

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

JULIANA MARIA CAMARGOS ROCHA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ANCORADAS AO  
GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) EM DIFERENTES  
LINHAGENS CELULARES, EM PACIENTES COM ANEMIA  
APLÁSICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

BELO HORIZONTE - MG  
2013

JULIANA MARIA CAMARGOS ROCHA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ANCORADAS AO  
GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) EM DIFERENTES  
LINHAGENS CELULARES, EM PACIENTES COM ANEMIA  
APLÁSICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Silvana Maria Elói Santos  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Luíza Silva

Belo Horizonte  
2013

R672a Rocha, Juliana Maria Camargos.  
Análise da expressão de moléculas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) em diferentes linhagens celulares, em pacientes com anemia aplásica e síndrome mielodisplásica [manuscrito]. / Juliana Maria Camargos Rocha. - - Belo Horizonte: 2013.  
96f. : il.  
Orientador: Silvana Maria Elói Santos.  
Co-Orientador: Maria Luíza Silva.  
Área de concentração: Patologia.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Hemoglobinúria Paroxística. 2. Anemia Aplástica. 3. Glicosilfosfatidilinositóis/deficiência. 4. Citometria de Fluxo. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Silvana Maria Elói. II. Silva, Maria Luíza. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 175

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitor**

Prof. Clélio Campolina Diniz

### **Vice-Reitora**

Profa. Rocksane de Carvalho Norton

### **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof. Ricardo Santiago Gomez

### **Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Renato de Lima Santos

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Prof. Francisco José Penna

### **Vice-Diretor**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

### **Coordenador do Centro de Pós-Graduação**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

## **CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

### **Coordenadora**

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

### **Subcoordenador**

Prof. Marcelo Vidigal Caliar

### **Membros do colegiado**

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal

Prof. Geraldo Brasileiro Filho

Prof. Marcelo Vidigal Caliar

Conrado de Oliveira Gamba (representação discente)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial, agradeço:

- À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Silvana Maria Elói Santos
- À minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Maria Luíza Silva
- Ao Dr. Marcelo Eduardo de Lima Souza
- À Dr<sup>a</sup> Mitiko Murao
- Ao Dr. Sérgio Schusterschitz da Silva Araújo
- Aos funcionários do Ambulatório Borges da Costa – HC/UFMG
- Aos pacientes
- À Cristina e a todos os amigos do Setor de Hematologia do Serviço de Medicina Laboratorial – HC/UFMG
- Aos colegas do Departamento de Propedêutica da Faculdade de Medicina/UFMG
- Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia/UFMG
- Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia
- Aos colegas da pós-graduação
- À minha querida Gabi
- Ao Gláucio
- A todos os meus familiares, especialmente à minha irmã Andreia

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD59 e CD55 em neutrófilos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle                  | 48 |
| Figura 2 – Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD24 e CD16 em neutrófilos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle                  | 49 |
| Figura 3 – Análise, por citometria de fluxo, da marcação com FLAER e da expressão de CD24 em neutrófilos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle | 50 |
| Figura 4 – Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD14 e CD55 em monócitos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle                    | 51 |
| Figura 5 – Análise, por citometria de fluxo, da marcação com FLAER e da expressão de CD55 em monócitos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle   | 52 |
| Figura 6 – Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD59 e CD55 em hemácias de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle                     | 53 |
| Figura 7 – Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD59 em hemácias de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle                            | 54 |
| Figura 8 – <i>Background</i> observado nas amostras do grupo controle   | 57 |
| Figura 9 – Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 1)            | 60 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 10 – Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C) em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 2)   | 61 |
| Figura 11 – Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico de AA (caso 3)   | 62 |
| Figura 12 – Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 4)  | 63 |
| Figura 13 – Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 5)  | 64 |
| Figura 14 – Análise por histograma das populações de hemácias das amostras positivas para a presença do clone HPN. Os histogramas evidenciam células tipo I e tipo III   | 65 |
| Figura 15 – Estratégia de análise multiparamétrica para a seleção de neutrófilos nas amostras dos pacientes com SMD  | 67 |
| Figura 16 – Estratégia de análise multiparamétrica para a seleção de monócitos nas amostras dos pacientes com SMD  | 69 |
| Figura 17 – Figura ilustrativa de gráficos <i>dot plot</i> apresentando neutrófilos com redução isolada de expressão dos antígenos CD55 (A) e CD16 (B), e monócitos com redução isolada de expressão do antígeno CD14 (C), em pacientes distintos com diagnóstico de SMD | 70 |
| Figura 18 – Gráficos de aquisição e histogramas ilustrativos da marcação de neutrófilos com FLAER em diferentes situações  | 72 |

Figura 19 – Resultados obtidos na pesquisa de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI nas amostras dos grupos controle e de doentes (anemia aplásica e síndrome mielodisplásica), por combinações de reagentes, nas populações de neutrófilos e monócitos

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Exemplos de proteínas ancoradas ao GPI expressas pelas células hematopoiéticas   | 17 |
| Tabela 2 – <i>International Prognostic Scoring System</i> (IPSS) para síndromes mielodisplásicas  | 28 |
| Tabela 3 – Parâmetros hematológicos - média (mínimo - máximo) - das amostras analisadas dos pacientes com anemia aplásica (AA), síndrome mielodisplásica (SMD) e indivíduos do grupo controle   | 44 |
| Tabela 4 – Combinações de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos e seus respectivos volumes utilizados para a análise de hemácias   | 45 |
| Tabela 5 – Combinações de reagentes conjugados a fluorocromos e seus respectivos volumes utilizados para a análise de neutrófilos   | 46 |
| Tabela 6 – Combinações de reagentes conjugados a fluorocromos e seus respectivos volumes utilizados para a análise de monócitos   | 46 |
| Tabela 7 – Medidas de tendência central, dispersão e percentis das amostras-controle, expressas em percentual de células alteradas em relação ao total de eventos analisados, fracionadas por populações celulares e combinações de reagentes | 55 |
| Tabela 8 – Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> entre os protocolos de aquisição de leucócitos (50.000 e 100.000 eventos), para as cinco combinações de reagentes utilizadas, considerando os subgrupos formados                     | 58 |

Tabela 9 – Proporções de células HPN detectadas nas populações celulares estudadas, por combinações de reagentes. Resultados expressos em valor percentual (%) 59

Tabela 10 – Coeficientes de correlação de *Pearson* entre as proporções de células com fenótipo HPN, detectadas pelas diferentes combinações de reagentes utilizadas na análise de neutrófilos e monócitos 75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Anemia aplásica  
AF488 – Alexa fluor 488  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APC – Alofococianina  
AREB – Anemia refratária com excesso de blastos  
ARSA – Anemia refratária com sideroblastos em anel  
BSA – *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)  
CD – *Cluster of differentiation*  
CEL – Células  
COEP – Comitê de Ética em Pesquisa  
CRDU – Citopenia refratária com displasia de uma linhagem  
CRDM – Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens  
DAF – *Decay acceleration factor* (fator acelerador do decaimento)  
Del(5q) – Deleção do braço longo do cromossomo 5  
DEPE – Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão  
dL – Decilitro  
DP – Desvio padrão  
EDTA – Acido etilenodiaminotetracético  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
FLAER – *Fluorescent Aerolysin* (aerolisina fluorescente)  
FSC – *Forward scatter* (dispersão frontal – parâmetro de tamanho celular)  
g – Grama  
G-CSF – Fator estimulador de crescimento de granulócitos  
Glic – Glicoforina  
GPI – Glicosilfosfatidilinositol  
Hb – Hemoglobina  
HLA – *Human Leukocyte Antigen* (antígeno leucocitário humano)  
HPN – Hemoglobinúria paroxística noturna  
IPSS – *International Prognostic Scoring System* (Sistema de Escore Prognóstico Internacional)  
LDH – Lactato - desidrogenase

