

A importância da citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento da hemoglobinúria paroxística noturna

The importance of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Lethicia R. Ehlert; Camila L. Silva; Allyne Cristina Grando

Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Introdução: A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma enfermidade clonal adquirida de células-tronco hematopoiéticas; caracteriza-se clinicamente por hemólise intravascular crônica, falência medular e hipercoagulabilidade, levando a trombozes. É uma rara desordem das células-tronco hematopoiéticas que ocorre devido a uma mutação somática no gene fosfatidilinositol glicano classe A (PIG-A). **Objetivo:** Este trabalho teve como objetivo revisar a importância do rastreamento e monitoramento de indivíduos com alto risco de desenvolvimento da HPN, pois o diagnóstico precoce da doença é essencial para um melhor prognóstico e a escolha do tratamento para o paciente. **Metodologia:** Foi realizada uma revisão com mais enfoque na fisiopatologia e no diagnóstico da HPN. O foco principal da pesquisa foi o uso da técnica da citometria de fluxo para a detecção da doença. **Resultados:** Esse gene codifica uma enzima essencial na formação de glicosilfosfatidil inositol (GPI), a qual atua como molécula âncora de diversas proteínas de membrana nas células hematopoiéticas. A alteração da síntese de GPI gera uma perda parcial ou completa de proteínas que necessitam dessa molécula-âncora para se ligarem à superfície celular. Entre estas proteínas estão o CD55 e o CD59 presente em eritrócitos, que controlam a ativação da cascata do complemento. **Conclusão:** O exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo é considerado o teste de referência para diagnóstico de HPN, pois a técnica é altamente sensível e específica, apresentando vantagens como a identificação quantitativa de pequenas populações de células com fenótipo HPN e a capacidade de distinguir células com deficiência parcial ou total de proteínas ancoradas pela GPI.

Unitermos: hemoglobinúria paroxística; citometria de fluxo; imunofenotipagem.

ABSTRACT

Introduction: The paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal disease of the hematopoietic stem cells, and it is clinically characterized by chronic intravascular hemolysis, bone marrow failure and hypercoagulability leading to thrombosis. It is a rare disorder of the hematopoietic stem cells that occurs due to a somatic mutation in the gene phosphatidylinositol glycan class A (PIG-A). **Objective:** Here we reviewed the importance of screening and monitoring of individuals with high risk of developing PNH, since the early diagnosis of the disease is essential for better prognostic and treatment choice for the patient. **Method:** A review was carried out with great focus on the pathophysiology and diagnosis of PNH, mainly with the use of flow cytometry technique to detect the disease. **Results:** This gene codifies an enzyme essential to the formation of glycosylphosphatidylinositol (GPI), which acts as a molecular anchor for many membrane proteins. The alteration of GPI synthesis promotes a partial or complete loss of proteins that needs this molecular anchor to bind to the cell surface. Among these proteins are the CD55 and the CD59, which control the activation of the complement cascade. **Conclusion:** The immunophenotyping exam with flow cytometry is considered the reference test for PNH diagnosis, since the technique is highly sensitive and specific, presenting advantages as the quantitative identification of small populations of cells with PNH phenotype and the capacity to distinguish cells with partial or total deficiency of GPI-anchored proteins.

Key words: hemoglobinuria paroxysmal; flow cytometry; immunophenotyping.

RESUMEN

Introducción: La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal adquirida de células madre hematopoyéticas; se caracteriza clínicamente por hemólisis intravascular crónica, insuficiencia medular e hipercoagulabilidad, que conduce a trombosis. Es un trastorno raro de las células madre hematopoyéticas que ocurre debido a una mutación somática en el gen fosfatidilinositol-glicano de clase A (PIG-A). **Objetivo:** Este estudio tuvo como objetivo revisar la importancia del cribado y seguimiento de individuos con alto riesgo de desarrollar HPN, pues el diagnóstico precoz de la enfermedad es vital para un mejor pronóstico y la elección del tratamiento del paciente. **Métodos:** Se realizó una revisión con mayor enfoque en la fisiopatología y diagnóstico de la HPN. El foco principal de la investigación fue el uso de la técnica de citometría de flujo para detectar la enfermedad. **Resultados:** Ese gen codifica una enzima esencial en la formación de glicosilfosfatidil inositol (GPI), que actúa como molécula de anclaje para varias proteínas de membrana en las células hematopoyéticas. Cambiar la síntesis de GPI genera una pérdida parcial o total de proteínas que necesitan esta molécula de anclaje para unirse a la superficie celular. Entre esas proteínas se encuentran CD55 y CD59 presentes en los eritrocitos, que controlan la activación de la cascada del complemento. **Conclusión:** La técnica de inmunofenotipificación por citometría de flujo se considera la prueba de referencia para el diagnóstico de HPN, ya que es altamente sensible y específica, presenta ventajas como la identificación cuantitativa de pequeñas poblaciones de células con el fenotipo de HPN y la capacidad de distinguir células con deficiencia parcial o total de proteínas ancladas por GPI.

