

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

CARLOS EDUARDO RÊGO DE SOUZA

DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA,
POR CITOMETRIA DE FLUXO, EM PACIENTES ATENDIDOS NA
FUNDAÇÃO HEMOPA.

BELÉM
2009

CARLOS EDUARDO RÊGO DE SOUZA

DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA,
POR CITOMETRIA DE FLUXO, EM PACIENTES ATENDIDOS NA
FUNDAÇÃO HEMOPA.

Pré Projeto de Trabalho de Conclusão
de Curso apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Biomédico.

Orientador: Prof.Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior

BELÉM – PARÁ
2009

CARLOS EDUARDO RÊGO DE SOUZA

DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA,
POR CITOMETRIA DE FLUXO, EM PACIENTES ATENDIDOS NA
FUNDAÇÃO HEMOPA.

Pré Projeto de Trabalho de Conclusão
de Curso apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Biomédico.

Local e data da defesa: Belém (PA), 15 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof.Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior
(ICB - UFPA)
(orientador)

Prof. Dr. Eduardo Melo dos Santos
(ICB - UFPA)

Prof. Dr. Jose Alexandre Rodrigues de Lemos
(ICB - UFPA)

Prof^a. Dr^a. Rita Mousinho – Suplente
(ICB - UFPA)

SUMÁRIO

I.	RESUMO.....	IV
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
	▪ MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	1
	▪ GENE PIG-A E A MOLÉCULA GPI.....	2
	▪ FENÓTIPO CÉLULAR HPN.....	2
	▪ HPN NA ANEMIA APLÁSICA E NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS.....	3
	▪ CLASSIFICAÇÃO.....	4
	▪ DIAGNÓSTICO.....	5
	▪ TRATAMENTO.....	6
	▪ HPN E INSUFICIÊNCIA RENAL.....	7
	▪ HPN ASSOCIADA À GRAVIDEZ.....	8
III.	OBJETIVOS.....	9
IV.	METODOLOGIA.....	10
	▪ CASUÍSTICA.....	10
	▪ AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	10
	▪ DIAGNÓSTICO POR IMUNOFENOTIPAGEM.....	10
	▪ PROCEDIMENTOS.....	11
	▪ ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
V.	RESULTADOS.....	13
VI.	DISCUSSÃO.....	15
VII.	CONCLUSÃO.....	20
VIII.	REFERÊNCIAS.....	21

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

A meus pais por todas as oportunidades, por todo apoio e paciência em todas as horas, me dando força para que chegasse até este momento.

A minha família, minhas avós, meu avô, meus irmãos e tios que sempre torceram por mim.

Aos amigos que me apoiaram, vivenciaram grande parte desta caminhada e sempre torceram pelo meu sucesso,

Ao meu orientador, por ter aceitado realizar este trabalho de me orientar.

E a todos os que fizeram parte de algum momento importante da minha vida, pois são estes momentos que nos fazem crescer como pessoa e desejar alcançar algo melhor para as nossas vidas.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela I. HPN segundo a faixa etária.....	13
Tabela II. Casos inconclusivos.....	14
Figura 1. Representação gráfica de exemplificação da expressão de CD55 e CD59 em amostras controle (A e D) e de pacientes portadores de HPN (B, C, E e F) por Citometro de Fluxo.....	17

RESUMO

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma desordem hematológica de fisiopatogenia complexa e caracterizada geneticamente por uma mutação somática no gene PIG-A (Fosfatidil Inositol Glicano A) onde os antígenos mais conhecidos são o DAF (Fator Acelerador da Degradação das Convertases do Complemento ou CD55) e o MIRL (Inibidor da Lise de Membrana ou CD59). Este trabalho tem o objetivo implantar e ampliar o atendimento diagnóstico de pacientes portadores de aplasia medular para o diagnóstico preciso e diferencial de Hemoglobinúria Paroxística Noturna através das técnicas de Citometria de Fluxo. Foram selecionados 30 pacientes com suspeita de HPN, com idades entre 2 anos e 79 anos, e encaminhados para realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo, para os antígenos CD55 e CD59, e exames complementares DHL, TGO, TGP, Coombs direto e indireto, bilirrubinas totais e frações e hemograma completo. De um total de 30 pacientes analisados, 9 casos tiveram diagnóstico positivo para HPN, 18 apresentaram resultado negativo, enquanto que em 3 casos não foi possível chegar-se a um diagnóstico conclusivo, onde os pacientes apresentavam células parcialmente negativas para a marcação por CD59 em neutrófilos, porém, marcações normais para CD55 e CD59 em hemácias. A faixa etária que apresentou maior número de casos positivos foi a de 21 a 30 anos com a incidência de 3 casos. Pode-se observar que a maior incidência de pacientes portadores de HPN se encontrava entre a 2ª e o final da 5ª década de vida, com mínimo e máximo de 19 anos aos 48 anos e mediana de idade de 28 anos. Em relação aos gêneros não houve diferença estatística, com 4 casos positivos em pacientes do sexo masculino e 5 do sexo feminino. Os achados deste estudo demonstram a eficiência da citometria de fluxo no diagnóstico para a HPN, recomendando o uso desta técnica como forma de auxiliar positivamente no diagnóstico e posterior tratamento dos pacientes portadores de aplasias medulares encaminhados a Fundação HEMOPA. Destacando, porém a necessidade do aperfeiçoamento da técnica através da utilização de outros anticorpos que aumentem a precisão no diagnóstico da doença,

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma desordem hematológica de fisiopatogenia complexa que acarreta múltiplos distúrbios e complicações clínicas. Foi descrita pela primeira vez em 1882, caracterizando-se por ser uma doença clonal, adquirida e rara. (Garcia & Franco, 2001)