LL – *Lower left* (quadrante inferior esquerdo)

LMA – Leucemia mielóide aguda

mg – Miligrama

MIRL – *Membrane inhibitor of reactive lysis* (inibidor de membrana da lise reativa)

µL – Microlitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm<sup>3</sup> – Milímetro cúbico

MO – Medula óssea

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato em solução salina)

PE – Ficoeritrina

PerCP – proteína peridina-clorofila

PerCP-Cy5.5 – proteína peridina-clorofila cianina 5.5

PIG-A – *Phosphatidyl inositol glycan - class A* (Gene fosfatidilinositol glicano - classe A)

r<sub>s</sub> – Correlação de *Spearman*

Síndrome AA-HPN – Síndrome anemia aplásica - hemoglobinúria paroxística noturna

SMD – Síndrome mielodisplásica

SP – sangue periférico

SSC – *Side scatter* (dispersão lateral – parâmetro de complexidade interna ou granulocidade celular)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UL – *Upper left* (quadrante superior esquerdo)

## RESUMO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é definida como uma doença adquirida de células-tronco hematopoiéticas, rara, secundária a alterações genéticas que resultam na deficiência de síntese da molécula glicosilfosfatidilinositol (GPI) e consequente redução de expressão das proteínas de membrana ancoradas a esta molécula. O diagnóstico laboratorial baseia-se na detecção de células sanguíneas deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, por citometria de fluxo. Pequenos clones celulares com fenótipo semelhante ao encontrado na HPN têm sido detectados em pacientes com anemia aplásica (AA) e síndrome mielodisplásica (SMD) e a sua presença tem sido associada à boa resposta ao tratamento imunossupressor. A utilização de técnicas sensíveis que propiciem a detecção de clones HPN pequenos é uma necessidade atual. Os objetivos deste estudo foram padronizar técnica de alta sensibilidade para detecção de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, por citometria de fluxo, no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas/UFMG e pesquisar a presença de clones HPN em pacientes com AA e SMD. Amostras de sangue periférico de 20 pacientes com AA e 30 pacientes com SMD foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais dirigidos aos antígenos CD16, CD24, CD55 e CD59 (neutrófilos); CD14 e CD55 (monócitos); e CD55 e CD59 (hemácias). Utilizou-se ainda aerolisina fluorescente (FLAER) na análise das populações de neutrófilos e monócitos. Marcadores de linhagem celular foram utilizados para seleção das populações de interesse. Foram incluídas amostras de sangue periférico de 20 voluntários adultos, que constituíram o grupo controle. Em 5 (25%) pacientes com AA foram identificadas células com fenótipo HPN, claramente distintas das células normais, nas três populações celulares estudadas. A deficiência de expressão das proteínas ancoradas ao GPI foi detectada por todas as combinações de reagentes incluídas no painel e a proporção de células HPN variou de 0,14 a 94,84% dos eventos analisados. Evidência clínica e laboratorial de hemólise intravascular foi descrita em apenas um paciente, sugerindo evolução de AA para HPN clássica. Células HPN não foram identificadas nas amostras dos pacientes com SMD. Observou-se, contudo, presença de neutrófilos hipogranulares e/ou monócitos imaturos em 53% dos pacientes, determinando sobreposição destas populações no gráfico SSC/CD45. Redução isolada de expressão dos antígenos CD14, CD16 e/ou CD55 nas células imaturas e displásicas foram observados em 50% destas amostras sem, entretanto, caracterizar o clone HPN, considerando os critérios de positividade estabelecidos. Desta forma, foi possível evidenciar as dificuldades técnicas e definir os cuidados necessários para a análise dos pacientes com SMD. Considerando o desempenho do reagente FLAER, observou-se reação intensa em neutrófilos e monócitos, propiciando separação clara e precisa entre células normais e células deficientes em GPI. Houve concordância total entre a marcação com FLAER e a expressão de proteínas ancoradas ao GPI. **CONCLUSÃO:** A análise multiparamétrica por citometria de fluxo apresenta sensibilidade e acurácia na detecção de pequenas proporções de células com fenótipo HPN, sendo adequada para a pesquisa de clones subclínicos em pacientes com AA e SMD. O reagente FLAER apresenta excelente desempenho na detecção de neutrófilos e monócitos com fenótipo HPN, podendo ser incluído em um painel mínimo para a triagem do clone HPN na rotina de um laboratório clínico.

Palavras-chave: hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), FLAER, citometria de fluxo, anemia aplásica (AA), síndrome mielodisplásica (SMD).

## ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare acquired hematopoietic stem cell disorder, caused by genetic alterations that compromises the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and results in deficiency of linked proteins. The laboratory diagnosis is based on the detection of blood cells deficient in GPI-anchored proteins by flow cytometry. Small PNH clones have been detected in patients with aplastic anaemia (AA) and myelodysplastic syndrome (MDS) and their presence has been associated to favorable response to immunosuppressive therapy. The use of sensitive assays for detection of small PNH clones is a current demand. Our goals were to develop a sensitive assay for detection of GPI-anchored proteins deficient cells, by flow cytometry, in the Laboratory Medicine Service of Hospital das Clínicas/UFMG and to investigate the presence of PNH clones in AA and MDS patients. Peripheral blood samples from 20 AA patients and 30 MDS patients were analyzed by flow cytometry using monoclonal antibodies to CD16, CD24, CD55 and CD59 (neutrophils); CD14 and CD55 (monocytes); CD55 and CD59 (erythrocytes). Fluorescent aerolysin (FLAER) was used to analyze neutrophils and monocytes. Lineage markers were used to select the cell populations of interest. The control group was represented by peripheral blood samples of 20 adult volunteers. PNH cells were detected in 5 (25%) AA patients. They were clearly distinct from normal cells in the three analyzed cell populations. The deficient GPI-anchored protein expression was detected by all combinations of reagents used and the proportions of PNH cells varied from 0.14 to 94.84% of the analyzed events. Clinical and laboratory evidence of intravascular hemolysis was present in only one patient, suggesting a case of AA that has evolved to classic PNH. PNH cells were not detected in blood samples of MDS patients. However, hypogranular neutrophils and/or immature monocytes were observed in 53% of the patients resulting in overlap between these two populations on the SSC/CD45 plot. In addition, single decreased expression/loss of CD14, CD16 and/or CD55 was observed on immature and dysplastic cells in 50% of these samples, which however was not interpreted as PNH cells, based on defined clone positivity criteria. Thereby, it was possible to identify the technical challenges and to define the procedures to evaluate samples of MDS patients. Concerning the FLAER performance, neutrophils and monocytes showed bright staining resulting in a clear distinction between normal cells and GPI deficient cells. The results showed total agreement between FLAER staining and GPI-anchored proteins expression. **CONCLUSION:** Multiparameter flow cytometry analysis offers high sensitivity and accuracy in the detection of subclinical PNH clones in the setting of AA and MDS. FLAER shows excellent performance in the detection of PNH neutrophils and monocytes and may be used in a routine laboratory for screening of PNH clones.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), FLAER, flow cytometry, aplastic anaemia (AA), myelodysplastic syndrome (MDS).

