e seus precursores (65).

1.4.3. Diagnóstico de Hemoglobinúria Paroxística Noturna

O diagnóstico da HPN evoluiu ao longo do tempo e, os testes bioquímicos clássicos têm sido substituídos pela citometria de fluxo.

1.4.3.1. Teste de Ham e Teste de lise da sacarose

O Teste de Ham foi, durante muito tempo, o meio de diagnóstico padrão para identificar o clone HPN nos eritrócitos. Esta técnica baseia-se no princípio de que o complemento se liga aos eritrócitos em meio ácido e os eritrócitos HPN são sensíveis à fixação do complemento (54,55).

Por sua vez, o teste de lise da sacarose foi utilizado no rastreio da HPN. Numa solução isotónica de sacarose a baixa força iónica, há agregação das globulinas séricas que fixam o complemento. Quando o soro é adicionado à solução, há lise preferencial dos eritrócitos HPN devido à sua sensibilidade ao complemento, relativamente aos eritrócitos normais. (54,55) Este teste de execução muito simples, é considerado positivo se a hemólise for superior a 5%, mas resulta em mais falsos positivos relativamente ao teste de Ham (55).

O Teste de Ham e o de lise da sacarose não são específicos para a doença, só detetam o defeito proteico nos eritrócitos e deixam de ter utilidade após transfusão devido à ocorrência de resultados falsos negativos (56). Além disso, não tem sensibilidade suficiente para detetar pequenas populações de células HPN nem possibilitam a avaliação do tamanho real do clone HPN, e não diferenciam as células com deficiência parcial ou completa das proteínas ligadas ao GPI (57,58)

1.4.3.2. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia bastante eficaz, uma vez que permite a utilização de diferentes parâmetros simultaneamente (tamanho, complexidade e várias fluorescências) para estudo celular, e apresenta uma elevada sensibilidade (consegue caracterizar uma célula em 100.000 células). Esta técnica permite a análise de todas as populações do sangue periférico: eritrócitos, plaquetas e leucócitos (60).

O diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna é feito através da identificação de células deficitárias em glicosilfosfatidil-inositol (GPI). A imunofenotipagem dos eritrócitos e granulócitos pela citometria de fluxo é o método de escolha para o screening, diagnóstico e monitorização da HPN. O uso combinado desta com kits comerciais disponíveis tais como a Aerolisina-FLAER, CELLQUANT e REDQUANT constituem técnicas simples, rápidas, padronizadas e sensíveis no *screening* de doentes com suspeita de HPN (64).

Atualmente a imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) tornou-se na técnica de eleição para a identificação de células deficitárias de proteínas GPI, de utilidade no diagnóstico, classificação e monitorização de pacientes com diferentes formas clínicas de HPN. (59)

Existe uma grande variabilidade de resultados com os diferentes protocolos utilizados no diagnóstico de HPN por CFM. No entanto foram criadas algumas considerações gerais no sentido de homogeneizar os resultados entre laboratórios distintos, tais como: o estudo da expressão de moléculas associadas a GPI deve realizar-se em pelo menos duas linhagens celulares, com no mínimo dois antígenos celulares (63,10). Assim evitam-se erros provenientes da ausência congénita da expressão de algum antígeno (especialmente do CD16), da influência da intensidade de hemólise ou devido a transfusões.

O sangue periférico constitui a fonte de células hematopoiéticas mais adequada para o diagnóstico de HPN, a fim de evitar interpretações erradas devido à presença de formas mielóides imaturas, com expressão variável de moléculas associadas a GPI devido ao estágio de maturação, no entanto também pode ser feita, em muitos casos, em amostras de medula óssea (69).

As populações celulares mais adequadas para a identificação do défice de expressão de proteínas associadas são as populações leucocitárias: neutrófilo e monócito. Também se realiza o estudo em eritrócitos (69,70).

O estudo de linfócitos não é recomendado pelas discrepâncias no tamanho do clone, comparando com os granulócitos e devido ao maior tempo médio de vida destes. O estudo de plaquetas também não é feito habitualmente devido à expressão fraca e variável de CD55 e CD59 em indivíduos saudáveis (70).

A amostra de sangue periférico deve ser colhida par um tubo com anticoagulante: EDTA (não com heparina), a fim de evitar interpretações erróneas devido à presença de formas mielóides imaturas com expressão variável de moléculas associadas a GPI, devido ao seu estágio de maturação (10,62,63). A realização em paralelo do estudo de HPN numa amostra de sangue controlo normal é recomendada, assim como o estudo dos granulócitos nas primeiras 24h para evitar marcações inespecíficas. Os eritrócitos poderão ser estudados até duas semanas após a sua extração, se mantidos a 4°C (69).

• Marcadores associados a GPI

A expressão das proteínas ancoradas ao GPI varia muito nas diversas subpopulações de células hematopoiéticas (61) e nos diferentes estádios de maturação (62).

O CD55 e CD59 estão presentes em todos os tipos de células hematopoiéticas, incluindo células dendríticas e linfócitos, apesar de expressos em níveis diferentes (60), e a deteção de níveis baixos de CD55 e CD59 é consistente com a doença (77).

Existe um consenso na marcação direta com anticorpos monoclonais, sendo preferível eleger anticorpos frente a moléculas que se expressem de forma intensa e homogénea em células normais de sangue periférico, com pouca afinidade por ligações inespecíficas. Os anticorpos utilizados com maior frequência são dirigidos para os seguintes marcadores: CD16, CD24, CD66, CD55 e CD59 em Neutrófilos; CD14, CD55 e CD59 em Monócitos; CD59 e CD55 em Eritrócitos. Outros anticorpos para o CD52 (linfócitos e monócitos), CD87 (neutrófilos, monócitos e linfócitos T ativados) ou CD48 (linfócitos e monócitos) utilizam-se com menor frequência (9). A marcação multiparamétrica permitirá aumentar a sensibilidade ao detetar pequenos clones de células HPN. É recomendada a marcação de CD16, CD24 e CD66 em neutrófilos e de CD14 em monócitos. Para *screening* pode ser utilizado unicamente CD16 e CD14.