1.1. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A falha da regulação do complemento na membrana eritrocitária HPN torna estas células vulneráveis à lise mediada pelo complemento, resultando na liberação de grandes quantidades de hemoglobina livre no plasma. Esta hemoglobina plasmática livre leva ao aumento do consumo de óxido nítrico, resultando em manifestações que incluem fadiga, dores abdominais, espasmo esofágico, disfunção erétil e, possivelmente, a trombose. Sendo, porém, a hemoglobinúria, trombose, disfunção erétil e espasmo esofágico as manifestações mais comuns em pacientes com grandes populações de células HPN positivas (> 60% dos granulócitos) em comparação com os pacientes com populações celulares relativamente pequenas HPN. (Brodsky, 2008)

Na forma mais clássica de manifestação clínica na HPN ocorre anemia hemolítica e a presença dos produtos desta hemólise na urina (hemoglobina e hemossiderina) faz com que a urina do paciente fique com cor escura, geralmente pela parte da manhã em virtude da absorção noturna de lipossacarídeos que provoca um aumento da atividade do sistema complemento. Nestes casos, às vezes, o paciente apresenta icterícia e esplenomegalia. A anemia, ainda nestes casos, é acompanhada de um sinal de reticulocitose e de certo grau de insuficiência medular. Sendo que sua ocorrência e intensidade dependem da proporção de células anormais, do grau de anormalidade destas células e dos níveis de ativação do complemento. (Rosse, 1997)

A sobrevida estimada sem tratamento para estes pacientes é de aproximadamente 8 anos, sendo que as principais causas de morte são complicações trombóticas e pancitopenia progressiva. E raramente ocorre remissão

espontânea (10% a 15 % dos casos) ou transformação para Leucemia Mielóide Aguda. (Garcia & Franco, 2001)

1.2. GENE PIG-A E A MOLÉCULA GPI

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) caracteriza-se geneticamente por uma mutação somática no gene PIG-A (Fosfatidil Inositol Glicano complemento grupo A), localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1), tendo aproximadamente 17 kb de comprimento e 6 exóns. As alterações moleculares deste gene são heterogêneas, já tendo sido descritas mais de 180 mutações em pacientes com HPN, sendo a maioria destas, resultado de pequenas inserções ou deleções de um ou dois nucleotídeos que resultam erros na matriz de leitura, onde a produção do produto do gene é nula; podendo ocorrer também mutações de ponto onde irá ser produzida uma molécula parcialmente funcional. Porém, como todas as linhagens de células sanguíneas carregam a mesma mutação, a mutação no gene PIG-A deve ocorrer em uma célula progenitora hematopoiética. (Bessler & Hiken, 2008)

O gene PIG-A da HPN, em um indivíduo normal, codifica uma subunidade protéica essencial para a atividade da N-acetylglucosaminyltransferase (UDP-GlcNAc: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 susceptíveis ao efeito lítico exercido pelo SC. Entre os antígenos mais conhecidos estão o DAF (Fator Acelerador da Degradação das Convertases do Complemento) e o MIRL (Inibidor da Lise de Membrana), denominados também como CD55 e CD59, respectivamente. Particularmente, o último é o maior responsável pela regulação da lise mediada pelo SC. (Modesto 2006)

1.3. FENÓTIPO CÉLULAR HPN

A característica marcante das células HPN é que elas possuem deficiência de todas as proteínas de superfície que utilizam a molécula de GPI como âncora. Atualmente, são conhecidas pelo menos 27 diferentes proteínas GPI-ligadas

expressas nas células sanguíneas. As proteínas GPI-ligadas, conforme já informado anteriormente, realizam uma multiplicidade de funções nas células hematopoiéticas, dentre as quais se destacam as de: moléculas acessórias para os receptores de crescimento, inibidores do complemento ou moléculas de adesão. (Bessler & Fehr, 1991)

Em pacientes portadores de HPN, todas as linhagens celulares sanguíneas e suas progenitoras são afetadas, embora as linhagens linfóides, geralmente, em menor grau; ocorrendo também a coexistência de células normais e células HPN. Sendo que é o percentual de células mielóides com deficiência de proteínas GPI-ligadas, o indicador do tamanho do clone HPN. Visto que os glóbulos vermelhos na HPN têm uma meia-vida reduzida na circulação, devido à sua maior sensibilidade ao complemento; o percentual deste tipo celular no sangue não reflete o tamanho do clone HPN da medula óssea, sendo utilizado, no entanto, para determinar o grau de deficiência da molécula de GPI-âncora. Com a deficiência de pelo menos duas destas moléculas GPI-ligadas nas células em circulação se tem um indicador suficiente para o diagnóstico da HPN. (Bessler & Hiken, 2008)

1.4. HPN NA ANEMIA APLÁSICA E NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

Pequenas a moderadas quantidades de clones de células de HPN são encontradas em até 70% dos pacientes com Anemia Aplásica adquirida, demonstrando um elo fisiopatológico entre esses transtornos. Normalmente menos de 20% de granulócitos GPI deficientes são detectados em pacientes com Anemia Aplásica no momento do diagnóstico. Porém, o seqüenciamento do DNA de células GPI deficientes provenientes de pacientes com Anemia Aplásica revela clones com mutações genéticas PIG-A. Embora no passado se pensasse que a HPN evoluindo de Anemia Aplásica fosse mais benigna do que HPN clássica, esta observação é provavelmente uma consequência do viés conduzido pelo tempo, uma vez que muitos destes pacientes eventualmente desenvolvem os sintomas clássicos da HPN após a expansão do clone PIG-A mutante. (Wang et al., 2002)