Palabras clave: hemoglobinuria paroxística; citometría de flujo; inmunofenotipificación.

INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é um distúrbio clonal adquirido de células-tronco hematopoiéticas, clinicamente caracterizado por hemólise intravascular crônica, falência medular e hipercoagulabilidade, causando trombozes – principal causa de morte na doença, mesmo quando tratada^(1, 2). Fadiga, dor abdominal, doença renal crônica, disfagia e disfunção erétil são sintomas característicos da doença e podem ser atribuídos à hemólise intravascular intensa e à liberação de hemoglobina livre. A hemoglobinúria, apesar de estar presente em poucos pacientes, também pode ser considerada um sintoma característico da HPN^(3, 4). A doença frequentemente se apresenta com infecções recorrentes, neutropenia e trombocitopenia, e pode surgir associada a outras doenças hematológicas, como anemia aplásica (AA) e síndromes mielodisplásicas (SMD)^(1, 2).

A HPN é uma doença considerada rara, com incidência estimada de 1,3 novos casos por um milhão de indivíduos a cada ano e sobrevida média de 10 a 15 anos após o diagnóstico. Também é considerada subdiagnosticada quando associada a outras entidades, como na falência medular⁽⁴⁾. É mais comum em adultos jovens, mas há relatos de casos na infância e na idade avançada. Em ocidentais, as manifestações de infecção e trombose são mais comuns, enquanto nos asiáticos prevalece a insuficiência da medula óssea^(4, 5).

A primeira descrição de HPN como uma síndrome clínica foi feita em 1882 pelo Dr. Paul Strübing, que sugeriu que a

hemoglobinúria era o resultado da sensibilidade anormal dos eritrócitos à acidose sistêmica, decorrente do acúmulo de dióxido de carbono durante o sono. Em 1937, Thomas Ham observou que os eritrócitos HPN eram hemolisados quando incubados com soro normal acidificado. Essa descoberta resultou no primeiro teste diagnóstico para HPN, conhecido como teste de Ham. Então, com a descoberta da via alternativa do complemento, o aumento da sensibilidade dos eritrócitos HPN foi atribuído à lise mediada pelo complemento^(6, 7).

Atualmente, a citometria de fluxo (CF) é o método mais preciso e informativo para o diagnóstico e monitoramento da HPN, pois sua alta especificidade e sensibilidade permitem a identificação quantitativa de pequenas populações de clones de células HPN^(4, 8). O diagnóstico precoce e o monitoramento contínuo de indivíduos com alto risco para HPN são essenciais para um melhor prognóstico e escolha do tratamento, e podem ter um impacto positivo na evolução dos pacientes em longo prazo^(4, 9). Com base no contexto oferecido, este trabalho teve como objetivo apresentar uma revisão sobre os conceitos atuais no diagnóstico e monitoramento de HPN por CF.

FISIOPATOLOGIA DA HPN

A HPN caracteriza-se pela expansão clonal não maligna de uma ou várias células-tronco hematopoiéticas que adquiriram uma mutação somática no gene fosfatidilinositol glicano classe A (PIG-A), localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1) de

uma célula pluripotente⁽¹⁰⁾. Essas mutações causam um bloqueio precoce da síntese de âncoras de glicosil-fosfatidil inositol (GPI). O GPI é um glicolípido responsável por manter mais de 150 diferentes proteínas aderidas à membrana plasmática das células sanguíneas com funções específicas^(1, 2, 11, 12).

A redução na síntese de uma molécula madura de GPI gera ausência de todas as proteínas de superfície normalmente ancoradas por ela. Desse modo, as células sanguíneas do clone HPN apresentam algum grau de deficiência dessas proteínas, e esse grau pode ser classificado como: células HPN tipo I (normal), tipo II (deficiência parcial de GPI) e tipo III (deficiência total de GPI)⁽¹³⁾. A análise das proteínas ancoradas no GPI na superfície das células hematopoiéticas HPN revela que aproximadamente 40% dos indivíduos doentes apresentam uma combinação dos tipos I, II e III⁽¹⁴⁾.