Estes anticorpos permitem uma melhor separação entre as células normais e os clones HPN. Deverá haver o recurso a anticorpos não associados a GPI para a correta separação das populações celulares em estudo, principalmente na separação de neutrófilos e monócitos com base no tamanho e complexidade (FSC e SSC) e em caso da presença de neutrófilos hipogranulares. Os anticorpos mais utilizados são CD15 e CD33 em combinação com SSC (10). O cálculo do tamanho do clone de células HPN é necessário para valorizar o risco trombótico e hemolítico de cada paciente. Se superior a 50% de granulócitos HPN (tipo II e III), maior risco trombótico. Se superior a 20% de eritrócitos HPN tipo III, a hemólise é invariável (63).

• Clones deficitários em GPI com suspeita de Síndromes Mielodisplásicas (SMD) e Anemia Aplástica (AA)

Para a investigação da presença de clones de células com défice expressão de proteínas associadas a GPI em Medula Óssea de doentes com SMD ou AA, é

recomendado adaptar-se o painel de anticorpos usado, para o estudo de ambas entidades como recomenda o grupo Euroflow, tal como se pode verificar na Tabela 5.

Este grupo foi criado com o objetivo de desenvolvimento, padronização, rapidez, precisão e sensibilidade, no diagnóstico, classificação e subclassificação de doenças hemato-oncológicas por citometria de fluxo, bem como a avaliação da eficácia do tratamento e seguimento do mesmo.

Tabela 5: Painel EuroFlow para a classificação de SMD: diagnóstico de células deficitárias a proteínas associadas a GPI.

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
Pacific Blue	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR
Pacific Orange	CD45	CD45	CD45
Pacific Blue	CD16	CD35	CD36
FITC	CD13	CD64	CD105
PE	CD34	CD34	CD34
Per-CP-Cy 5.5	CD117	CD117	CD117
Pe-Cy7	CD11B	IREM2	CD33
Pacific Blue	CD10	CD14	CD71
Objetivo	Diagnóstico e subclassificação de LMA/ MDS e HPN – linha neutrófilo	Diagnóstico e Subclassificação de LMA/MDS e HPN-linha monócito	Diagnóstico e subclassificação da linha eritróide

Dentro da linhagem de neutrófilos normal, vários marcadores, como CD10, CD11b, CD13 e CD16 são expressos de um modo específico do estágio de maturação. Estes marcadores permitem a caracterização detalhada da via de maturação dos neutrófilos a partir de células mielóides imaturas (blastos) até aos mais maduros (71). Anormalidades na expressão destes marcadores são frequentemente vistas em pacientes com SMD e LMA.

No que diz respeito à linhagem monocítica, o CD14 é considerado o marcador típico para os monócitos, mas é expresso apenas durante a fase final de maturação de monocítica.

Em contraste, a CD64 (e, em menor grau CD36) já estão expressos durante as fases iniciais da diferenciação monocítica. Portanto, o uso de pelo menos um destes dois

marcadores (preferencialmente CD64) é necessária para a identificação de células monocíticas iniciais.

A expressão de CD33 aumenta no início do desenvolvimento da série monocítica para níveis mais elevados do que aqueles das células precursoras de granulócitos. Este padrão de expressão do CD33 também facilita distinguir células monocíticas de granulocíticas.

O CD11b está ausente em células monocíticas imaturas, mas é expresso durante as fases posteriores. A combinação dos marcadores de CD36/CD64/CD11b/CD14 é muito útil na linha monocítica.

O IREM-2 (immune receptor expressed on myeloid cells 2) é uma glicoproteína, cuja expressão em células hematopoiéticas normais é restrita a células das linhagens de células monocíticas e dendríticas. Durante o desenvolvimento normal, o IREM2 é expresso nos últimos estádios de maturação após o CD14 ser muito expresso (71).

Os anticorpos utilizados na linhagem eritróide são o CD55 e CD59, podendo-se estudar também marcadores como CD235a (glicoforina A), CD71 e CD36, utilizados para avaliação da diferenciação desta série. O CD36 e o CD105 são expressos durante os primeiros estádios de diferenciação eritróide, antes de CD235a se tornar positivo (72,73).

• **Preparação de amostras, aquisição e análise de dados**

Tanto o anticoagulante como as condições de transporte, armazenamento e preparação da amostra usados para o estudo da expressão de proteínas associadas a GPI em populações leucocitárias de sangue periférico, devem ser feitas seguindo as técnicas convencionais utilizando imunofluorescência direta (marcação dos anticorpos monoclonais seguido de lise dos eritrócitos, lavagem e fixação em líquido isotônico com fixador.

No caso de se utilizar a técnica FLAER, deve seguir-se o protocolo recomendado pelo fabricante para as análises com o marcador utilizado (74). Recomenda-se a aquisição de um número suficiente de eventos para obter sensibilidade na detecção de pequenas populações representadas na amostra, com precisão elevada.

Para a análise de dados são necessárias ferramentas informáticas que permitam através da análise multiparamétrica, identificar as subpopulações de granulócitos neutrófilos e monócitos maduros assim como em eritrócitos.

A análise resulta da comparação de populações de referência de neutrófilos, monócitos e ou eritrócitos normais e deficitários em GPI disponíveis no programa

informático INFINICYT. O Infinicyt® é um *software* de análise para arquivos gerados no Citómetro de Fluxo, capaz de integrar, de forma rápida e simples os arquivos gerados por cada um dos tubos a partir de uma mesma amostra, produzindo informações completas e também uma análise objetiva multidimensional mais rápida. Este possui ferramentas exclusivas que permitem uma melhor identificação e descrição das diferentes populações de células.

1.4.4. Tratamento

O único tratamento curativo para a HPN é o transplante de células hematopoiéticas, contudo existe um risco considerável de mortalidade e morbidade, (4,67) e a maioria dos doentes não são candidatos ou não tem um dador compatível (38).