Células GPI deficientes também já foram relatadas em pacientes com Síndromes Mielodisplásicas (SMD), mas o seqüenciamento do gene PIG-A para estabelecer a clonalidade não foi realizada na maior parte desses estudos. Pacientes com SMD relatando pequenas populações HPN tendem a ser

classificados como anemia refratária e, muitas vezes, têm as seguintes características: hipocelularidade medular, HLA-DR15 positivo, citogenética normal, trombocitopenia moderada a grave, e elevada probabilidade de resposta à terapia imunossupressora. (Wang et al., 2009)

1.5. CLASSIFICAÇÃO

A classificação mais aceita hoje de HPN incorpora as variações nas características já descritas de manifestações clínicas e história natural dos pacientes com HPN em três categorias. (Parker et al., 2005)

1.5.1. HPN Clássica

Caracteriza-se pela presença de pacientes que tem evidência clínica de hemólise intravascular (reticulocitose, concentração sérica anormalmente elevada de lactato desidrogenase [LDH] e bilirrubina indireta, e concentração sérica anormalmente baixa de haptoglobina), medula celular com hiperplasia eritróide de morfologia normal ou quase-normal, mas sem anormalidades cariotípicas. Os doentes com HPN clássica tendem a ter citopenia leve a moderada, uma medula óssea normocelular a hiper celular, uma contagem elevada de reticulócitos, uma acentuada elevação dos níveis de LDH e mais de 60% de granulócitos GPI-deficientes.

1.5.2. HPN associada a outro transtorno específico da medula óssea

Caracteriza-se pela presença de pacientes com evidências clínicas e laboratoriais de hemólise, e concomitante anormalidade medular subjacente. Onde a citogenética da medula óssea é utilizada para determinar se HPN surgiu em associação com Anemia Aplásica, Síndrome Mielodisplásica (SMD) ou outras mielopatias (por exemplo: mielofibrose).

1.5.3. HPN Subclínica (HPN-Sc)

Os Individuos com HPN-Sc não têm evidência clínica ou laboratorial de hemólise. Apenas pequenas populações de células hematopoiéticas (eritrócitos do sangue periférico, granulócitos ou ambos) são GPI deficientes e detectados pela análise por citometria de fluxo. A HPN-Sc é observada em associação com

síndromes de deficiência da medula óssea, particularmente à Anemia Aplásica e à Anemia Refratária- SMD.

Os doentes com HPN Subclínica apresentam manifestações de insuficiência da medula óssea. Na verdade, mais de 50% dos pacientes com Anemia Aplásica portam pequenos clones HPN. Estes pacientes normalmente apresentam pancitopenia moderada a grave, uma medula óssea hipocelular, uma diminuição da contagem de reticulócitos, um normal ou levemente elevado nível de LDH e uma pequena população de granulócitos GPI-deficientes (<20%)

1.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da HPN é baseado em achados clínicos e testes laboratoriais (hemograma completo, contagem de reticulócitos, determinação do LDH, citometria de fluxo de sangue periférico e exame de medula óssea) que detectam as proteínas de membrana ligadas a GPI ou demonstram a presença de eritrócitos excepcionalmente sensíveis à ação hemolítica do sistema complemento. Neste sentido os métodos diagnósticos de HPN mais específicos hoje disponíveis são: (1) o teste de Ham, introduzido na década de 30, ainda é utilizado em alguns serviços como teste de triagem diagnóstica, mas é sabidamente pouco sensível por sua incapacidade de detectar pequenas populações de células HPN positivas. Apresentando resultados falso-positivos em situações como na anemia diseritropoética congênita tipo II, também denominada multinuclearidade hereditária dos eritroblastos. (2) A pesquisa nos eritrócitos de CD55 e CD59 em coluna de gel ou gel teste, mais recentemente introduzida, se baseia na identificação dos eritrócitos anormais por aglutinação em microcolunas de gel contendo anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59. Os resultados, que são interpretados em relação à presença ou ausência dos antígenos, podem oferecer uma estimativa da deficiência da expressão dos antígenos, classificando-a em parcial ou completa. Porém, embora seja um teste de boa especificidade, deve ser confirmado por (3) citometria de fluxo (CMF) (Modesto et al., 2006)

O método de Citometria de Fluxo, semelhante ao gel teste, também utiliza anticorpos monoclonais, entretanto de forma mais sensível, específica e precisa para o diagnóstico de HPN. Suas vantagens sobre os outros métodos são: analisar o defeito em granulócitos e plaquetas, quantificar o número de células GPI deficientes

em proporção, avaliar a evolução da doença baseada na quantificação de células HPN e detectar clones em doentes com Anemia Aplásica. Os anticorpos monoclonais específicos mais utilizados no diagnóstico da HPN são os anti-CD55 e anti-CD59, suficientes para fechar o diagnóstico. No entanto, a deficiência de GPI pode também ser detectada utilizando anti-CD58, anti-CD14, anti-CD24, anti-CD48, anti-CD16 e outros. (Modesto et al., 2006)

O diagnóstico da HPN por citometria de fluxo é altamente sensível e específico para o diagnóstico e é útil a estratificação em HPN clássica ou HPN subclínica dos clones de HPN antes de iniciar o tratamento dos pacientes. No entanto, o diagnóstico de HPN é feito com um atraso de 2 a 3 anos em média em função destes pacientes necessitem de múltiplas transfusões sanguíneas, sendo então este tempo o período necessário sem transfusão. (Bessler & Hiken, 2008)