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>16</b> |
| 1.1 Hemoglobinúria paroxística noturna  | 16        |
| 1.2 Condições associadas à presença de células com fenótipo HPN   | 21        |
| 1.2.1 <i>Anemia aplásica</i>  | 21        |
| 1.2.2 <i>Síndromes mielodisplásicas</i>   | 26        |
| 1.2.3 <i>Indivíduos saudáveis</i>   | 30        |
| 1.3 Aspectos metodológicos da detecção do clone HPN por citometria de fluxo   | 30        |
| 1.3.1 <i>Reagente de aerolisina fluorescente</i>  | 35        |
| 1.4 Revisão da literatura nacional  | 36        |
| <br>  |           |
| <b>2 OBJETIVOS</b>  | <b>38</b> |
| 2.1 Objetivo geral  | 38        |
| 2.2 Objetivos específicos   | 38        |
| <br>  |           |
| <b>3 POPULAÇÃO E MÉTODOS</b>  | <b>39</b> |
| 3.1 População   | 39        |
| 3.2 Métodos   | 40        |
| 3.2.1 <i>Amostras</i>   | 40        |
| 3.2.2 <i>Ensaio de imunofenotipagem</i>   | 40        |
| 3.2.3 <i>Reagentes utilizados</i>   | 41        |
| 3.2.4 <i>Estratégia de aquisição e análise de dados no citômetro de fluxo</i>   | 42        |
| 3.2.5 <i>Análise estatística</i>  | 42        |
| <br>  |           |
| <b>4 RESULTADOS</b>   | <b>43</b> |
| 4.1 Caracterização da população de estudo   | 43        |
| 4.2 Padronização da metodologia para detecção das células deficientes em proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), por citometria de fluxo | 44        |
| 4.3 Detecção das células com fenótipo HPN   | 54        |
| 4.3.1 <i>Definição dos critérios de positividade do clone HPN</i>   | 54        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.3.2 Estudo comparativo dos protocolos de aquisição de 50.000 eventos e de 100.000 eventos</b>   | <b>57</b> |
| <b>4.3.3 Detecção das células com fenótipo HPN em pacientes com AA</b>   | <b>59</b> |
| <b>4.3.4 Detecção das células com fenótipo HPN em pacientes com SMD</b>  | <b>66</b> |
| <b>4.3.5 Reagente de aerolisina fluorescente (FLAER)</b>   | <b>70</b> |
| <b>4.3.6 Sinopse dos resultados relativos à detecção das células com fenótipo HPN nas amostras dos grupos controle e de pacientes (AA e SMD)</b>   | <b>73</b> |
| <b>4.3.7 Comparação estatística entre as diferentes combinações de reagentes utilizadas para detecção das células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, nas populações de neutrófilos e monócitos</b> | <b>74</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>   | <b>75</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>  | <b>86</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>87</b> |
| <b>ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP</b>   | <b>95</b> |
| <b>ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido</b>   | <b>96</b> |
| <b>ANEXO III – Questionário projeto HPN</b>  | <b>97</b> |
| <b>ANEXO IV – Declaração de aprovação da defesa de dissertação</b>   | <b>98</b> |
| <b>ANEXO V – Ata da defesa de dissertação</b>  | <b>99</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre a hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e doenças medulares adquiridas, como a anemia aplásica (AA) e a síndrome mielodisplásica (SMD), tem sido objeto frequente de estudo. Pequenos clones celulares com fenótipo semelhante ao encontrado na HPN têm sido evidenciados em pacientes com AA e SMD e a sua presença tem mostrado implicações prognósticas e terapêuticas (DUNN *et al.*, 1999; MACIEJEWSKI *et al.*, 2001; MUKHINA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2009).

### 1.1 Hemoglobinúria paroxística noturna

A hemoglobinúria paroxística noturna é definida como uma doença adquirida de células-tronco hematopoiéticas, rara, com incidência estimada em 1,3 novos casos por um milhão de indivíduos por ano (BOROWITZ *et al.*, 2010). É caracterizada clinicamente por hemólise intravascular, falência medular e episódios recorrentes de trombose venosa, muitas vezes acometendo sítios anatômicos incomuns, como veia hepática, veia portal, veias mesentéricas e cerebrais. A doença é causada pela expansão clonal de células-tronco hematopoiéticas que apresentam mutações somáticas do gene fosfatidilinositol glicano - classe A (*phosphatidyl inositol glycan - class A*, *PIG-A*), localizado no cromossomo X, determinando o envolvimento de todas as linhagens celulares sanguíneas. São descritas diferentes mutações, como deleções, inserções e mutações pontuais, ao longo de toda a região codificadora do gene *PIG-A* (RICHARDS *et al.*, 2000; OKAMOTO *et al.*, 2006). A alteração genética resulta na deficiência de síntese da molécula de ancoragem denominada glicosilfosfatidilinositol (GPI), por falha na codificação de uma enzima responsável pela transferência da N-acetilglucosamina ao fosfatidilinositol (BRODSKY, 2006). Como consequência, ocorre deficiência parcial ou absoluta de expressão das proteínas de membrana ancoradas ao GPI (PEFFAULT DE LATOUR *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009). As proteínas ancoradas ao GPI incluem proteínas regulatórias do complemento, como *DAF* (*decay acceleration factor*, CD55) e *MIRL* (*membrane inhibitor of reactive lysis*, CD59), e proteínas de membrana envolvidas em diferentes funções – CD14,

CD16, CD24, CD48, CD58, CD66b, dentre outras (RICHARDS *et al.*, 2000; DWORACKI *et al.*, 2005). Segue TABELA descritiva das proteínas ancoradas ao GPI expressas pelas células hematopoiéticas, suas respectivas funções e distribuição celular - TABELA 1 (OMIM<sup>®</sup> - Online Mendelian Inheritance in Man; QUEIRÓS *et al.*, 2000; RICHARDS *et al.*, 2000; LUZZATTO *et al.*, 2006).

**Tabela 1** – Exemplos de proteínas ancoradas ao GPI expressas pelas células hematopoiéticas

| <b>Antígeno</b> | <b>Função</b>   | <b>Distribuição celular</b>   |
|-----------------|---|---|
| CD14            | Receptor de endotoxina  | Monócitos (expressão forte); granulócitos (expressão parcial e fraca)                 |
| CD16            | Receptor Fc de baixa afinidade (FcγRIII)  | Neutrófilos (ancorado ao GPI); células NK e células T (parcial, formas transmembrana) |
| CD24            | Adesão celular; ativação e diferenciação de linfócitos B  | Neutrófilos e linfócitos B  |
| CD48            | Ativação e adesão celular   | Linfócitos e monócitos  |
| CD52            | Desconhecida  | Linfócitos e monócitos  |
| CD55            | Regulação do complemento (limita a formação das convertases de C3)  | Leucócitos, eritrócitos e plaquetas   |
| CD58            | Molécula ligante de CD2; sinal coestimulatório em respostas imunes  | Leucócitos, eritrócitos e plaquetas (forma ancorada ao GPI e formas transmembrana)    |
| CD59            | Inibe formação do complexo de ataque à membrana e protege as células da lise mediada pelo complemento; sinalizador celular na ativação de células T | Leucócitos, eritrócitos e plaquetas   |
| CD66b           | Adesão e ativação celular   | Neutrófilos   |
| CD87            | Receptor do ativador do plasminogênio tipo-uroquinase   | Monócitos, neutrófilos, células T ativadas e células NK                               |
| CD90            | Ativação de células T; adesão celular   | Células progenitoras e células T (parcial)  |
| CD109           | Desconhecida  | Células T ativadas, plaquetas, megacariócitos e células progenitoras (parcial)        |
| CD157           | Ecto-enzima; suporte ao crescimento de células B; adesão e migração de monócitos e granulócitos   | Células estromais medulares, monócitos e granulócitos                                 |

GPI, glicosilfosfatidilinositol; Células NK, células *natural Killer*.