Entre as proteínas ancoradas no GPI estão o fator acelerador da degradação do complemento (DAF) e o inibidor da lise de membrana (MIRL), também conhecidos como CD55 e CD59, respectivamente. Essas proteínas ativam a cascata complemento, logo, a hemólise da HPN é resultado do aumento da suscetibilidade desses eritrócitos clonais ao complemento, pela redução ou ausência completa de proteínas regulatórias na superfície celular^(4, 13, 15).

O sistema complemento é composto por mais de 20 proteínas séricas que interagem de forma precisa levando à geração de produtos com propriedades imunorregulatórias, imunoprotetoras, pró-inflamatórias e citolíticas. Existem três vias pelas quais o complemento é ativado: a clássica, a lecitina e a via alternativa. Todas elas resultam na geração de complexos C3-convertase, que mediam a quebra do C3 em C3a e C3b^(13, 16).

O CD59 interage diretamente com o complexo de ataque à membrana (MAC) para evitar a formação dos poros lítico que bloqueiam a agregação do C9⁽¹⁷⁾, enquanto o CD55 acelera a taxa de destruição da C3-convertase⁽¹⁸⁾. Desse modo, o CD55 reduz a quantidade de C3 que é clivada, e o CD59 reduz o número do MAC que é formado. A via alternativa para ativar o complemento é o centro desses mecanismos. Nessa via, a proteína C3 hidrolisa espontaneamente e leva à formação da C3-convertase (processo também conhecido como *tick-over*). A hemólise na HPN é crônica devido a um contínuo estado de ativação do complemento através do *tick-over*. O mecanismo de hemólise intravascular inicia-se com o aumento da atividade de C3-convertase na superfície de eritrócitos HPN, como consequência da falta de CD55. Isso acarreta a ativação de C3, C5 e da via terminal do complemento, culminando na formação do MAC. Em condições normais, a formação do MAC está sob a regulamentação do CD59. A ausência de CD59 em eritrócitos HPN leva à formação descontrolada do MAC, resultando

em hemólise intravascular mediada pelo complemento^(11, 19). Das duas proteínas, a CD59 é a mais importante na proteção contra lise celular mediada por complemento⁽²⁰⁾ (**Figura 1**).

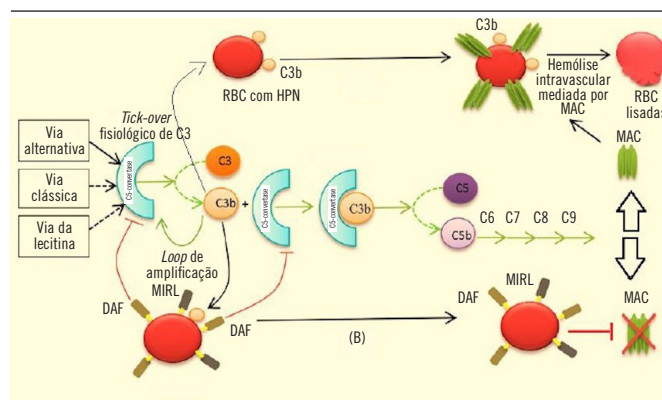


FIGURA 1 — Ação do complemento em pacientes com HPN (A) e em indivíduos saudáveis (B). Devido à presença das proteínas de membrana MIRL e DAF, os eritrócitos normais são protegidos contra a ativação do sistema complemento (B). A deficiência de MIRL e DAF faz com que os eritrócitos fiquem sensíveis ao ataque do complemento, resultando em hemólise (A)

Adaptado de Devalet et al. (2015)⁽²¹⁾.

HPN: hemoglobinúria paroxística noturna; RBC: glóbulos vermelhos; MAC: complexo de ataque à membrana; MIRL: inibidor da lise de membrana; DAF: degradação do complemento.

O óxido nítrico é o principal regulador da fisiologia vascular, e a maioria das manifestações clínicas da HPN são facilmente explicadas por sua depleção tecidual. A hemoglobina livre no plasma tem grande afinidade pelo óxido nítrico e o remove da circulação, o que pode levar à distonia do músculo liso, ativação e agregação plaquetária⁽³⁾.