1.7. TRATAMENTO

O tratamento da HPN depende da sua apresentação clínica. Os doentes com HPN clássica têm maior risco de trombose e outras complicações de hemólise intravascular. Até recentemente, o transplante alogênico de medula óssea foi a única terapia eficaz para estes pacientes, porém, o desenvolvimento do Eculizumab agora lhes oferece uma grande esperança. A terapia com prednisona é ocasionalmente outra útil terapia na melhora da hemólise em PNH, mas a maioria dos pacientes apresenta pouca ou nenhuma resposta a este tratamento. (Brodsky & Savage, 2007)

A falência da medula óssea é a principal fonte de morbidade e mortalidade em pacientes com HPN subclínica, a terapia então deve ser dirigida de forma a melhorar as citopenias. Pacientes com clones HPN que satisfazem os critérios para Anemia Aplásica severa, tem como opções terapêuticas apropriadas transplante alogênico de medula óssea, ciclofosfamida em altas doses ou globulina anti-timócito e ciclosporina. Porém, caso a citopenia do paciente não preencha os critérios para Anemia Aplásica grave, é adequada uma terapia com imunossupressores. (Brodsky & Savage, 2007)

Fenômenos trombóticos agudos na HPN devem ser tratados com heparinização plena, seguida de anticoagulação oral, mantendo o INR entre 2 e 3. Em algumas situações, há necessidade de ser realizada terapia trombolítica. A anticoagulação oral nem sempre previne trombose no paciente com HPN e uma vez

iniciada, após o primeiro episódio trombótico, deve ser feita continuamente, se não houver complicações hemorrágicas graves ou outra contra-indicação. Alguns autores indicam a anticoagulação oral, profilática, após o diagnóstico de HPN ser feito, caso não haja contra-indicação. Entretanto, na maior parte dos centros, tal estratégia não é a utilizada, isto é, anticoagulação só é iniciada após o primeiro evento trombótico. (Garcia & Franco, 2001)

O Eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado contra C5 que inibe a ativação terminal do complemento. Um experimento aberto de 12 semanas de Eculizumab em 11 pacientes HPN demonstrou que a droga reduziu a hemólise intravascular e a necessidade de transfusão. Outro recente experimento conhecido como TRIUMPH demonstrou que o Eculizumab foi eficaz na estabilização dos níveis de hemoglobina e a necessidade de transfusão reduzida em pacientes com HPN clássica. O grupo tratado com Eculizumab também mostrou melhorias significativas na qualidade de vida e uma diminuição significativa nos níveis de LDH. Os efeitos adversos mais comumente relatados pelos pacientes tratados foram dor de cabeça, nasofaringite, dor nas costas, e infecções do trato respiratório superior. Assim, em pacientes com HPN clássica, o Eculizumab é altamente eficaz em diminuir hemólise intravascular; a droga melhora significativamente a qualidade de vida e reduz ou elimina a necessidade de transfusões de sangue. Outro dado importante, é que o Eculizumab também atenua as distonias musculares lisas que estão frequentemente associados à HPN, reduzindo níveis plasmáticos de hemoglobina livre. A diminuição do risco de trombose em pacientes HPN positivo, com o uso do Eculizumab, ainda deve ser determinado. (Hillmen et al, 2004)

1.8. HPN E INSUFICIÊNCIA RENAL

Insuficiência renal aguda e crônica são complicações que podem ocorrer em pacientes com HPN, sendo que, trombose venosa renal, tubulonecrose aguda devido à nefropatia por pigmentos e infecções urinárias recorrentes são as principais causas de insuficiência renal em pacientes com HPN. (Peres, 2008)

1.9. HPN ASSOCIADA À GRAVIDEZ

Não há dúvida de que gravidez e HPN é uma associação de alto risco, além de ser muito rara. Até o momento, foram descritos menos de 100 casos diagnosticados durante a gravidez. De modo que, a gestação deve ser desaconselhada em mulheres com HPN ainda não submetidas ao transplante de medula óssea e que sejam portadoras de aplasia de medula ou de seqüelas de tromboembolismo, como a síndrome de Budd-Chiari.

O prognóstico, mesmo em gestantes em remissão, é imprevisível, e uma gravidez prévia sem intercorrências não é garantia de futuras gestações não complicadas, e aparentemente, há redução na expectativa de vida destas mulheres. É importante que obstetras e hematologistas atuem em conjunto, garantindo anticoncepção adequada e discutindo individualmente com estas mulheres a indicação de esterilização definitiva nos casos mais graves. (Nomura et al, 2004)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Implantar e ampliar o atendimento diagnóstico de pacientes portadores de aplasia medular para o diagnóstico preciso e diferencial de Hemoglobinúria Paroxística Noturna através das técnicas de Citometria de Fluxo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o diagnóstico Imunofenotípico por Citometria de Fluxo de pacientes portadores de aplasia medular para o diagnóstico preciso e diferencial de HPN no Estado do Pará.
- Definir a incidência de HPN entre os pacientes portadores de aplasia medular.

3. METODOLOGIA

3.1. CASUÍSTICA

No período de novembro de 2008 a julho de 2009 foram analisados 30 casos de pacientes com suspeita de Hemoglobinúria Paroxística Noturna, com idades entre 2 anos e 79 anos, atendidos na Fundação HEMOPA, e encaminhados pelo médico solicitante para realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo para anti-CD55 e anti-CD59 no laboratório de citometria de fluxo da Fundação HEMOPA, Belém - Pará, e para a realização de outros exames complementares como: DHL, TGO, TGP, Coombs direto e indireto, bilirrubinas totais e frações e hemograma completo.

3.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Estudo retrospectivo, descritivo e transversal com pacientes inseridos nos programas de diagnóstico diferencial de portadores de aplasias medulares da Fundação HEMOPA, os quais foram submetidos a coletas de amostras de sangue periférico dos pacientes, em tubos de hemólise com 0,5ml de EDTA, e encaminhamento clínico das amostras com suspeita diagnóstica.