Até há pouco tempo atrás, o tratamento da HPN era predominantemente de suporte, incluindo suplementos de ácido fólico, transfusões, suplementos de ferro e, em alguns casos, quelação do ferro quando as transfusões resultavam em excesso de ferro (67).

O tratamento imunossupressor é o tratamento alternativo, quando não é possível submeter o paciente a um transplante de células hematopoiéticas, que se baseia na combinação de globulina anti-timócito (ATG) e ciclosporina A.

A trombose é uma complicação frequente em doentes com HPN, sendo a principal causa de morte. Dado que o risco de trombose se associa com o tamanho do clone celular HPN (> 50%) e que a existência de uma trombose prévia aumenta o risco, recomendam-se medidas profiláticas. Fenómenos trombóticos agudos na HPN devem ser tratados com heparinização plena, seguida de anticoagulação oral, mantendo o INR (razão normalizada internacional) entre 2 e 3.

Dados recentes mostram que doentes HPN, tratados com eculizumab, têm uma redução significativa de eventos trombóticos. A HPN é uma doença sistémica em que há um risco aumentado de hemólise, de trombose venosa e arterial, insuficiência renal, hipertensão pulmonar e distonias da musculatura lisa que explicam a grande morbidade e mortalidade destes pacientes.

Estas complicações são consequência direta da hemólise e da diminuição de óxido nítrico (NO) pela hemoglobina livre intramuscular. Assim, a supressão da hemólise através do anticorpo monoclonal (mAb) eculizumab resulta não só na melhoria dos níveis de hemoglobina e diminuição procedimentos transfusionais mas também uma melhoria da sintomatologia clínica em relação à distonia do músculo liso. A administração de

eculizumab diminui a incidência de trombozes, melhora a função renal, diminui a hipertensão pulmonar, levando a uma melhoria na qualidade de vida de pacientes com HPN (68).

O eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína C5 do complemento. Inibe a clivagem em C5a e C5b, o que previne a libertação do mediador inflamatório C5a e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), (C5b-C9), preservando os componentes iniciais do complemento essenciais à opsonização dos microrganismos e clearance dos complexos imunes (68). O bloqueio dos componentes terminais do complemento, parece prolongar a sobrevivência dos eritrócitos HPN III, altamente sensíveis à lise mediada pelo complemento, aumentando assim a proporção destas células no sangue com redução dos sinais de hemólise (69).

II. OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença clonal da célula-mãe hematopoiética pluripotente (stem-cell), que origina um clone de células que adquirem uma mutação somática no gene *PIG-A*, condicionando assim, a deficiência total ou parcial da expressão de proteínas ancoradas à membrana através de Glicosilfosfatidilinosítois.

É uma patologia rara que surge em associação com outras doenças hematológicas, como a anemia aplástica e as síndromes mielodisplásicas.

Com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para o melhor conhecimento da frequência desta patologia rara em casos com suspeita de SMD, e demonstrar que a pesquisa de clones HPN em amostra de medula óssea é viável, utilizando para o efeito estratégias fenotípicas que permitam identificar com segurança os estádios finais das diferentes linhas mielóides.

2. Objetivos específicos

Avaliar a frequência de casos com suspeita de Síndromes Mielodisplásicas com a presença de clones de hemoglobinúria paroxística noturna nas linhas granulócito/neutrófilo e monocítica através da análise imunofenotípica multiparamétrica por citometria de fluxo com anticorpos específicos para proteínas ancoradas por GPI.

Comparar a percentagem dos clones HPN nas linhas granulócito/neutrófilo e monocítica na medula óssea e no sangue periférico, nas mesmas amostras.

Estudar a expressão de outras moléculas não GPI nas células maduras das linhas granulócito/neutrófilo e monocítica com e sem deficiência nas proteínas GPI.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. População em estudo

Da análise imunofenotípica de um total de oitocentos e vinte e seis doentes que apresentavam alterações fenotípicas na(s) linha(s) maturativa(s) sugestivas da presença de síndromes mielodisplásicas (SMD), detetaram-se 7 casos cujo estudo inicial indicou a possível presença de clones HPN (por exemplo, défice de CD14 em monócitos ou CD16 em granulócitos maduros), dos quais em três pacientes o estudo foi feito só em amostras de medula óssea e nos restantes quatro, o estudo foi feito em medula óssea e sangue periférico.

Em termos de distribuição por sexo (F, feminino; M, masculino), verificou-se que dos sete pacientes incluídos no estudo, três eram do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com uma média de idade de 50 anos, sendo que as idades da amostra se apresentam num intervalo entre 30 e 70 anos.

2. Caracterização fenotípica da expressão de proteínas membranares em amostras de sangue periférico e medula óssea

As amostras de sangue periférico e medula óssea foram caracterizadas utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Quantificou-se a expressão de proteínas membranares, nas amostras de sangue periférico e medula óssea, de acordo com o painel EUROFLOW para diagnóstico de SMD, com a marcação de três tubos a oito fluorescências.

No Tubo 1- Estudo da maturação da linha a Neutrófilo, Tubo 2- Estudo da maturação da linha a Monócito, Tubo 3- Estudo da maturação da Linha Eritróide, conforme a Tabela 6.

Tabela 6: Combinação de anticorpos monoclonais para a caracterização fenotípica de proteínas membranares em Medula Óssea e Sangue Periférico para diagnóstico de SMD.