As células afetadas podem apresentar deficiência parcial (células HPN tipo II) ou completa (células HPN tipo III) dos antígenos citados, dependendo do tipo de mutação do gene *PIG-A*, e podem coexistir com células normais (células HPN tipo I), em um mesmo paciente (PIEDRAS *et al.*, 2000; RICHARDS *et al.*, 2000; MADKAIKAR *et al.*, 2009). A deficiência de expressão das proteínas CD55 e CD59 determina maior sensibilidade dos eritrócitos afetados à lise mediada pelo complemento. As hemácias perdem a capacidade de restringir a ativação da via alternativa do complemento (deficiência de CD55) e de bloquear a formação do complexo de ataque à membrana (deficiência de CD59) (PARKER, 2012).

O termo Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) refere-se à eliminação de hemoglobina na urina, secundária à hemólise intravascular, determinando coloração escura da mesma. A hemólise acontece durante todo o dia, mas a hemoglobinúria é observada principalmente na primeira micção da manhã, em função do aumento da concentração urinária durante a noite (ARRUDA *et al.*, 2010).

As teorias fisiopatológicas mais recentes afirmam que as mutações do gene *PIG-A* são necessárias, mas insuficientes para causar a doença. A hipótese mais aceita é a de que as células que apresentam mutações do gene *PIG-A* somente sofram expansão clonal em um contexto de falência da medula óssea, mediada imunologicamente. Assim, a reação imune mediada por células T parece determinar agressão às células-tronco normais e poupar as células-tronco com fenótipo HPN (RICHARDS *et al.*, 2000; BRODSKY, 2006; LUZZATTO *et al.*, 2006; RICHARDS *et al.*, 2007). O mecanismo associado à vantagem proliferativa das células HPN permanece não elucidado. É suposto que a proteína alvo da agressão imune ou moléculas acessórias envolvidas na reação autoimune sejam ancoradas ao GPI (HILL *et al.*, 2007).

Os ensaios laboratoriais tradicionalmente utilizados para o diagnóstico da HPN – teste de Ham, teste de lise pela sucrose e teste de sensibilidade à lise pelo complemento – demonstram a sensibilidade aumentada dos eritrócitos à hemólise, sob condições padronizadas. Apesar de apresentarem alta especificidade, são pouco sensíveis, não permitem quantificação precisa do clone HPN e, como são baseados na análise de eritrócitos, sofrem interferência de transfusões recentes e episódios hemolíticos (HALL *et al.*, 1996; MOYO *et*

*al.*, 2004; OLTEANU *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2007). Nas últimas duas décadas, a citometria de fluxo tem sido utilizada para avaliar a expressão das proteínas ancoradas ao GPI nas linhagens celulares sanguíneas e, atualmente, é considerada a metodologia de escolha para o rastreamento, diagnóstico e acompanhamento da HPN (PARKER *et al.*, 2005; BOROWITZ *et al.*, 2010). A técnica é considerada altamente sensível e específica, apresentando, como vantagens, a possibilidade de analisar eritrócitos, leucócitos e plaquetas; a capacidade de detectar pequenas populações de células com fenótipo HPN e quantificá-las; e a capacidade de distinguir entre células com deficiência parcial ou total das proteínas ancoradas ao GPI (VAN DER SCHOOT *et al.*, 1990; RICHARDS *et al.*, 2000; PEFFAULT DE LATOUR *et al.*, 2008; MADKAIKAR *et al.*, 2009; BOROWITZ *et al.*, 2010).

Moyo e colaboradores (2004), em análise retrospectiva de 49 pacientes portadores do clone HPN, correlacionaram os achados da citometria de fluxo com o quadro clínico da doença e demonstraram que clones HPN maiores (>60% de granulócitos acometidos) estão associados a maior risco de trombose e demais manifestações clínicas, como hemoglobinúria, dor abdominal, espasmo esofágico e disfunção erétil. Esta associação ocorre em função da maior taxa de hemólise, que tem como consequência a maior liberação de hemoglobina livre plasmática que, por sua vez, apresenta alta afinidade pelo óxido nítrico (NO), determinando depleção tecidual do mesmo. O óxido nítrico promove relaxamento da musculatura lisa e atua na inibição da agregação e adesão plaquetárias. A sua depleção está associada à distonia muscular e, provavelmente, à trombofilia, e explica algumas das manifestações apresentadas pelos pacientes portadores de HPN (PARKER *et al.*, 2005; BRODSKY, 2006; LUZZATTO *et al.*, 2006; HILL *et al.*, 2007; ARRUDA *et al.*, 2010).

O tratamento convencional da HPN clássica é tradicionalmente baseado no suporte clínico e transfusional, tratamento das complicações, e no uso de drogas como corticosteróides e andrógenos que, apesar de não terem seus mecanismos de ação claramente definidos, parecem atuar como inibidores da ativação do sistema complemento (PARKER *et al.*, 2005). Nos últimos anos, uma nova droga tem sido utilizada para os pacientes com evidência clínica de hemólise intravascular e tem demonstrado excelentes resultados no controle

destes pacientes, com melhora dos níveis de hemoglobina, redução das necessidades transfusionais e redução da ocorrência de complicações tromboembólicas. Trata-se do Eculizumab (Alexion Pharmaceuticals, CT, USA), aprovado para uso nos Estados Unidos e Europa em 2007 (BRODSKY, 2008; ROTH *et al.*, 2011; PARKER, 2012). O Eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado, inibidor da fração C5 do complemento, que atua restringindo a formação do complexo de ataque à membrana e, portanto, inibindo a hemólise intravascular (PARKER *et al.*, 2005; RICHARDS *et al.*, 2007; LUZZATTO *et al.*, 2011). Os imunossupressores (globulina antitímócito e ciclosporina-A) são recomendados, como principal modalidade de tratamento, para os pacientes que apresentam predominantemente manifestações de falência medular - síndrome AA-HPN (síndrome anemia aplásica - hemoglobinúria paroxística noturna) ou HPN hipoplásica, descrita a seguir (PEFFAULT DE LATOUR *et al.*, 2008). O transplante de células tronco hematopoiéticas representa a única possibilidade de tratamento potencialmente curativo, estando indicado aos pacientes com maior índice de complicações da doença (anemia hemolítica refratária e doença tromboembólica recorrente) ou falência de medula óssea, sendo limitado àqueles que apresentam condições clínicas de se submeterem ao procedimento e doador HLA-compatível (PARKER *et al.*, 2005; RICHARDS *et al.*, 2007; BRODSKY, 2009).