3.3. DIAGNÓSTICO POR IMUNOFENOTIPAGEM

A identificação das populações de células foi feita adicionando-se em média 0,01ml a 0,05ml de diferentes anticorpos monoclonais específicos (CD55, CD59, CD45 e CD14) marcados com fluorocromos FITC, PE ou Percyp, incubados no escuro e a temperatura ambiente, ou a 4° C, com posterior aquisição de 10.000 células e análise das amostras, no Citometro de Fluxo FACS Calibur, com Cell Quest Pro (Becton Dickinson, San Jose, CA) para 3 cores.

3.4. PROCEDIMENTOS

A técnica de preparação das amostras e análise de imunofenotipagem de Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) a ser utilizado consiste nos seguintes procedimentos:

Primeiramente é feita a identificação de cada tubo Falcom de citometria com o tipo de amostra (suspeita ou controle), o tipo de célula que será investigada (hemácias ou neutrófilos) e o anticorpo a ser utilizado.

Então pipetar em cada tubo para análise de hemácias com 50µl de sangue periférico total das amostras suspeita ou controle e em cada tubo para análise de neutrófilos com 100µl de sangue periférico total das amostras suspeita ou controle; e preencher cada tubo com 95µl de solução de PBS diluído 10 vezes.

Após o que se acrescenta 5µl de cada anticorpo especificado individualmente (CD55 ou CD59) em eppendorfs individuais mais 5µl de solução isotônica para cada anticorpo especificado nos mesmos; então acrescentar 10µl de cada anticorpo especificado diluído (CD55 ou CD59) nos tubos com as amostras (suspeita e controle), conforme identificação de cada tubo, sempre homogeneizando o anticorpo e a amostra, e desprezando a ponteira a cada homogeneização.

Ao que devem ser homogeneizados em vórtex, os tubos das amostras para análise das hemácias e incubar por 30 minutos no escuro.

Em seguida preencher cada tubo das amostras (suspeita e controle) para análise de neutrófilos com 100µl da primeira solução de Lise da DAKO; homogeneizar em vórtex e incubá-los por 10 minutos no escuro; então acrescentar a cada tubo 1ml da segunda solução de lise DAKO, homogeneizar em vórtex e incubar por 20 minutos no escuro.

Ao término do período de incubação, deve-se centrifugar a 700 r.p.m., por 5 minutos, e então desprezar os sobrenadantes de todos os tubos de amostras para análise das hemácias e neutrófilos. Para então preencher cada tubo de amostra para análise de hemácias com 3ml de solução de PBS diluído 10 vezes e cada tubo de amostra para análise de neutrófilos com 1ml de solução de PBS diluído 10 vezes.

Finalmente, homogeneizar os tubos para análise das hemácias e neutrófilos em vórtex e promover a aquisição dos tubos de modo padrão no CellQuest Pro.

Os tubos devem ser tampados com tampas de borracha, envoltos com papel alumínio e conservados, em estante, em geladeira e no escuro por até 24 horas após a hora da coleta, quando ainda podem ser utilizados para análise.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram adotados métodos descritivos e não paramétricos para as análises de incidência de HPN nos pacientes analisados. Sendo considerado o nível de significância $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Do total de 30 pacientes analisados, 9 casos tiveram diagnóstico positivo para HPN, 18 apresentaram resultado negativo, enquanto que em 3 casos não foi possível chegar-se a um diagnóstico conclusivo, onde os pacientes apresentavam células parcialmente negativas para a marcação por CD59 em neutrófilos, porém, marcações normais para CD55 e CD59 em hemácias.

Quanto à idade dos pacientes analisados, os mesmos foram divididos em oito faixas etárias: de 0 a 10; 11 a 20; 21 a 30; 31 a 40; 41 a 50; 51 a 60; 61 a 70 e 71 a 80 anos. A faixa etária que apresentou maior número de casos positivos foi a de 21 a 30 anos com a incidência de 3 casos, além de apresentar 1 caso inconclusivo. (Tabela I)

Tabela I. HPN segundo a faixa etária

Resultados		Faixa Etária em Anos								Total
		0 a 10	11 a 20	21 a 30	31 a 40	41 a 50	51 a 60	61 a 70	71 a 80	
H P N	Positiva	00	02	03	00	02	01	00	01	09
	Negativa	02	03	03	05	02	02	01	00	18
	Inconclusivos com CD59 +	00	00	01	00	00	01	01	00	03
TOTAL		02	05	07	05	04	04	02	01	30

Fonte: Laboratório de Citometria de Fluxo, Gerência de Biologia Celular e Molecular, Fundação Hemopa, período de 1º de agosto de 2005 a 31 de maio de 2009.

Pode-se observar que a maior incidência de pacientes portadores de HPN de sete dos nove, ou inconclusivos de dois dos três se encontrava entre a 2ª e o final da 5ª década de vida, com mínimo e máximo de 19 anos aos 48 anos (Tabela I), e mediana de idade de 28 anos.

Em relação aos gêneros não houve diferença estatística, com 4 casos positivos em pacientes do sexo masculino e 5 do sexo feminino.