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
PB (Pacific Blue)	HLA-DR (2.5ul) Clone: Immu-357 <i>Beckman Coulter, França</i>	HLA-DR (2.5ul) Clone: Immu-357 <i>Beckman Coulter, França</i>	HLA-DR (2.5ul) Clone: Immu-357 <i>Beckman Coulter, França</i>
PO (Pacific Orange)	CD45 (2.5ul) Clone: HI30 <i>Invitrogen, USA</i>	CD45 (2.5ul) Clone: HI30 <i>Invitrogen, USA</i>	CD45 (2.5ul) Clone: HI30 <i>Invitrogen, USA</i>
FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)	CD16 (5ul) Clone: 3G8 <i>Beckman Coulter, França</i>	CD35 (5ul) Clone: E1 <i>BD, Pharmingen, USA</i>	CD36 (5ul) Clone: FA6.152 <i>Beckman Coulter, França</i>
PE (Ficoeritrina)	CD13 (5ul) Clone: WM15 <i>BD, Biosciences, USA</i>	CD64 (5ul) Clone: 22 <i>Beckman Coulter, França</i>	CD105 (5ul) Clone: IG2 <i>Beckman Coulter, França</i>
PerCP-Cy5.5	CD34 (5ul) Clone: 8G12 <i>BD Biosciences, USA</i>	CD34 (5ul) Clone: 8G12 <i>BD Biosciences, USA</i>	CD34 (5ul) Clone: 8G12 <i>BD Biosciences, USA</i>
PE-cy7 (Ficoeritrina Cianina 7)	CD117 (2.5ul) Clone: 104D2D1 <i>Beckman Coulter, França</i>	CD117 (2.5ul) Clone: 104D2D1 <i>Beckman Coulter, França</i>	CD117 (2.5ul) Clone: 104D2D1 <i>Beckman Coulter, França</i>
APC (Alofocianina)	CD11b (2.5ul) Clone: ICRF44 <i>BD Biosciences, USA</i>	IREM-2 (5ul) Clone: UP-H2 <i>Immunostep, Espanha</i>	CD33 (2.5ul) Clone: WM53 <i>BD Biosciences, USA</i>
APC-H7 (Alofocianina H7)	CD10 (5ul) Clone: HI10A <i>BD, Biosciences, USA</i>	CD14 (2.5ul) Clone: MφP9 <i>BD Biosciences, USA</i>	CD71 (2.5ul) Clone: M-A712 <i>BD Biosciences, USA</i>

2.1. Procedimento 1: Pesquisa de clones HPN em Medula óssea e Sangue Periférico

A medula óssea foi transferida para um tubo de polipropileno de fundo cônico de 15 ml e lavou-se duas vezes com soro fisiológico, durante 5 minutos a 1500 r.p.m., antes da marcação.

Efetou-se um hemograma das amostras no contador hematológico (Ac Tdiff 2, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). O estudo efetuou-se através de um processo de marcação direta, de acordo com o seguinte procedimento: pipetou-se 100µl de amostra (aproximadamente 2×10^6 células), para os tubos. Nas amostras de sangue periférico pipetou-se 200 µl.

De seguida procedeu-se à incubação das amostras com os vários anticorpos monoclonais cujo volume usado se encontra descrito na Tabela 6. Incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Efetuou-se a lise dos eritrócitos com 2ml de FACS Lysing (1x) (FACSTM Lysing Solution; Becton Dickinson Biosciences, U.S.A.), previamente diluído a 1:10 em água destilada. Incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Centrifugou-se durante 5 minutos a 1500 r.p.m. e decantou-se o sobrenadante.

Por fim adicionou-se 1 ml de PBS (1x) (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.4, 10x, GIBCO, U.S.A.) previamente diluído a 1:10 em água destilada. Centrifugou-se a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 250 ml de PBS (1x). Por fim adquiriram-se as amostras no citómetro de fluxo.

2.1.1. Screening para pesquisa de clones HPN em Medula óssea

Para o estudo inicial em medula óssea em leucócitos é realizado um tubo Screening, com os seguintes anticorpos monoclonais: Tubo Screening: CD16/ CD64/ CD45/ CD14.

Prossegue-se o estudo, caso haja alguma alteração significativa no estudo anterior com os anticorpos monoclonais, de acordo com as combinações de anticorpos monoclonais descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Combinações de anticorpos monoclonais para continuação do estudo, caso se verifique suspeita de HPN.

	TUBO 1	TUBO 2
FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)	CD16 (5ul) Clone: 3G8 <i>Beckman Coulter,</i> <i>França</i>	CD16 (5ul) Clone: 3G8 <i>Beckman Coulter,</i> <i>França</i>
PE (Ficoeritrina)	CD55 (20 µl) Clone: 1A10 <i>BD, Pharmingen</i> <i>USA</i>	CD59 (20µl) Clone: p282H19 <i>BD, Pharmingen</i> <i>USA</i>
	CD64 (5ul) Clone: 22 <i>Beckman Coulter</i> <i>França</i>	CD64 (5ul) Clone: 22 <i>Beckman Coulter</i> <i>França</i>
PO (Pacific Orange)	CD45 (2.5ul) Clone: HI30 <i>Invitrogen,</i> <i>USA</i>	CD45 (2.5ul) Clone: HI30 <i>Invitrogen,</i> <i>USA</i>
APC-H7 (Alofocianina H7)	CD14 (2.5ul) Clone: MφP9 <i>BD Biosciences,</i> <i>USA</i>	CD14 (2.5ul) Clone: MφP9 <i>BD Biosciences,</i> <i>USA</i>
	CD10 (5ul) Clone: HI10A <i>BD, Biosciences,</i> <i>USA</i>	CD10 (5ul) Clone: HI10A <i>BD, Biosciences,</i> <i>USA</i>

2.1.2. Screening para pesquisa de clones HPN no sangue periférico

Caso se verifique suspeita de HPN faz-se o estudo inicial de leucócitos em sangue periférico com:

Tubo Screening: CD16/ CD64/ CD45/ CD14.

Prossegue-se o estudo, caso haja alguma alteração significativa no estudo anterior com:

Tubo 1: CD16/CD55/CD45/CD14;

Tubo 2: CD16/CD59/CD45/CD14.

2.2. Procedimento 2: Pesquisa de clones HPN na serie eritróide e plaquetária

O estudo efetuou-se através de um processo de marcação direta, de acordo com o seguinte procedimento. Pipetou-se 5µl de sangue periférico mais 95 µl de PBS para os tubos.