A depleção tecidual de óxido nítrico manifesta-se clinicamente como astenia, dor abdominal, espasmo esofágico, disfagia, impotência sexual masculina e possivelmente trombose. Todas essas manifestações clínicas são mais comuns em pacientes com grandes populações de clone HPN⁽²⁾. A propensão a eventos trombóticos pode ser fatal, uma vez que as tromboses ocorrem predominantemente em locais incomuns, como veias supra-hepáticas (síndrome de Budd-Chiari), veias porta, esplênica e mesentérica, ou em veias do sistema nervoso central. A fisiopatologia da trombose na HPN não é bem compreendida; contudo, estudos recentes sugerem que pode haver uma relação entre trombose, redução do óxido nítrico e hiper-reatividade plaquetária induzida pela hemólise⁽²²⁾.

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA HPN

A capacidade de detecção de clones GPI-deficientes usando técnicas mais sensíveis, como a CF, aumentou a incidência de pacientes com diagnóstico de HPN^(4, 23). Observa-se, no entanto, que

a heterogeneidade da doença torna imprescindível a correlação clínica e, para um bom manejo terapêutico, tanto o grau de falência medular quanto a intensidade da hemólise devem ser levados em consideração^(2, 24).

Em 2005, o Grupo Internacional de Interesse em HPN (IPIG), com base nas características clínicas, nas características da medula óssea e no tamanho do clone mutante, reconheceu três subcategorias da doença, enfatizando a presença de hemólise e/ou trombose e anormalidade medular subjacente (**Tabela 1**)⁽²⁾.

TABELA 1 – Classificação da HPN*

Categoria	Medula óssea	Hemólise intravascular	Clone HPN
HPN clássica	Hipocelular com áreas de hiperplasia eritróide e morfologia normal ou quase normal	Forte (LDH elevado, muitas vezes com episódios de hemoglobinúria macroscópica)	Grande (50%-100%) da população de granulócitos GPI deficientes
HPN associada a síndromes de falência medular	Evidência concomitante de uma síndrome de falência medular	Leve (muitas vezes com mínimas alterações de marcadores bioquímicos de hemólise)	Médio (25%-50%) da população de granulócitos GPI deficientes
HPN subclínica	Evidência concomitante de uma síndrome de falência medular	Nenhuma evidência clínica ou bioquímica de hemólise intravascular	Pequeno (< 25%) da população de granulócitos GPI deficientes

Adaptado de Parker (2012)⁽¹⁵⁾.

HPN: hemoglobinúria paroxística noturna; GPI: glicosil-fosfatidil inositol; LDH: lactato desidrogenase; *baseado nas recomendações do Grupo Internacional de Interesse em HPN (IPIG)⁽²⁾.

DIAGNÓSTICO DA HPN

O diagnóstico laboratorial da HPN foi inicialmente baseado em testes que mostraram aumento da sensibilidade das hemácias à lise mediada pelo complemento em meio ácido ou rico em sacarose (testes de Ham e sacarose). No entanto, apesar da boa especificidade desses testes, ambos têm baixa sensibilidade e podem apresentar resultados falso negativos em pacientes com pequenos clones HPN que sofreram hemólise recentemente ou que receberam transfusão de sangue. Hoje, a importância desses testes é apenas histórica: eles não são mais recomendados na triagem de HPN^(2, 4, 25).

Atualmente, o diagnóstico específico e a classificação da HPN são feitos pela detecção de antígenos ancorados por GPI em células hematopoiéticas, utilizando anticorpos monoclonais avaliados

por CF em células do sangue periférico. A CF serve também como ferramenta para medir o tamanho do clone HPN. Além disso, os fenótipos específicos da HPN são melhores estabelecidos com análises detalhadas da população de eritrócitos, contagem inicial completa do sangue, biomarcadores de hemólise [lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina, haptoglobina] e reservas de ferro⁽²⁶⁾.

CF

A CF é uma metodologia capaz de medir simultaneamente múltiplos parâmetros de partículas ou células individuais em suspensão, por meio de um sistema de fluxo contínuo. O citômetro de fluxo é o equipamento necessário para o método, consistindo em um sistema óptico formado por um conjunto de *lasers* que emitem luz sobre as partículas analisadas. A dispersão da luz emitida em diversos ângulos por essas partículas pode distinguir diferenças de tamanho e complexidade interna, que são captadas por detectores *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC). Além disso, a presença de detectores de fluorescência no citômetro possibilita a realização da técnica de imunofenotipagem por CF, permitindo a identificação de uma variedade de antígenos celulares, por meio da emissão de luz por fluorocromos acoplados a anticorpos monoclonais específicos⁽²⁷⁾.