O encontro de células com fenótipo HPN tem sido descrito em associação a outras doenças medulares, como AA, SMD e síndromes mieloproliferativas e linfoproliferativas (DWORACKI *et al.*, 2005). Um esquema de classificação proposto pelo *International PNH Interest Group*, descrito por Parker e colaboradores (2005), define que pacientes que apresentam evidência clínica e laboratorial de hemólise intravascular e/ou tendência trombótica, e não apresentam evidências de outra desordem medular de base, são portadores de “*HPN clássica*”. Estes pacientes habitualmente apresentam maior percentual de células HPN, como anteriormente descrito. Os pacientes que apresentam evidência clínica e laboratorial de hemólise associada a uma desordem medular primária são classificados como portadores de “*HPN na vigência de outra desordem medular especificada*”, estando incluídos, neste grupo, os pacientes categorizados como portadores da Síndrome AA-HPN. Os casos que não exibem evidência clínica e laboratorial de hemólise intravascular são

classificados como portadores de “HPN subclínica” e, habitualmente, apresentam pequenas populações de células sanguíneas deficientes em proteínas ancoradas ao GPI (PARKER *et al.*, 2005; MADKAIKAR *et al.*, 2009; SUGIMORI *et al.*, 2009). Nesta categoria se enquadram grande parte dos pacientes portadores de AA e SMD, nos quais é possível identificar a presença das células com fenótipo HPN, habitualmente presentes em percentuais inferiores a 10% do total de células analisadas (PARKER *et al.*, 2005). Pu e colaboradores (2011) monitorizaram 27 pacientes portadores de AA com clone HPN detectável, por um período de 5 anos, e encontraram relação linear entre o tamanho do clone e o desenvolvimento de hemólise intravascular, definindo os limites de 3 a 5% de eritrócitos HPN e 23% de granulócitos HPN como preditores de hemólise.

## **1.2 Condições associadas à presença de células com fenótipo HPN**

### **1.2.1 Anemia aplásica**

A anemia aplásica é uma doença rara, com incidência em torno de 2 novos casos por 1 milhão de indivíduos por ano, nos países ocidentais (YOUNG *et al.*, 2006). É definida como pancitopenia associada a medula óssea hipocelular, na ausência de infiltrado anormal (MARSH *et al.*, 2009). É considerada doença imunomediada, com destruição ativa das células-tronco hematopoiéticas por linfócitos T autorreativos (ARRUDA *et al.*, 2010). A maioria dos casos (70-80%) apresenta etiologia desconhecida, sendo estes caracterizados como idiopáticos. Em alguns pacientes, podem ser identificados fatores precipitantes da falência da medula óssea, como medicamentos, agentes químicos ou infecções. A doença apresenta dois picos de incidência - 10 a 25 anos e maiores de 60 anos. Os pacientes geralmente se apresentam com sinais e sintomas de anemia, hemorragia de pele ou mucosa e distúrbios visuais secundários a hemorragia de retina (MARSH *et al.*, 2009). O hemograma revela pancitopenia ou citopenia isolada, particularmente trombocitopenia, acompanhados de anisocitose, poiquilocitose e reticulocitopenia. O diagnóstico requer a presença de dois dos seguintes achados em sangue periférico: hemoglobina inferior a 10mg/dL, contagem de

plaquetas inferior a  $50.000\text{cel}/\text{mm}^3$  e/ou contagem de neutrófilos inferior a  $1.500\text{cel}/\text{mm}^3$  (*International Agranulocytosis and Aplastic Anaemia Study Group*, 1987). A confirmação do diagnóstico requer a realização de mielograma e biópsia de medula óssea. Ao mielograma, é observada medula óssea hipocelular, com redução das séries eritrocítica, granulocítica e megacariocítica. Diseritropoiese constitui achado comum, entretanto não são esperados megacariócitos e granulócitos displásicos. A biópsia da medula óssea é essencial para confirmar a hipocelularidade medular, avaliar a morfologia das células residuais e excluir a presença de infiltrado anormal. Recomenda-se ainda a análise citogenética da medula óssea, sendo que clones citogenéticos anormais estão presentes em até 12% dos pacientes (MARSH *et al.*, 2009). A gravidade da doença é avaliada por parâmetros de contagem de células no sangue periférico e medula óssea. AA grave é definida por celularidade medular inferior a 25%, associada a pelo menos dois dos seguintes parâmetros em sangue periférico: contagem de neutrófilos inferior a  $500\text{cel}/\text{mm}^3$ , contagem de plaquetas inferior a  $20.000\text{cel}/\text{mm}^3$  e contagem corrigida de reticulócitos inferior a 1%; AA muito grave é caracterizada pelos critérios acima, mas com contagem de neutrófilos inferior a  $200\text{cel}/\text{mm}^3$ ; AA não grave é definida por medula óssea hipocelular, com pancitopenia, sem preencher os critérios acima (MARSH *et al.*, 2009; PU *et al.*, 2011).

O tratamento da AA não grave é baseado no suporte clínico e transfusional, estando indicado o uso de medicamentos imunossupressores (globulina antitimócito e ciclosporina A, isoladamente ou em combinação) pelos pacientes dependentes de transfusões sanguíneas ou por aqueles que evoluem com neutropenia significativa. Os pacientes com AA grave ou muito grave devem receber o tratamento de suporte acrescido do tratamento específico, que inclui o transplante de células-tronco hematopoiéticas, considerado de escolha, ou os medicamentos imunossupressores. A definição do tratamento para este grupo de pacientes é baseada na idade, avaliação da elegibilidade ao transplante e existência de doador HLA-compatível (SUGIMORI *et al.*, 2006; MARSH *et al.*, 2009). O transplante alogênico, com doador aparentado compatível, cura a grande maioria dos pacientes. Entretanto, o tratamento imunossupressor é mais amplamente usado, devido à presença de fatores limitantes ao transplante, como ausência de doadores

compatíveis, idade avançada do paciente e o alto custo do procedimento (YOUNG *et al.*, 2006). A taxa de resposta à imunossupressão está em torno de 60%, em diferentes populações, após 3 a 6 meses de tratamento, sendo a idade jovem um importante preditor de melhor resposta. Cerca de 30 a 40% dos pacientes inicialmente respondedores sofrem recaída, muitas vezes demandando o uso contínuo de imunossupressores (YOUNG *et al.*, 2006).

Diferentes estudos demonstraram a presença do clone HPN em pacientes portadores de AA, através da análise imunofenotípica por citometria de fluxo. A prevalência deste achado nas populações estudadas é variável (22 a 68% dos pacientes), em função da sensibilidade do teste e dos critérios de positividade do clone HPN (DUNN *et al.*, 1999; MACIEJEWSKI *et al.*, 2001; MUKHINA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001; ISHIYAMA *et al.*, 2003; SUGIMORI *et al.*, 2006; SUGIMORI *et al.*, 2009; SCHEINBERG *et al.*, 2010). Acredita-se que a expansão do clone HPN em portadores de AA esteja relacionada à eventual reação autoimune, determinando falência da hematopoiese normal e seleção das células com fenótipo HPN, sendo estas poupadas da agressão pelas células T citotóxicas. Assim, as mutações do gene *PIG-A*, isoladamente, parecem não serem suficientes para o desenvolvimento da doença nos portadores de AA, sendo necessária a associação com o mecanismo supressor da hematopoiese normal, mediado imunologicamente (ARATEN *et al.*, 1999; RICHARDS *et al.*, 2000; OKAMOTO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001). É importante ressaltar que a HPN clássica frequentemente ocorre durante o curso clínico da AA (PU *et al.*, 2011). Dados publicados por Peffault de Latour e colaboradores (2008), envolvendo 460 pacientes com diagnóstico de HPN, revelaram que 23% destes apresentavam história prévia de AA.