Foram relatados três casos inconclusivos durante o período de análise nos quais não se foi possível chegar ao diagnóstico definitivo dos pacientes (Tabela II), em dois destes casos pesquisa de anticorpos CD55 e CD59 para Hemoglobinúria Paroxística Noturna, por citometria de fluxo, em hemácias e neutrófilos da paciente, realizada mostrou-se de difícil análise para a marcação de CD59; não sendo possível confirmar a presença de células com ausência para esta marcação de forma precisa, visto que em hemácias as marcações de CD55 e CD59 são normais, e em neutrófilos o CD55 é normal e o CD59 parcialmente negativo. Em um terceiro caso a pesquisa de anticorpos CD55 e CD59 para Hemoglobinúria Paroxística Noturna por citometria de fluxo em hemácias e neutrófilos da paciente, foi realizada em dois momentos distintos (13/05/09 e 15/06/09), porém mostrou-se imprecisa e de difícil análise; não sendo possível afirmar se havia presença de células com ausência para as marcações de CD55 e CD59 visto que em hemácias estas marcações eram normais e em leucócitos elas foram imprecisas por não ocorrer a separação adequada das células leucocitárias segundo a sua distribuição gráfica de complexidade versus o tamanho das células. Fato que dificulta a identificação precisa dos neutrófilos e, conseqüentemente, a identificação fiel da ausência de marcação para CD55 e CD59 em neutrófilos, as células alvo da pesquisa de HPN por citometria de fluxo.

Tabela II. Casos inconclusivos

CASO	ANTICORPO – CÉLULAS-ALVO			
	CD55 - HEMACIAS	CD59 - HEMACIAS	CD55 - NEUTROFILOS	CD59 - NEUTROFILOS
MARP	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	PARC. NEG
RNSJ	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	PARC. NEG
OBF	PRESENTE	PRESENTE	IMPRECISA	IMPRECISA

Fonte: Laboratório de Citometria de Fluxo, Gerência de Biologia Celular e Molecular, Fundação Hemopa, período de 1º de agosto de 2005 a 31 de maio de 2009

5. DISCUSSÃO

Uma das principais complicações ao diagnóstico da Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN), é a demora para o início do tratamento para estes pacientes, que se dá devido à dificuldade no diagnóstico diferencial entre a HPN e as Síndromes Mielodisplásicas, visto que muitos dos sinais clínicos e laboratoriais apresentados pelos portadores destas patologias são semelhantes

Atualmente o diagnóstico mais preciso dos pacientes com HPN é realizado por métodos de imunofenotipagem por citometria de fluxo, de proteínas de inativação do sistema complemento, como CD55 e CD59, que nos pacientes portadores de HPN estão ausentes em neutrófilos e hemácias.

Em virtude, porém, deste serviço ser inexistente em várias capitais do Norte do Brasil, aliado ao fato de esta ser uma doença que se enquadra no perfil de doença negligenciada pelos órgãos de saúde, onde muitos casos são omitidos pela ausência de um diagnóstico preciso da doença; faz-se necessário o aperfeiçoamento da técnica visando à melhoria dos serviços de diagnóstico, tratamento e o encaminhamento dos pacientes portadores de HPN para procedimentos mais complexos em outros centros.

Os resultados obtidos neste estudo, no entanto, demonstraram que o diagnóstico por citometria de fluxo realizado no estudo apresentou uma eficácia relativamente alta onde em 27 dos 30 casos analisados foi possível se chegar a um diagnóstico conclusivo quanto à presença ou ausência da HPN nos pacientes encaminhados para a realização do exame.

Podendo-se verificar que do total de casos analisados, a incidência de casos de HPN em pacientes portadores de aplasias medulares encaminhados para estudo observada foi de 9 casos, e que apesar do número limitado de pacientes analisados, pode-se considerar que o número de casos positivos foi significativo, pois aproximadamente 30% destes possuíam a doença.

Onde foram considerados positivos todos os pacientes que apresentavam ausência de CD55 e CD59 em neutrófilos e hemácias, em conjunto com resultados dos exames complementares (DHL, TGO, TGP, Coombs direto e indireto, bilirrubinas totais e frações e hemograma completo), característicos de quadros de hemólise intravascular.

Outra constatação deste estudo foi de que a maior parte dos casos com resultado positivo encontrava-se entre 19 e 48 anos com idade mediana de 28 anos; semelhante ao relatado na literatura que descreve que a HPN tem ocorrência mais freqüente em adultos jovens, em virtude de ser esta uma doença clonal adquirida da célula tronco hematopoiética, causada por uma mutação somática no gene GPI, sendo raros os casos descritos de mutações hereditárias do gene GPI.