O exame de imunofenotipagem por CF é considerado o teste de referência para detecção de HPN, uma vez que a técnica é altamente sensível e específica, apresentando vantagens como a possibilidade de analisar eritrócitos, leucócitos e plaquetas; a identificação quantitativa de pequenas populações de células com fenótipo HPN e a capacidade de distinguir células com deficiência parcial ou total de proteínas ancoradas por GPI^(2, 4, 8).

Os marcadores CD55 e CD59 foram utilizados classicamente em eritrócitos para detectar clones HPN, pois, além de estarem associados às manifestações predominantes de hemólise, estão distribuídos uniformemente em todas as linhagens hematopoiéticas. Os anticorpos monoclonais anti-CD59 e anti-CD55 ligam-se especificamente a proteínas ancoradas pela GPI e sua ausência pode ser usada para detectar pequenas populações de células HPN^(4, 21, 22). Contudo, o CD55 geralmente apresenta baixa intensidade de expressão na membrana dos eritrócitos, não representando um bom marcador para HPN. Apenas a análise do antígeno CD59 sobre as hemácias (células positivas para glicoforina A, também conhecida como CD235a) é usada para identificar o tamanho do clone HPN nos eritrócitos⁽²⁸⁾.

Atualmente, a avaliação apenas dos eritrócitos em ensaios de rotina não é considerada adequada, já que apresenta pouca sensibilidade devido à meia-vida curta (20-45 dias) dos eritrócitos

HPN circulantes, não sendo apropriada para detectar pequenos clones HPN (< 1%) em AA e SMD. Além disso, o quadro hemolítico e as transfusões de sangue podem subestimar o tamanho do clone^(28, 29). Em contraste, a análise por CF do clone HPN em granulócitos fornece uma estimativa mais precisa do tamanho do clone, que é a análise aceita como padrão-ouro para o diagnóstico de HPN. A análise de monócitos é geralmente realizada para confirmar os resultados encontrados em granulócitos⁽²⁶⁾.

O *fluorescent laeled aerolysin* (FLAER) é um reagente de aerolisina fluorescente recentemente desenvolvido, que tem sido cada vez mais utilizado no diagnóstico da HPN por CF^(21, 30). A aerolisina, que é o principal fator de virulência da bactéria *Aeromonas hydrophila*, é secretada como proaerolisina e se liga de maneira seletiva e com alta afinidade à porção glicana da âncora GPI^(25, 31). Uma das vantagens de usar o FLAER é que o ensaio não é afetado pela diferença na expressão das proteínas ancoradas pela GPI em células que se encontram em estágios de maturação anteriores^(4, 20). Quando o FLAER é combinado com anticorpos contra antígenos ancorados pela GPI em granulócitos (CD16/CD24) ou em monócitos (CD14), é possível detectar a presença de clones HPN mínimos, como 0,01%. O avanço tecnológico da CF multiparamétrica também permite a utilização da imunofenotipagem com marcadores de proteínas não ancoradas pela GPI (por exemplo, CD33 e CD15), para permitir a caracterização da linhagem celular quando combinada com o reagente FLAER^(29, 32).

O critério estabelecido para diagnóstico e monitoramento da HPN é a evidência de população clonal de células GPI-deficientes (clone HPN) em pelo menos dois marcadores diferentes (duas proteínas associada ao GPI ou uma proteína associada ao GPI e ao FLAER) em pelo menos duas linhagens hematopoiéticas distintas, uma vez que existem raras deficiências congênitas de CD55 ou CD59 que podem ser responsáveis por resultados falso positivos^(4, 8, 29) (**Figura 2**).

Em um estudo realizado por Brodsky *et al.* (2000)⁽³³⁾, foi observada maior acurácia do FLAER na detecção de pequenos clones HPN, em comparação com os ensaios de CF que utilizam somente anticorpos monoclonais. Alguns estudos sobre a população dos granulócitos observaram que o uso de combinações de FLAER/CD24 oferecem estimativa mais precisa do tamanho do clone HPN^(2, 4, 25, 32). Em 2014, Sutherland *et al.* (2014)⁽³⁴⁾ avaliaram a eficiência de um ensaio de cinco cores em um único tubo usando a combinação de FLAER, CD157, CD64, CD15 e CD45 para detectar simultaneamente clones HPN em granulócitos e monócitos. Nos resultados obtidos no estudo, o CD157 apresentou níveis elevados de sensibilidade, demonstrando ter um ótimo custo-benefício quando comparado com os ensaios que realizam a análise de granulócitos e monócitos em tubos separados⁽³⁴⁾.