De seguida procedeu-se à incubação de dois tubos com os vários anticorpos monoclonais, cujo volume usado se encontra descrito na Tabela 8. Incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Centrifugou-se durante 5 minutos a 1500 r.p.m. e decantou-se o sobrenadante. Por fim, adicionou-se 1 ml de PBS (1x) e centrifugou-se a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.

Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 250 ml de PBS (1x). De seguida, adquiriram-se as amostras no citómetro de fluxo.

Tabela 8: Combinação de anticorpos monoclonais usados para a série eritróide e plaquetária.

	TUBO1	TUBO 2
PE (Ficoeritrina)	CD55 (20 µl) Clone:IA10 <i>BD, Pharmingen;</i> USA	CD59 (20µl) Clone:p282H19 <i>BD, Pharmingen,</i> USA
FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)	CD61 (10ul) Clone:RUU-PL7F12 <i>BD, Biosciences,</i> USA	CD61 (10ul) Clone:RUU-PL7F12 <i>BD, Biosciences,</i> USA
APC (Alofocianina)	CD41a (10ul) Clone:HIP8 <i>BD, Pharmingen,</i> USA	CD41a (10ul) Clone: HIP8 <i>BD, Pharmingen,</i> USA
PO (Pacific Orange)	CD45 (2.5ul) Clone:HI30 <i>Invitrogen,</i> USA	CD45 (2.5ul) Clone:HI30 <i>Invitrogen,</i> USA

3. Análise Estatística

Foi feita uma análise descritiva da população utilizando o *software* SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Para determinar a significância estatística de todas as variáveis em estudo, aplicou-se o teste Mann Whitney-U, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Da análise imunofenotípica de um total de oitocentos e vinte e seis doentes que apresentavam alterações fenotípicas na(s) linha(s) maturativa(s) sugestivas da presença das síndromes mielodisplásicas (SMD), detetaram-se sete casos cujo estudo inicial indicou a presença de clones HPN (por exemplo, défice de expressão de CD14 em monócitos ou de CD16 em granulócitos maduros) e para os quais foi estudada a expressão de outras proteínas de membrana ancoradas por GPI.

A frequência de casos de HPN entre Julho de 2010 e Novembro de 2012 foi de 7 em 826 doentes com suspeita de SMD, representando uma incidência de 0.8%. Os clones foram identificados em sangue periférico ou medula óssea, no entanto, em apenas 4 indivíduos foram detetados em ambos os fluidos biológicos. Nos restantes 3 indivíduos, apenas foi analisada a medula óssea.

Na Tabela 9 estão representadas as percentagens dos clones HPN na linha a neutrófilo, monocítica e eritróide dos 4 indivíduos onde foi analisada simultaneamente amostra de medula óssea e de sangue periférico. As restantes amostras em que só foi feita a análise de medula óssea encontram-se descritas na Tabela 10. Entre as 7 amostras analisadas, uma amostra apresentou o tamanho do clone inferior a 1%, uma amostra apresentou uma percentagem de clone entre 1 a 10%, sendo que as restantes 5 amostras analisadas apresentaram um tamanho de clone superior a 10%.

Tabela 9: Análise comparativa das percentagens de clones HPN, nas células de linha a neutrófilo, monocítica e eritróide, com fenótipo de célula madura, em sangue periférico (SP) e medula óssea (MO).

Nº	AMOSTRA	NEUTRÓFILOS	MONÓCITOS	ERITRÓCITOS
1	MO	40%	40%	50%
	SP	37%	33%	51%
2	MO	73%	68%	76%
	SP	90%	95%	90%
3	MO	26%	90%	79%
	SP	14%	76%	83%
4	MO	0.5%	1.3%	3.6%
	SP	1.2%	1.5%	7%

Tabela 10: Análise comparativa das percentagens de clones HPN, nas células de linha a neutrófilo, monocítica e eritróide, com fenótipo de célula madura, em apenas medula óssea (MO).

Nº	AMOSTRA	NEUTRÓFILOS	MONÓCITOS	ERITRÓCITOS
5	MO	2%	7%	13%
6	MO	83%	86%	80%
7	MO	10%	9%	20%

Fez-se a análise de expressão de diferentes recetores de membrana nas células maduras para a linha a neutrófilo e para a linha a monócito, utilizando marcadores específicos de cada linha.

A Tabela 11 identifica as alterações detetadas nas amostras estudadas na linha a monócito nomeadamente para os marcadores IREM-2 e CD13. Foi determinado o ratio da expressão (MIF) Clone HPN/célula Normal para uniformizar os valores obtidos de expressão e conseqüentemente poder comparar o fenótipo de célula madura normal e do clone HPN.

Tabela 11: Ratio da expressão (MIF) de diferentes moléculas nas células com fenótipo de célula madura entre Clone HPN/ célula normal nas linhas a neutrófilo e monócito.

Nº casos	RATIO CLONE HPN/CLONE NORMAL MADURO										
	Neutrófilo				Monócito						
	CD11b	CD13	CD10	CD33	IREM-2	CD64	CD33	CD35	DR	CD13	CD11b
1	1.4	1.3	1.0	-	0.09	1.1	-	-	-	0.7	1.0
2	-	-	1.0	-	0.1	-	-	-	-	-	-
3	1.3	1.0	1.2	0.7	0.08	1.1	1.2	0.5	0.7	-	-
4	0.9	1.0	1.0	1.7	0.05	1.1	1.0	0.9	0.9	-	-
5	1	0.9	-	1.2	0.03	0.1	0.9	1.1	0.4	-	-
6	0.3	0.7	1.0	-	-	1.0	-	0.8	-	-	-
7	-	-	-	1.2	-	-	1.1	-	-	-	-
8	-	-	-	0.4	0.1	-	1.1	-	-	-	-
9	-	-	1.1	-	0.1	1.2	-	1.0	1.1	-	-
10	1.5	1.8	1.3	-	0.2	1.1	-	0.9	1.4	0.6	0.9
Média	1.1	1.1	1.1	1.0	0.1	1.1	1.1	0.9	0.9	0.6	1.0
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
DP	0.4	0.4	0.1	0.5	0.05	0.07	0.1	0.2	0.4	0.05	0.08

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas (figura 3) na expressão de IREM-2 entre o clone HPN e células normais da linha monocítica.