A maioria dos pacientes portadores de AA associada ao clone HPN apresenta percentuais pequenos a moderados de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, na ausência de hemólise (YOUNG *et al.*, 2006; BRODSKY, 2008; MARSH *et al.*, 2009). Maciejewski e colaboradores (2001) encontraram média de 7,9% de granulócitos deficientes em proteínas ancoradas ao GPI em 93 pacientes com diagnóstico de AA. Moyo e colaboradores (2004), em uma série de 44 pacientes com AA, encontraram tamanho médio do clone HPN de 16,8%, comparado com 91,6% de granulócitos acometidos em pacientes com HPN clássica. Sugimori e

colaboradores (2006) identificaram granulócitos com fenótipo HPN em 83 de 122 pacientes com diagnóstico de AA, em proporções variáveis de 0,003 a 23,1% das células analisadas. Scheinberg e colaboradores (2010) identificaram o clone HPN em 83 de 207 pacientes com AA recém-diagnosticada, com proporção média de 9,7% de células acometidas. Entretanto, o significado clínico de um clone HPN pequeno em portadores de AA, detectado por citometria de fluxo, permanece incerto. Estes clones podem permanecer estáveis, aumentar ou diminuir de tamanho ou mesmo desaparecer (MARSH *et al.*, 2009; SUGIMORI *et al.*, 2009; PU *et al.*, 2011).

Estudos prévios, como o de Frickhofen e colaboradores (2003), sugeriram que o tratamento imunossupressor da AA poderia resultar em expansão das células HPN, o que não foi confirmado por estudos mais recentes, envolvendo número significativo de pacientes. Dunn e colaboradores (1999) estudaram 115 pacientes portadores de AA e não observaram diferença estatística entre as proporções de pacientes com clone HPN dentre os grupos pré e pós-tratamento. Neste mesmo estudo, um grupo formado por usuários de imunossupressores, por causas diversas, não apresentou células com fenótipo HPN detectáveis. Wang e colaboradores (2001) estudaram 100 pacientes com diagnóstico de AA e observaram que a frequência de células HPN em pacientes recém-diagnosticados, virgens de tratamento, foi maior (88,6%) do que em pacientes tratados com imunossupressores – 68,6% dos pacientes com menos de 5 anos de doença e 20,4% dos pacientes com mais de 5 anos de doença. Maciejewski e colaboradores (2001) evidenciaram ausência de diferença estatística entre a proporção de pacientes com clone HPN no momento da apresentação da AA, no decorrer dos primeiros 1 a 4 anos de doença e após 4 anos do diagnóstico e, ainda, não observaram padrão consistente de alteração do tamanho do clone HPN após imunossupressão. Sugimori e colaboradores (2009) monitorizaram o tamanho dos clones HPN detectados em 40 pacientes com diagnóstico de AA, que haviam iniciado tratamento imunossupressor, e compararam os grupos de respondedores (35 pacientes), não respondedores (5 pacientes) e um terceiro grupo formado por 35 pacientes não tratados, e não observaram diferença estatística entre os grupos, quanto à expansão, persistência ou desaparecimento do clone. Scheinberg e colaboradores (2010) monitorizaram 124 pacientes em

tratamento imunossupressor da AA, sem evidência do clone HPN na fase pré-tratamento, e observaram que o aparecimento das células HPN no período pós-tratamento foi incomum e ocorreu de forma igualitária dentre os respondedores e os não respondedores à imunossupressão. Assim, não há indícios de que o tratamento imunossupressor faça emergir o clone HPN; parece ser o próprio mecanismo fisiopatológico da AA (agressão autoimune), o fator envolvido na expansão do clone, principalmente na fase inicial da doença (LUZZATTO *et al.*, 2011). A expansão ou involução do clone nos anos subsequentes parece depender da capacidade proliferativa da célula tronco hematopoiética geneticamente alterada (SUGIMORI *et al.*, 2009).

Por outro lado, diversos autores estabeleceram associação positiva entre a presença de células HPN em pacientes com AA e melhor resposta ao tratamento imunossupressor. Sugimori e colaboradores (2006) avaliaram 122 pacientes com diagnóstico recente de AA e concluíram que a presença de células com fenótipo HPN prediz boa resposta ao tratamento imunossupressor e prognóstico favorável, mesmo quando presentes em pequenas proporções (resposta terapêutica semelhante na presença de proporções variáveis - 0,003 a 23,1% - de granulócitos acometidos). Outros autores encontraram resultados similares, ao observarem maior proporção de pacientes respondedores à imunossupressão dentre aqueles portadores do clone HPN (WANG *et al.*, 2001; MACIEJEWSKI *et al.*, 2001; ISHIYAMA *et al.*, 2003). A melhor resposta ao tratamento imunossupressor em portadores do clone HPN favorece a hipótese de mecanismos imunológicos envolvidos no processo de falência da medula óssea (ISHIYAMA *et al.*, 2003). Assim, o clone HPN pode ser considerado marcador da fisiopatologia imune da falência medular, mesmo quando estas células estão presentes em pequenas proporções, podendo então predizer a resposta ao tratamento imunossupressor (SUGIMORI *et al.*, 2006). Segundo alguns autores, a pesquisa do clone HPN, neste grupo de pacientes, pode auxiliar na definição do tratamento mais adequado a ser instituído inicialmente - transplante de células-tronco hematopoiéticas ou tratamento imunossupressor (ISHIYAMA *et al.*, 2003; SUGIMORI *et al.*, 2006). Contrariamente a estes achados, Scheinberg e colaboradores (2010), em um estudo envolvendo 207 pacientes com AA grave, não observaram diferença estatística nas taxas de resposta ao tratamento imunossupressor, entre

pacientes que apresentavam ou não o clone HPN. Em publicação anterior, Scheinberg e colaboradores (2008) já haviam questionado a associação entre a presença do clone HPN e a melhor resposta à imunossupressão. A razão para esta discrepância pode estar relacionada a diferenças metodológicas na determinação da presença das células com fenótipo HPN, segundo colocação do próprio autor.

### **1.2.2 Síndromes mielodisplásicas**

As síndromes mielodisplásicas constituem um grupo heterogêneo de desordens clonais de células-tronco hematopoiéticas, que acometem predominantemente indivíduos idosos, com idade média de 70 anos. Na população geral, ocorre em incidência aproximada de 5 casos por 100.000 indivíduos ao ano; entre indivíduos acima de 70 anos, a incidência aumenta para 22 a 45 casos por 100.000 indivíduos ao ano (GREENBERG *et al.*, 2012).

As SMD são caracterizadas por citopenia(s) periférica(s), displasias de uma ou mais linhagens de células mielóides, medula óssea habitualmente hipercelular ou normocelular, hematopoiese ineficaz e risco aumentado de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA) (BOWEN, 2003; OGATA *et al.*, 2009). A falência medular é secundária à hematopoiese ineficaz, por sua vez resultante de apoptose aumentada (BOWEN, 2003). Os pontos de corte para caracterização das citopenias, recomendados pelo *International Prognostic Scoring System* (IPSS), são: hemoglobina <10g/dL, contagem de neutrófilos <1.800cel/mm<sup>3</sup> e plaquetas <100.000cel/mm<sup>3</sup> (GREENBERG *et al.*, 1997; SWERDLOW *et al.*, 2008). As alterações displásicas devem estar presentes em pelo menos 10% das células de uma ou mais linhagens mielóides e podem ser acompanhadas por aumento de mieloblastos no sangue periférico (SP) e medula óssea (MO), quantificados em percentual inferior a 20% na MO, acima do qual é caracterizado o diagnóstico de LMA. A maioria dos pacientes apresenta sintomas relacionados à(s) citopenia(s), sendo muitos deles anêmicos e dependentes de transfusões sanguíneas (SWERDLOW *et al.*, 2008).