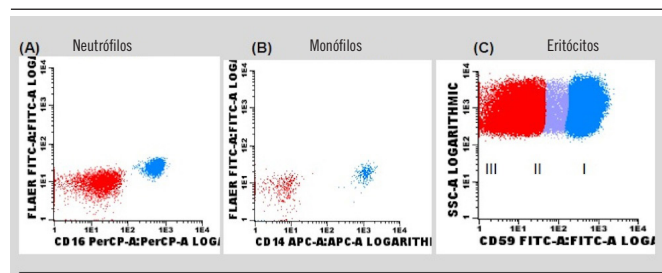


FIGURA 2 – Análise imunofenotípica de clones de HPN em sangue periférico A) os neutrófilos foram selecionados pela positividade ao CD45, CD10 e CD64, e os clones foram identificados pela deficiência de FLAER e CD16. No primeiro gráfico, temos em vermelho um clone HPN de 56% nos neutrófilos; B) os monócitos foram selecionados pela positividade ao CD45 e CD64. Os clones foram identificados pela ausência de FLAER e CD14. No segundo gráfico, temos em vermelho um clone HPN de 58% em monócitos; C) os eritrócitos foram selecionados pela positividade ao CD235a (glicoforina A) e ausência de CD61, CD45 e CD64. Os clones HPN foram identificados pela deficiência de CD59. O último gráfico apresenta três tipos de células que podemos encontrar em amostras positivas para HPN: células com ausência completa de expressão do CD59 (tipo III) em vermelho, células com fraca expressão do CD59 (tipo II) em lilás e células saudáveis, com forte expressão do CD59 (tipo I) em azul

Imagem de própria autoria.

HPN: hemoglobinúria paroxística noturna; FLAER: fluorescent laeled aerolysin; FITC: fluorescein isothiocyanate; PerCP: peridinin chlorophyll protein complex; APC: allophycocyanin.

Em 2003, Yang *et al.* (2013)⁽³⁵⁾ investigaram o desempenho de vários marcadores imunofenotípicos, incluindo os anticorpos monoclonais CD235a, CD33, CD15 combinados com CD59, CD16, CD24, CD14 e FLAER em um painel HPN usando CF de seis cores. Os resultados obtidos corroboram a premissa de que a CF de seis cores com um painel HPN utilizando a combinação de CD59, CD235a, CD33, CD15, FLAER, CD16, CD24 e CD14 pode aumentar e melhorar a sensibilidade dos métodos atuais usados no diagnóstico e tratamento da HPN, identificando especificamente clones HPN na população de eritrócitos, granulócitos e monócitos⁽³⁵⁾.

INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA RASTREAMENTO DE HPN

O diagnóstico precoce é conhecido por ser essencial para um melhor prognóstico e escolha do tratamento para o paciente com HPN^(4, 9). Portanto, a Sociedade Internacional de Citometria de Fluxo (ICCS) e o Grupo Internacional de Interesse em HPN (IPIG) recomendam a avaliação e o monitoramento contínuo das populações de pacientes em alto risco para HPN (**Tabela 2**)^(2, 4).

Movalia *et al.*, em 2011, realizaram uma análise da incidência de clones HPN em 6.897 pacientes com recomendações para testes de acordo com as orientações da ICCS e do IPIG⁽³⁶⁾. A CF detectou a presença de clone HPN em um de 16 pacientes (421/6.897), com a proporção de clones HPN excedendo 1%, sendo um em 27 pacientes (255/6.897).

TABELA 2 – Indicações clínicas para testes de HPN

Populações de alto risco de HPN*	Incidência de clone HPN ⁺
Anemia hemolítica Coombs negativa	22,7%
Hemoglobinúria	18,9%
Anemia aplásica	26,3%
Síndrome mielodisplásica do tipo anemia refratária	5,5%
Citopenias inexplicadas	5,7%
Trombose inexplicada (venosa ou arterial)	1,4%

HPN: hemoglobinúria paroxística noturna; *baseado nas orientações da Sociedade Internacional de Citometria de Clínica (ICCS) e do Grupo Internacional de Interesse em HPN (IPIG)^{2, 4}; + dados obtidos do estudo realizado por Movalia et al. (2011)³⁶.