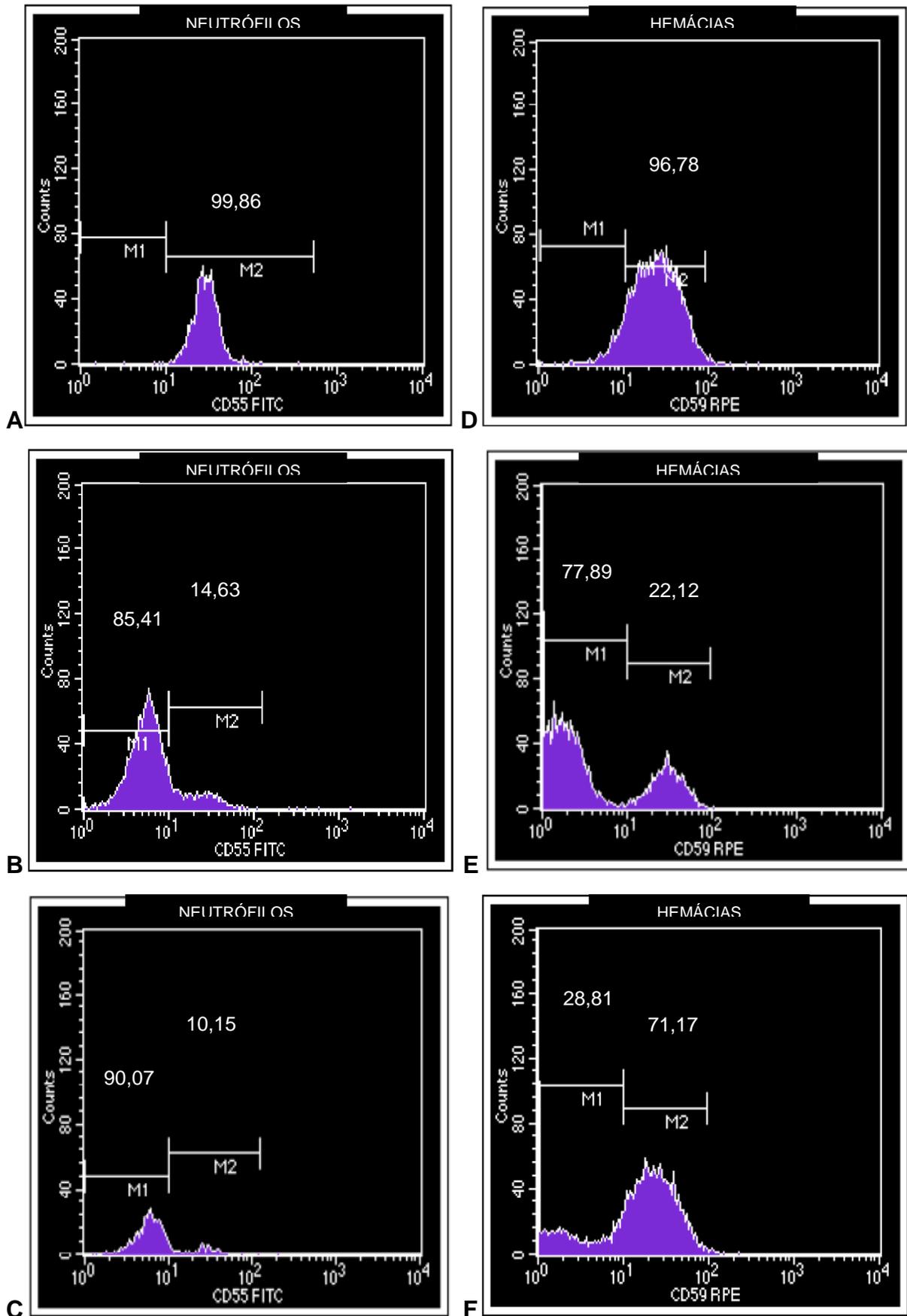
Quanto ao gênero, outra variável analisada, os dados obtidos também se encontram semelhantes ao observado na literatura onde se afirma que a incidência de casos entre o sexo masculino e o feminino é semelhante.

Estes achados estão de acordo com o observado por Bessler et al (2006) onde é relatado que o diagnóstico da HPN é mais frequentemente feito em adultos jovens com idade mediana de 35 anos; mas que no entanto, a HPN ocorre também nos idosos e nas crianças; sendo uma doença que afeta igualmente ambos os sexos.

A eficiência da citometria de fluxo no diagnóstico da HPN fica ainda mais evidente ao observarmos os gráficos dos resultados obtidos no estudo (Figura 1), onde pode ser visto exatamente o porquê deste ser considerado o teste de padrão ouro no diagnóstico da doença, pois como relatado em diversos estudos podemos ter a noção exata do tamanho clonal de células afetadas.

Ao compararmos os resultados dos casos de HPN com os de amostras controle negativos neste estudo, podemos observar claramente quando há alguma alteração nos resultados dos pacientes; pois nas amostras controle o observado é uma proporção de mais 95% de células apresentando positividade para os anticorpos CD55 e CD59, enquanto que nos casos de HPN positivo são observados resultados de até 90% de células com deficiência de CD55 e 77% com deficiência de CD59. (Figura 1)

Figura 1. Representação gráfica de exemplificação da expressão de CD55 e CD59 em amostras controle (A e D) e de pacientes portadores de HPN (B, C, E e F) por Citometria de Fluxo.



Outro dado interessante a ser observado é que mesmo nos controles negativos não ocorre uma totalidade de células com a presença dos antígenos de superfície, isto ocorre, pois como demonstrado por Hu et al (2005), é normal a ocorrência de mutações do gene PIG-A em indivíduos saudáveis, sem no entanto vir a causar a HPN; sendo que nestes casos a mutação, ocorre em células diferenciadas e não nas células progenitoras hematopoiéticas de forma que a proporção de células atingidas não apresenta nenhuma significância; ou então tratavam-se de células jovens onde ainda não havia ocorrido uma totalidade da expressão das proteínas de superfície.

O aperfeiçoamento da técnica de citometria de fluxo deve ser realizado visando o aumento da precisão deste teste diagnóstico, de forma a reduzir ainda mais o número de casos inconclusivos, como nos observados neste estudo onde a marcação de CD55 e CD59 em hemácias foi normal enquanto que em neutrófilos o CD 55 era positivo e o CD59 negativo. (Tabela II)

Uma hipótese a ser sugerida é de que possivelmente estes pacientes sejam positivos para HPN, porém, tenham sido submetidos a transfusões recentes, com menos de três meses antes da realização deste exame; ou então não se enquadram em casos de HPN clássica, devendo possuir outra doença associada à HPN, ou ainda possa ter ocorrido alguma reação cruzada.