O diagnóstico e a classificação das síndromes mielodisplásicas são baseados no exame morfológico das células do SP e MO, objetivando

caracterizar as displasias celulares, a presença de sideroblastos em anel e o percentual de blastos. Algumas anormalidades citogenéticas clonais, como -Y, -5, del(5q), del(20q), +8, -7 ou del(7q), dentre outras, são associadas à doença e são observadas em aproximadamente 50% dos casos (SWERDLOW *et al.*, 2008). Assim, a avaliação laboratorial da SMD inclui a realização do hemograma, mielograma, análise citogenética e biópsia de medula óssea (BOWEN, 2003).

A classificação mais adotada atualmente, proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2008, é baseada em contagens celulares sanguíneas, medulares, morfologia e análise citogenética da MO (SWERDLOW *et al.*, 2008). São propostos os seguintes subtipos de SMD: 1- citopenia refratária com displasia de uma linhagem (CRDU) - anemia refratária, neutropenia refratária ou trombocitopenia refratária; 2- anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA); 3- citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM); 4- citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens e sideroblastos em anel; 5- anemia refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1); 6- anemia refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2); 7- SMD associada a del(5q) isolada; 8- SMD não classificada (SMD-U). Os subtipos morfológicos podem ser categorizados em 3 grupos de risco, considerando o tempo de sobrevida e evolução para LMA. Os grupos de baixo risco são CRDU e ARSA; os grupos de risco intermediários são CRDM, com ou sem sideroblastos em anel, e AREB-1; pacientes com AREB-2 constituem o grupo de alto risco. A “síndrome de deleção isolada do 5q” é associada a bom prognóstico e baixa taxa de transformação para leucemia aguda (GREENBERG *et al.*, 1997; BOWEN, 2003). Um sistema de classificação prognóstica baseado no percentual de blastos na medula óssea, tipo de anormalidade citogenética e número de citopenias foi proposto pelo *International Myelodysplastic Syndrome Working Group*. O sistema de score é denominado *International Prognostic Scoring System* (IPSS). Com base nas variáveis prognósticas e no sistema de pontuação descritos na TABELA 2, são reconhecidos quatro grupos de risco: baixo (0), intermediário-1 (0,5-1,0), intermediário-2 (1,5-2,0) e alto ( $\geq 2,5$ ) (GREENBERG *et al.*, 1997; BOWEN, 2003; SWERDLOW *et al.*, 2008). De maneira geral, grupos de alto risco apresentam menor sobrevida e maior taxa

de evolução para LMA, e são relacionados a maior porcentagem de blastos na MO, achados citogenéticos não favoráveis e citopenias mais graves.

**Tabela 2** – *International Prognostic Scoring System (IPSS)* para síndromes mielodisplásicas

|              | Escore |               |      |        |         |
|--------------|--------|---------------|------|--------|---------|
|              | 0      | 0,5           | 1,0  | 1,5    | 2       |
| % blastos MO | < 5%   | 5-10%         |      | 11-19% | 20-30%* |
| Cariótipo    | Bom    | Intermediário | Ruim |        |         |
| Citopenias   | 0-1    | 2-3           |      |        |         |

MO, medula óssea

\*Este grupo é reconhecido como leucemia mielóide aguda pela classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)

\*\*Cariótipo: Bom = normal, -Y, del(5q), del(20q); Ruim = complexo ( $\geq 3$  anormalidades) ou anomalias do cromossomo 7; Intermediário = outras anormalidades

\*\*\*Citopenias: Hemoglobina <10g/dL; Neutrófilos <1.800 cel/mm<sup>3</sup>; Plaquetas <100.000 cel/mm<sup>3</sup>

A definição do tratamento da SMD é baseada em determinados critérios, como idade, condição clínica do paciente, classificação prognóstica da doença e anormalidades citogenéticas associadas. O tratamento da doença de baixo risco (IPSS baixo ou intermediário-1) inclui: 1) suporte clínico e transfusional; 2) uso de fatores de crescimento, como a eritropoetina e fator estimulador de crescimento de granulócitos (G-CSF), para aqueles com níveis séricos relativamente baixos de eritropoetina; 3) drogas como lenalidomida e análogos, particularmente úteis para pacientes com síndrome de deleção do 5q, com necessidade transfusional; 4) medicamentos imunossupressores, especialmente para aqueles com maior probabilidade de resposta (idade inferior a 60 anos, hipocelularidade medular e marcadores de resposta – HLA-DR15 ou clone HPN) e 5) terapia de quelação do ferro, quando indicado. Para os pacientes de alto risco (IPSS intermediário-2 ou alto), estão indicados agentes hipometilantes, quimioterápicos ou transplante de células-tronco hematopoiéticas, para os casos elegíveis (ISHIKAWA *et al.*, 2007; GREENBERG, 2010; GREENBERG *et al.*, 2012).

Estudos conduzidos em pacientes com SMD têm evidenciado a presença das células tipo HPN na doença de baixo risco, especialmente na anemia refratária, com frequência aproximada entre 8 e 34% dos pacientes (IWANAGA *et al.*, 1998; DUNN *et al.*, 1999; MACIEJEWSKI *et al.*, 2001;

OKAMOTO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; ISHIYAMA *et al.*, 2003; SUGIMORI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009). Os clones HPN são habitualmente menores, se comparados aos encontrados nos pacientes portadores de HPN clássica ou AA, com proporção de células inferior a 1% dos eventos analisados em grande parte dos casos (WANG *et al.*, 2002; SUGIMORI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009). Os estudos citados utilizaram testes com diferentes padronizações metodológicas e diferentes limites de sensibilidade analítica e, portanto, somente aqueles que utilizaram técnicas mais sensíveis foram capazes de detectar os clones subclínicos menores que 1%. Células com fenótipo HPN não têm sido habitualmente demonstradas na síndrome mielodisplásica de alto risco (WANG *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2009; SUGIMORI *et al.*, 2009; PARKER, 2012). Contrariamente a estes achados, Kaiafa e colaboradores (2008), em estudo que envolveu 90 pacientes com diagnóstico de SMD, relataram maior frequência do clone HPN na doença de alto risco, sem, entretanto, descrever a técnica utilizada, no que se refere às estratégias de análise ou critérios para definição do ponto de corte.

Okamoto e colaboradores (2001) demonstraram associação do clone HPN, em portadores de SMD, com anormalidades imunológicas, fortalecendo a hipótese de que a expansão do clone HPN, nestes pacientes, é favorecida pela disfunção imune, assim como ocorre na AA. Na SMD, a presença de células com fenótipo HPN foi fortemente correlacionada com boa resposta ao tratamento imunossupressor, em alguns estudos (DUNN *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002; ISHIKAWA *et al.*, 2007), reforçando a teoria do envolvimento de mecanismos imunológicos na fisiopatologia da doença. Pacientes com anemia refratária HPN positivos apresentaram características clínicas distintas em relação aos pacientes HPN negativos em estudo conduzido por Wang e colaboradores (2002), como anormalidades morfológicas de células sanguíneas menos pronunciadas, trombocitopenia mais grave, menores taxas de anormalidades citogenéticas e menor índice de progressão para leucemia aguda.