Pacientes com anemia hemolítica Coombs negativa ou com deficiência férrica concomitante têm maior probabilidade de apresentar clones HPN⁽⁴⁾. Aproximadamente um em cada quatro pacientes com anemia hemolítica apresentam esses clones⁽³⁶⁾. Embora hemoglobinúria não esteja presente em todos os pacientes com HPN, é um sinal de hemólise intravascular⁽²⁾, e a triagem para HPN deve ser feita em qualquer paciente com hemoglobinúria⁽⁴⁾. Aproximadamente um em cada cinco pacientes com hemoglobinúria têm clones HPN⁽³⁶⁾. Ao mesmo tempo, segundo Parker *et al.* (2005)⁽²⁾, apenas 26% dos portadores de HPN relatam hemoglobinúria na apresentação.

A relação entre HPN e AA foi inicialmente exposta por Dacie (1961)⁽³⁷⁾ e Lewis (1967)⁽³⁸⁾, e hoje a maioria dos indivíduos com HPN são conhecidos por apresentar alguma evidência de falência medular. Estudos de história natural confirmam essa associação, mostrando que a prevalência na detecção de clone HPN em pacientes com antecedente de AA pode variar entre 23%⁽²⁴⁾ e 38%⁽³⁹⁾. A maioria dos pacientes com essa associação expressa apenas um pequeno clone HPN (< 10%)⁽²⁴⁾, entretanto, o ambiente medular pode promover a expansão desse clone⁽⁴⁰⁾. Em um estudo com 27 pacientes com AA, 48% apresentaram um aumento do tamanho do clone HPN. No entanto, o significado clínico de um clone pequeno de células HPN em portadores de AA permanece incerto. Esses clones podem permanecer estáveis ou aumentar e até diminuir de tamanho, ou mesmo desaparecer⁽⁴¹⁾.

As SMD também são complicações clássicas da HPN. Atualmente, com o uso de citômetros capazes de detectar clones GPI-deficientes de até 0,003%, a presença de pequenos clones de HPN foi observada em até 20% dos pacientes com SMD de baixo risco^(13, 42). Na análise de Movalia *et al.* (2011)⁽³⁶⁾ mais de um em 18 pacientes com SMD apresentavam clones de HPN.

Pacientes com citopenias e trombozes inexplicadas também são considerados de alto risco para HPN. Indivíduos com HPN são mais propensos a terem uma complicação trombótica em locais incomuns, incluindo apresentações como a síndrome de Budd-Chiari ou trombose cerebral. Assim, apresentações incomuns de trombose devem justificar o rastreamento para HPN⁽⁴⁾.

CONCLUSÃO

Embora seja uma desordem hematológica rara, a HPN é uma doença de natureza progressiva e potencialmente fatal, sendo essencial o rastreamento e monitoramento de indivíduos com alto risco de desenvolvimento dessa patologia. O diagnóstico preciso da HPN é imperativo e tem implicações clínicas significativas para o tratamento e a prevenção de eventos adversos. A imunofenotipagem por CF é o teste mais sensível e informativo disponível para o diagnóstico da HPN, sendo adequado para a pesquisa de pequenos clones subclínicos que, muitas vezes, estão presentes em pacientes com AA e SMD. A presença desses clones subclínicos em pacientes com AA e SMD pode mostrar implicações prognósticas e terapêuticas.

Contudo, há uma série de considerações importantes em termos de estratégias de análise e seleção de anticorpos que devem ser observadas. Além disso, a interpretação dos resultados necessita de um conhecimento detalhado da distribuição celular de antígenos ligados à GPI e a sua expressão nas diferentes fases de diferenciação das células hematopoiéticas. Laudos claros são essenciais para a tomada de decisões clínicas apropriadas e achados laboratoriais positivos devem ser vistos no contexto da apresentação clínica da doença, sendo o papel do médico classificar e definir o tratamento mais apropriado a cada paciente.

REFERÊNCIAS

- 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. PubMed PMID: 7566002.
- Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005; 106(12): 3699-709. PubMed PMID: 16051736.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005; 293(13): 1653-62. PubMed PMID: 15811985.

4. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78(4): 211-30. PubMed PMID: 20533382.
5. Socié G, Mary JY, de Gramont A, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet.* 1996; 348(9027): 573-7. PubMed PMID: 8774569.
6. Parker CJ. Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: defining the disease. *Br J Haematol.* 2002; 117(1): 3-22. PubMed PMID: 11918528.
7. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008: 93-103. PubMed PMID: 19074065.
8. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry.* 2000; 42(4): 223-33. PubMed PMID: 10934341.
9. 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(3): 577-90, vii. PubMed PMID: 17658408.
10. Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine (Baltimore).* 1997; 76(2): 63-93. PubMed PMID: 9100736.
11. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2014; 124(18): 2804-11. PubMed PMID: 25237200.
12. Parker CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol.* 2007; 35(4): 523-33. PubMed PMID: 17379062.
13. Arruda MM, Rodrigues CA, Yamamoto M, Figueiredo MS. [Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: from physiopathology to treatment]. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56(2): 214-21. PubMed PMID: 20498998.
14. 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. PubMed PMID: 17408457.
15. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol.* 2012; 19(3): 141-8. PubMed PMID: 22395662.
16. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001; 344(14): 1058-66. PubMed PMID: 11287977.
17. Rollins SA, Sims PJ. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol.* 1990; 144(9): 3478-83. PubMed PMID: 1691760.
18. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7: 35-58. PubMed PMID: 2469439.
19. Risitano AM, Notaro R, Marando L, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood.* 2009; 113(17): 4094-100. PubMed PMID: 19179465.
20. Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev.* 2008; 22(2): 65-74. PubMed PMID: 18063459.
21. Devalet B, Mullier F, Chatelain B, Dogné JM, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol.* 2015; 95(3): 190-8. PubMed PMID: 25753400.
22. Helley D, de Latour RP, Porcher R, et al. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica.* 2010; 95(4): 574-81. PubMed PMID: 20081060.
23. Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007; 72(5): 291-8. PubMed PMID: 17549742.
24. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood.* 2008; 112(8): 3099-106. PubMed PMID: 18535202.
25. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2009; 113(26): 6522-7. PubMed PMID: 19372253.
26. Sahin F, Ozkan MC, Mete NG, et al. Multidisciplinary clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Blood Res.* 2015; 5(1): 1-9. PubMed PMID: 26171279.
27. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.* 2000; 46(8 Pt 2): 1221-9. PubMed PMID: 10926916.
28. Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008: 104-10. PubMed PMID: 19074066.
29. Preis M, Lowrey CH. Laboratory tests for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol.* 2014; 89(3): 339-41. PubMed PMID: 24127129.
30. Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur J Haematol.* 2009; 83(6): 503-11. PubMed PMID: 19686268.
31. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol.* 2004; 126(1): 133-8. PubMed PMID: 15198744.

32. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high- sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012; 82(4): 195-208. PubMed PMID: 22499484.
33. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol.* 2000; 114(3): 459- 66. PubMed PMID: 10989647.
34. Sutherland DR, Acton E, Keeney M, Davis BH, Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014; 86(1): 44-55. PubMed PMID: 23893962.
35. Yang HS, Yang M, Li X, Tugulea S, Dong H. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in peripheral blood and bone marrow with six-color flow cytometry. *Biomark Med.* 2013; 7(1): 99-111. PubMed PMID: 23387491.
36. Movalia M, Weitz I, Lim S, Illingworth A. Incidence of PNH clones by diagnostic code utilizing high sensitivity flow cytometry. *Blood* [Internet]. 2011 Nov; 118(21): 1033. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/118/21/1033/78873/Incidence-of-PNH-Clones-by-Diagnostic-Code>
37. Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: variation in clinical severity and association with bone-marrow hypoplasia. *Br J Haematol.* 1961; 7: 442-57. PubMed PMID: 13883049.
38. Lewis SM, Dacie JV. The aplastic anaemia--paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br J Haematol.* 1967; 13(2): 236-51. PubMed PMID: 6019033.
39. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore).* 2004; 83(3): 193-207. PubMed PMID: 15118546.
40. Tiu R, Gondek L, O'Keefe C, Maciejewski JP. Clonality of the stem cell compartment during evolution of myelodysplastic syndromes and other bone marrow failure syndromes. *Leukemia.* 2007; 21(8): 1648-57. PubMed PMID: 17554386.
41. Pu JJ, Mukhina G, Wang H, Savage WJ, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur J Haematol.* 2011; 87(1): 37-45. PubMed PMID: 21447004.
42. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL, et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica.* 2009; 94(1): 29-37. PubMed PMID: 19001281.

AUTOR CORRESPONDENTE

Allyne Cristina Grando  0000-0001-9384-0313
e-mail: allynegrando@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.