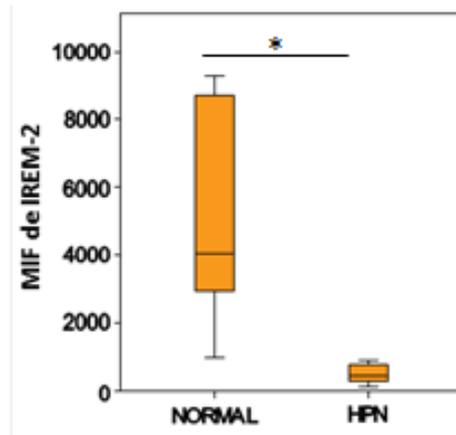


Figura 3: Expressão de IREM-2 nas células maduras normais e no clone HPN nos monócitos em sangue periférico e medula óssea. Os resultados ilustram a intensidade média de fluorescência (MIF) deste marcador; *diferenças estatisticamente significativas com $p = 0.001$

V. DISCUSSÃO

A Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença clonal, não maligna e adquirida, da célula mãe hematopoiética pluripotente, que origina um clone de células que adquirem uma mutação somática no gene *PIG-A*, condicionando assim carência total ou parcial da expressão de proteínas ancoradas à membrana através de GPI (glicosil-fosfatidilinositol).

Esta patologia surge em associação com outras doenças hematológicas, como a anemia aplástica e as síndromes mielodisplásicas, que tem uma incidência de 0,05-0,13 casos por 100.000 habitantes por ano, com uma prevalência estimada de 0,7 casos por 100.000 habitantes em que 50% dos pacientes morrem de sua doença, com uma sobrevida média de 10 anos (3,14).

A taxa de incidência das síndromes mielodisplásicas no Norte de Portugal em 2007, segundo o Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO), é de 1,3%, sendo que os casos registados surgiram depois dos 35 anos. Ainda segundo este documento, a taxa de incidência europeia é de 1%.

O diagnóstico de HPN tem sido baseado na deteção de clones HPN pela marcação de proteínas GPI no sangue periférico (77). O sangue periférico tem sido utilizado para este fim em detrimento da medula óssea, para evitar interpretações incorretas uma vez que na MO existem células mielóides imaturas com expressão variável de proteínas GPI (9,10,62). Os clones HPN de linha a neutrófilo e linha a monócito caracterizam-se por expressarem baixas ou nenhuma quantidades à superfície de proteínas GPI e podem apresentar um tamanho variável consoante o tipo de HPN (9,10).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo tornou-se a técnica de eleição no diagnóstico e monitorização da HPN proporcionando a deteção de clones HPN. (76)

O diagnóstico de clones HPN baseia-se na deteção de proteínas que se ligam a GPI, nomeadamente o CD55 e o CD59. Estas proteínas estão envolvidas no sistema do complemento nomeadamente na atividade lítica e na sua ausência, a célula apresenta maior suscetibilidade.

O CD16 (em neutrófilos) e CD14 (em monócitos) também têm sido utilizados para ajudar ao diagnóstico e monitorização de HPN, e mais recentemente tem sido proposto a utilização concomitante de anticorpos dirigidos contra estes recetores, uma vez há maior proporção de clones HPN em monócitos e neutrófilos (61).

Deverá haver o recurso a anticorpos monoclonais contra proteínas não associadas a GPI para a correta separação das populações celulares em estudo, principalmente na separação de neutrófilos e monócitos no estágio final da maturação.

O cálculo do tamanho do clone de células HPN também é necessário para avaliar o risco trombótico e hemolítico de cada paciente.

Neste trabalho, para identificar os clones HPN, foram utilizadas anticorpos dirigidos contra proteínas GPI, tais como o CD14 e CD16. Ambos os marcadores permitem a identificação inequívoca de células HPN em todos os pacientes e, além disso a percentagem mais elevada de células afetadas corresponde sistematicamente a estas duas populações de células (76).

Num estudo desenvolvido por Iwanaga et al. (1998), foi descrita uma incidência de 10% de clones HPN em pacientes com SMD (78). Os resultados do presente estudo indicam uma menor incidência de clones HPN em SMD comparativamente com o descrito anteriormente. Esta discrepância poderá estar associada com o facto de no grupo de 826 doentes estudados terem sido incluídos todos os casos com suspeita de SMD e não unicamente aqueles com diagnóstico confirmado, assim como, aos diferentes procedimentos aplicados pelos diferentes laboratórios (75).

Quando comparada a percentagem do clone HPN em sangue periférico e medula óssea num mesmo doente (Tabela 9) verificou-se que o seu tamanho era semelhante, demonstrando-se desta forma ser válido quantificar clones HPN em ambos os tipos de amostra biológica.

Na Tabela 11 verificámos que apenas os marcadores IREM-2 e CD13 da linha a monócito se encontravam alterados, sendo que na linha a neutrófilo não se detetaram nenhuma alterações no ratio da expressão (MIF) Clone HPN/célula Normal.

O IREM 2 é um marcador de superfície que deve ser quantificado por citometria de fluxo para identificação e contagem de monócitos, também conhecido por CD300 e ou CMRF-35 e está localizado no cromossoma humano 17 (79). Aparece no final da maturação dos monócitos, depois do CD14 e é específico para monócitos e para uma população de células dendríticas mielóides relacionadas com o monócito. No sangue periférico normal deve ser positivo em pelo menos 80% de monócitos (79).

Na Tabela 11 e figura 3, pode-se verificar que o recetor IREM-2 se encontra menos expresso nos clones HPN estudados quando comparado com células de linha monocítica normais e com fenótipo de célula madura.