Este problema poderia ser resolvido através da estratificação dos pacientes em HPN clássica e subclínica, onde podem estar enquadrados estes pacientes, visto a associação a outras doenças. Isto seria feito com o uso nestes casos de outros anticorpos além de CD55 e CD59, como CD16, CD24 e/CD66b que também já foram determinados como úteis na análise granulócitos, com a vantagem de que os últimos detectam uma população granulocítica maior e mais distinta sendo mais eficiente no diagnóstico de pacientes com HPN subclínica

Como descrito por Wang (2009) o uso de outros anticorpos é explicado pelo fato de que na HPN clássica, CD55 e CD59 são as proteínas mais relevantes ancoradas à molécula GPI, pois sua deficiência leva para um aumento da sensibilidade das células vermelhas HPN para a hemólise intravascular mediada pelo complemento. Na HPN subclínica, no entanto, mesmo na presença de uma mutação somática do gene PIG-A em algumas das células-tronco hematopoiéticas e sua progênie, esta anormalidade intrínseca não é conferida às células mutantes, mas representa uma expansão clonal de células de fenótipo HPN relacionadas com

a destruição imunomediada das células-tronco ou uma vantagem de crescimento em um ambiente de medula óssea desfavorável. Na seleção de clones na HPN subclínica, os granulócitos são a população de células preferidas para análise por causa de sua meia-vida curta e menor interferência de transfusões de células vermelhas recentes.

Outra hipótese para não se ter chegado a um diagnóstico conclusivo como observado em alguns casos pode ser a presença de auto-anticorpos para outras doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico conforme foi observado em um dos casos inconclusivos apresentados; que foi diagnosticado posteriormente após suspensão do tratamento com prednisona.

Os anticorpos produzidos nas doenças autoimunes podem se ligar a antígenos de superfícies celulares ou formar complexos imunes após a ligação com antígenos circulantes. Esses complexos imunes tendem a se depositar em órgãos, como o glomérulo renal, com subsequente ativação do sistema complemento através da via clássica, causando dano aos tecidos. Apesar da reconhecida ação efetora do complemento no dano aos órgãos em doenças autoimunes, pouco se conhece sobre o mecanismo das proteínas reguladoras de membrana do complemento na modulação da gravidade desse dano. (Alegretti et al, 2009)

E de acordo com os dados encontrados por Tsunoda et al (2000), é sugerido que a diminuição da expressão de CD59 em células T CD8+ ativadas poderia se relacionar com a atividade da doença e a ativação ou indução da apoptose nesses pacientes.

6. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo corroboram com o que já foi descrito na literatura sobre a eficiência da citometria de fluxo no diagnóstico para a HPN, sendo assim extremamente recomendado o uso desta técnica como forma a auxiliar positivamente no diagnóstico e posterior tratamento dos pacientes portadores de aplasias medulares encaminhados a Fundação HEMOPA.

No entanto para um perfeito desenvolvimento deste serviço, a técnica utilizada deve também ser aperfeiçoada através da utilização de outros anticorpos que aumentem a precisão no diagnóstico da doença, podendo assim ser ampliado e oferecido a uma maior quantidade de pacientes, visto que ainda é restrito a uma pequena quantidade de pacientes.

Com a comprovação da eficiência da citometria de fluxo no diagnóstico da HPN, fica recomendado a ampliação do uso e extensão do teste para Hemoglobinúria Paroxística Noturna pelo menos uma vez para todos os pacientes com hemoglobinúria, hemólise inexplicada com aumento de LDH, trombose de veias abdominais e cerebrais, e trombocitopenia e macrocitose; e a cada seis meses para todos os pacientes com HPN, que apresentam Anemia Aplásica, que já tiveram Anemia Aplásica (exceto após transplante de medula óssea) e com Síndrome Mielodisplásica; de forma a garantir um aumento na qualidade de vida destes indivíduos e um melhor prognóstico no caso de ocorrência de HPN.

7. REFERÊNCIAS

- ALEGRETTI, A.P. et al. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol*, 49: 276-87. 2009.
- BESSLER, M. & FEHR, J. Fc III receptors (FcRIII) on granulocytes: a specific and sensitive diagnostic test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Eur J Haematol*. **47**:179-184. 1991.
- BESSLER, M. & HIKEN, J. The Pathophysiology of Disease in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria., **American Society of Hematology**. 2008
- BRODSKY, R.A. & SAVAGE W. J. New Insights into Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematology*, **12**: 371-376. 2007.
- BRODSKY, R.A. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Stem Cells and Clonality. **American Society of Hematology**. 2008
- GARCIA, A.A. & FRANCO, R.F. Trombofilias Adquiridas. **Hemostasia e Trombose**, **34**: 258-268. 2001.
- HILLMEN, P. HALL, C. MARSH, J.C et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. **350**: 552-559. 2004.
- HU, R. MUKHINA, GL. PIANTADOSI, S. et al. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood*. **105**: 3848-3854. 2005.
- MODESTO, T.M. Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna. *Rev Bras Hematol Hemoter*, **28**: 275-279. 2006.

- NOMURA, M.L. et al. Hemoglobinúria Paroxística Noturna e Gravidez. **RBGO**, **26**: 579-582. 2004.
- ROSSE, W.F. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. **Medicine (Baltimore)**, **76**: 63-93. 1997
- PERES, L.A.B. Insuficiência Renal Aguda na Hemoglobinúria Paroxística Noturna: Relato de Caso. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, **30**: 76-78.2008.
- PARKER, C.J. Molecular Basis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. **Stem Cells**, **14**: 396-411. 1996.
- PARKER, C.J. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, **106**: 3699-3709. 2005.
- TSUNODA, S. et al. Diminished expression of CD59 on activated CD8+ T cells undergoing apoptosis in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. **Scand J Immunol** **51(3)**: 293-9. 2000.
- WANG, H. et al. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. **Blood**, **100**: 3897-3902. 2002.
- WANG, S.A. 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**, **94**: 29-37. 2009.