No estudo publicado por Aguilar et al. (2004), é sugerido que o IREM-2 é um recetor transmembranar da superfamília Ig na linhagem a monocítica (79), sugerindo que

este recetor não é uma proteína GPI. Os resultados obtidos neste estudo não vão ao encontro do anteriormente descrito, sugerindo que este recetor pode ser uma proteína GPI.

Na linha a monócito, o CD 13 ou a Aminopeptidase N é outro marcador que apresenta variação do ratio da expressão (MIF) Clone HPN/célula Normal, conforme demonstrado na Tabela 11. O CD13 é expresso em vários tecidos, incluindo no epitélio intestinal e renal, endotélio, fígado, pulmão e cérebro, assim como em monócitos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos B, excluindo linfócitos T e timócitos. Apesar de as células da linha mielóide expressarem grandes quantidades de CD13, o seu papel na interação intercelular ainda não foi suficientemente explorado (80).

O estudo de clones HPN em MO deverá focar-se exclusivamente nas formas mielóides maduras e em caso de suspeita de HPN (por exemplo, défice de CD14 em monócitos ou CD16 em granulócitos maduros), recomenda-se a solicitação de amostra de sangue para confirmar o diagnóstico de HPN. (76)

Este trabalho visou contribuir para um melhor conhecimento da frequência desta patologia rara em casos com suspeita de SMD, e demonstrar que a pesquisa de clones HPN em amostra de medula óssea é viável, visto que quando comparada a percentagem dos clones HPN nas linhas granulócito/neutrófilo e monocítica em amostras de medula óssea e no sangue periférico, os resultados assemelham-se.

No entanto, este estudo apresenta algumas limitações como (1) um número de amostras com clone HPN muito baixa impedindo de ter resultados com maior grau de confiança; (2) nem sempre foi obtido do mesmo paciente os dois tipos de amostra biológica utilizados no estudo, nomeadamente, sangue periférico e medula óssea, o que resultou em apenas 4 casos onde estes critérios se verificaram para se poder comparar as percentagens; (3) nos 826 doentes estudados foram incluídos pacientes com suspeita de SMD e não unicamente aqueles com diagnóstico confirmado.

É de extrema importância a uniformização de metodologias universais que possam ser seguidas e aplicadas em diferentes laboratórios, permitindo o diagnóstico e monitorização mais eficaz e correta da HPN, com identificação e quantificação dos clones HPN.

VI. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, parece poder-se concluir que é válida a detecção de clones HPN para o diagnóstico HPN em medula óssea da mesma forma que é feito em sangue periférico.

Os resultados do presente estudo indicam uma menor incidência de clones HPN em SMD comparativamente com outros estudos prévios

A detecção de diferenças claras na expressão de IREM-2 em monócitos sugere que esta possa ser uma nova proteína GPI passível de ser estudada na linha monocítica. No entanto, estes resultados carecem de mais estudos no sentido de clarificar e caracterizar o IREM-2, do ponto de vista funcional, estrutural e bioquímico.

Sugere-se a avaliação de um maior número de casos com diagnóstico efetivo de SMD de forma a se confirmar a verdadeira a frequência de clones HPN.

BIBLIOGRAFIA

1. Hill A, Philip JP, Simth A, Richards SJ, Cullen MJ, Hill QA, Roman E, Hillmen P. The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; 108:985.
2. Parker CJ, Ware RE. Paroxymal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, *et al.* *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009:998-1020.
3. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socié G; International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106 (12):3699-709.
4. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J. Haematol*, 2007; 137(3):181-92.
5. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracelular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293(13):1653-62.
6. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl. J. Med*, 1995:333(19):1253-8.
7. Hillmen P, Richards SJ. Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J. Haematol*, 2000; 108(3):470-9.
8. Hernández-Campo PM, Almeida J, López A, Orfão A. Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clin (Barc)* 2008; 131: 617-30.
9. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42B: 223-33.

10. Richards SJ, Barnett D. The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 2007; 27: 577-90.
11. Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an acquired X-linked genetic disease with somatic-cell mosaicism. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16(3):317-22.
12. Savage WJ, Brodsky RA. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2007; 12 (5):371-6.
13. Medof ME, Kinoshita T, Nussenzweig V. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J. Exp. Med*, 1984; 160(5):1558-78.
14. Medof ME, Kinoshita T, Silber R, Nussenzweig V. Amelioration of lytic abnormalities of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(9):2980-4.
15. Wilcox LA, Ezzell JL, Bernshaw NJ, Parker CJ. Molecular basis of the enhanced susceptibility of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to hemolysis in acidified serum. *Blood* 1991; 78(3):820-9.
16. Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1999; 86 (9):3277-86.
17. Ruiz-Delgado GJ, Vásquez-Garza E, Méndez-Ramírez N, Gómez-Almaguer D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2009; 14 (1):33-7.
18. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med*, 2001; 344(14):1058- 66.
19. Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev* 2008; 22(2):65-74.

- 20.** Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993; 82(4):1192-6.
- 21.** Basu S, Banerjee D, Ghosh M, Chakrabarti A. Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome. *Hematology* 2010; 15 (4):236-9.
- 22.** Rosse WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990; 75(8):1595-601.
- 23.** Christmas SE, de la Mata Espinosa CT, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology* 2006; 119 (4):522-8.
- 24.** Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. *Nat Med* 2002; 8 (12):1383-9.
- 25.** Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM Jr, Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005; 294(1):81-90.
- 26.** Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*, 2004; 126(1):133-8.
- 27.** Megson IL, Sogo N, Mazzei FA, Butler AR, Walton JC, Webb DJ. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by hemoglobin and red cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. *Br J Pharmacol*, 2000; 131(7):1391-8.

- 28.** Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J. Pharmacol*, 1987; 92:639-646.
- 29.** Schäfer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004; 109(15):1819-22.
- 30.** Sims PJ, Rollins SA, Wiedmer T. Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *J. Biol. Chem*, 1989; 264(32):19228-35.
- 31.** Hugel B, Socié G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobogaci ML. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999; 93(10):3451-6.
- 32.** Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J. Biol. Chem*, 1988; 263(34):18205-12.
- 33.** Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J. Haematol*, 2004; 125(6):804-13.
- 34.** Ploug M, Plesner T, Rønne E, Ellis V, Høyer-Hansen G, Hansen NE, Danø K. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1992; 79(6):1447-55.
- 35.** Bain BJ, Win N. Acquired haemolytic anemias. In: Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 10th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006:260-266.

- 36.** Krauss JS. Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33(4):401-6.
- 37.** Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, Sainty D, Nowak R, Naumann R, Bux Y, Ehninger G. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol* 2001; 23(2); 81-90.
- 38.** Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87(12):5332-40.
- 39.** Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42(4):223.
- 40.** Parker C. Ask the Hematologist: How do I diagnose and treat PNH? *The Hematologist* 2008.
- 41.** Hernández-Campo PM, Martín-Ayuso M, Almeida J, López A, Orfão A. Comparative analysis of different flow cytometry-based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 and CD55 expression on major peripheral blood cell subsets. *Cytometry* 2002; 50(3):191-201.
- 42.** Hernández-Campo PM, Almeida J, Sánchez ML, Malvezzi M, Orfão A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70(2):71-81.
- 43.** Hernández-Campo PM, Almeida J, Matarraz S, de Santiago M, Sánchez ML, Orfão A. Quantitative analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72(1):34-42.
- 44.** Piedras J, López-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry*, 2000; 42:234-238.

- 45.** Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, Sainty D, Nowak R, Naumann R, Bux Y, Ehninger G. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol* 2001; 23(2); 81-90.
- 46.** Kelly R, Richard S, Hillmen P, Hill A. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and treatment with eculizumab. *Ther Clin Risk Manag* 2009; 5:911-21.
- 47.** Hill A, Rother RP, Hillmen P. Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2005; 90 (12 Suppl):ECR40.
- 48.** Hillmen P. The role of complement inhibition in PNH. *Hematology Am Soc Hematol Educ program* 2008; 116-23.
- 49.** Tefferi A, Vardiman JW.; Myelodysplastic Syndromes. *N. Engl. J. Med*, 2009; 361:1872-85.
- 50.** Brunning RD, Orazi A, Germing U, et al: Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. World Health Organization classification of tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer (IARC). Press 2008; 88-93.
- 51.** Cazzola M, Malcovati L: Myelodysplastic syndromes-coping with ineffective hematopoiesis. *N. Engl. J. Med*, 2005; 352:536-8.
- 52.** Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al: Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007; 31: 72–36.
- 53.** Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J: Familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia - a review. *Br J. Haematol*, 2008; 140:123-32.

- 54.** Wong AK, Fang B, Zhang L, Guo X, Lee s, Schreck R: Loss of the Y chromossome: an age-related or clonal phenomenon in acute myelogenous leukemia/myelodysplastic syndrome? *Arch Patol Lab Med* 2008; 132:1329-32.
- 55.** Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, et al: Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from de the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer* 2008; 113:3331-40.
- 56.** Vardiman JW, Brunning RD, Harris NL, AL E: WHO histological classification of chronic myeloproliferative diseases. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization classification of tumours: tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press. 2001:17-44.
- 57.** Haase D, Germing U, Schanz, et al: New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110:4385-95.
- 58.** Bernasconi P, Klersy C, Boni M,et al: World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol*, 2007; 137:193-205.
- 59.** Nimer SD: Myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008; 111:4841-51.
- 60.** Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J. Haematol*, 1982; 51:189-99.
- 61.** Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al: The 2008 revision of the World Health Organization classification of myeloide neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114:937-51.
- 62.** Jädersten M, Hellström-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *Journal of Internal Medicine* 2008; 265:307-328.

- 63.** Malcovati L, Nimer SD. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. *Cancer Control*. 2008; 15(4):4-13.
- 64.** Camatta, B.M.; Storb R. Thomas, E.D.: Aplastic anemia (first of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. *N Engl. J. Med.*, 306: 645, 1982.
- 65.** Marsh JC, Ball SE, Cavenagh J, Darbyshire P, Dokal I, Gordon-Smith EC, Keidan J, Laurie A, Martin A, Mercieca J, Killick SB, Stewart R, Yin JA; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *B. J. Haematol*. 2009 Oct; 147(1):43-70.
- 66.** Rozman C, Marin P, Nomdedeu B, Montserrat E. Criteria for severe aplastic anaemia. *Lancet* 1987 Oct 24; 2(8565):955-7.
- 67.** Young NS. Acquired aplastic anemia. *JAMA* 1999; 282 (3):271-8.
- 68.** Young NS. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol* 2000; 37(1):3-14.
- 69.** Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42B: 223-33. 5.
- 70.** Richards SJ, Barnett D. The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 2007; 27: 577-90.
- 71.** Van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 60: 1–13.
- 72.** Buhning HJ, Muller T, Herbst R, Cole S, Rappold I, Schuller W, et al. The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages. *Leukemia* 1996; 10: 106–116.209.

- 73.** Lammers R, Giesert C, Grunebach F, Marxer A, Vogel W, Buhring HJ. Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. *Exp Hematol* 2002; 30: 537–545.
- 74.** Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 2007; 72B: 167-77.
- 75.** Britta Höchsmann & Markus Rojewski & Hubert Schrezenmeier. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes *Ann Hematol* (2011) 90:887 899.
- 76.** Hernández-Campos PM et al. Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 2008; 48:1403-1414.
- 77.** Thomason RW, Papiez J, Lee RV, Szczarkowski W. Identification of unsuspected PNH-type cells in flow cytometric immunophenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow. *Am. J. Clin. Pathol* 2004; 122:128-34.
- 78.** Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, clones in patients with myelodysplastic syndromes, *British Journal of Haematology*, 1998, 102, 465-474.
- 79.** Helena Aguilar et al. Molecular Characterization of a Novel Immune Receptor Restricted to the Monocytic Lineage. *Journal of Immunol*, 2004, 173 6703–6711.
- 80.** Paola Mina-Osorio, et al. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. April 2006, Volume 79.