### **1.2.3 Indivíduos saudáveis**

A pesquisa de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI foi realizada em indivíduos saudáveis por Araten e colaboradores (1999), tendo sido evidenciado pequeno número de células com fenótipo HPN e anormalidades do gene *PIG-A* na frequência média de 0,0022% das células analisadas. Resultados semelhantes foram demonstrados por Wang e colaboradores (2001), ao identificarem granulócitos tipo HPN em 18 de 68 indivíduos normais, com frequência inferior a 0,003% das células. Estes clones são habitualmente transitórios e estudos envolvendo análise genética revelaram que estas mutações não são clonais, sugerindo que provavelmente ocorrem em células formadoras de colônia e não em células-tronco hematopoiéticas (BOROWITZ *et al.*, 2010).

### **1.3 Aspectos metodológicos da detecção do clone HPN por citometria de fluxo**

A imunofenotipagem de células sanguíneas por citometria de fluxo é considerada, hoje, o método de escolha para detecção e quantificação das populações celulares deficientes em proteínas ancoradas ao GPI (VAN DER SCHOOT *et al.*, 1990; HALL *et al.*, 1996; PARKER *et al.*, 2005; RICHARDS *et al.*, 2007; BOROWITZ *et al.*, 2010; KRAUSS, 2012). O teste está indicado para pacientes com suspeita clínica de HPN clássica (diagnóstico e acompanhamento), pacientes com AA (ao diagnóstico e anualmente, mesmo na ausência de hemólise intravascular) e pacientes com diagnóstico de citopenia refratária com displasia de uma linhagem da SMD (ao diagnóstico e anualmente, mesmo na ausência de hemólise intravascular). A pesquisa do clone HPN não é recomendada, rotineiramente, para os pacientes portadores de outras formas de SMD ou doenças mieloproliferativas, sem evidência de hemólise intravascular (PARKER *et al.*, 2005; BOROWITZ *et al.*, 2010). A monitorização do clone HPN em hemácias tem sido indicada para o acompanhamento dos pacientes em uso do Eculizumab. Pacientes que respondem ao tratamento, reduzindo a taxa de hemólise intravascular, evoluem com aumento da proporção de hemácias HPN, em relação ao período pré-

tratamento, reduzindo a desproporção entre o tamanho do clone em eritrócitos e leucócitos (HILL *et al.*, 2007).

Entretanto, ainda não existe consenso em relação à melhor abordagem metodológica, principalmente no que se refere à seleção dos anticorpos monoclonais a serem usados e à definição dos critérios de positividade do clone HPN (RICHARDS *et al.*, 2007). Existem anticorpos monoclonais disponíveis contra várias proteínas ancoradas ao GPI, com capacidades distintas de detecção das células com fenótipo HPN, em função da expressão variável destes antígenos nas diferentes populações celulares e nos diferentes estágios de maturação das células (HERNÁNDEZ-CAMPO *et al.*, 2006; MADKAIKAR *et al.*, 2009). Existem ainda variações metodológicas no que se refere ao processamento da amostra, escolha das populações celulares a serem estudadas e “estratégias de *gating*” para análise precisa (MADKAIKAR *et al.*, 2009; BATTIWALLA *et al.*, 2010).

Os anticorpos anti-CD55 e anti-CD59 foram os reagentes inicialmente utilizados, e ainda o são de forma ampla, nos ensaios de citometria de fluxo para detecção do clone HPN, em função do seu papel, já conhecido, na fisiopatologia da doença. Assim, diversos estudos foram baseados na avaliação da expressão destes dois antígenos em hemácias e/ou leucócitos, utilizando diferentes protocolos para processamento das amostras (OKAMOTO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; ISHIYAMA *et al.*, 2003; SUGIMORI *et al.*, 2009). São descritas e utilizadas duas técnicas distintas para o preparo das amostras para análise da expressão de CD55 e CD59 em granulócitos: 1- lise das hemácias antecedendo a marcação dos granulócitos (técnica lisar-lavar-corar); 2- marcação dos granulócitos, seguida de lise das hemácias (técnica corar-lisar-lavar). As considerações que envolvem a escolha entre os dois métodos recaem sobre o fato de que estes marcadores são expressos nas diferentes linhagens celulares e, assim, o grande número de hemácias na amostra não previamente lisada pode representar um potencial interferente na marcação dos leucócitos. (HERNÁNDEZ-CAMPO *et al.*, 2002; MADKAIKAR *et al.*, 2009). Por outro lado, as características físicas das células, úteis para seleção das diferentes populações, são geralmente melhor preservadas com o procedimento de corar-lisar-lavar (BOROWITZ *et al.*, 2010).

Assim, ambos os métodos de processamento da amostra podem alcançar resultados satisfatórios, desde que adequadamente padronizados.

Com o avançar dos conhecimentos, anticorpos monoclonais dirigidos a outros antígenos ancorados ao GPI passaram a ser incorporados aos painéis de análise e, em alguns estudos, mostraram-se superiores em performance na detecção do clone HPN. Wang e colaboradores (2009) detectaram o clone HPN subclínico em 9 pacientes com SMD, dentre 110 analisados, e observaram maior proporção média de granulócitos HPN caracterizados pela deficiência simultânea de CD16 e CD66b (0,64%) em relação a granulócitos deficientes em expressão dos antígenos CD55 e CD59 (0,19%). Outros reagentes disponíveis para uso comercial, que entraram na composição de diferentes painéis de análise nos diversos estudos, são o anti-CD24 para avaliação dos granulócitos, o anti-CD14 para avaliação dos monócitos e o reagente de aerolisina fluorescente (FLAER), descrito na sessão 1.3.1 (VAN DER SCHOOT *et al.*, 1990; BRODSKY *et al.*, 2000; MUKHINA *et al.*, 2001; HERNÁNDEZ-CAMPO *et al.*, 2006; SUTHERLAND *et al.*, 2007; BATTIWALLA *et al.*, 2010).

Outro ponto de divergência metodológica entre os ensaios é o limite inferior de sensibilidade analítica, utilizado para definição da presença do clone HPN. Os critérios para definição do ponto de corte são variáveis e habitualmente baseados na “*taxa de background*” encontrada na análise de amostras de indivíduos normais. Ao utilizar estratégias rigorosas para a seleção das populações celulares a serem estudadas, como a combinação de parâmetros físicos e marcadores de linhagens celulares, e proceder à aquisição de um grande número de eventos, alguns autores alcançaram limites inferiores de detecção do clone HPN tão baixos quanto 0,003% de granulócitos e 0,005% de hemácias acometidos (WANG *et al.*, 2001; ISHIYAMA *et al.*, 2003; SUGIMORI *et al.*, 2009). Condizente com o ganho em sensibilidade, estes estudos demonstraram maior frequência de detecção do clone HPN subclínico nos pacientes com AA ou SMD, se comparados aos trabalhos que utilizaram pontos de corte mais elevados, detectando células HPN em proporções superiores a 1% do total de eventos analisados (DUNN *et al.*, 1999). Contrariamente à tendência atual de análise multiparamétrica, alguns estudos utilizaram ensaios que avaliaram a expressão dos antígenos ancorados ao GPI

individualmente e não utilizaram marcadores de linhagem para seleção das populações celulares (PIEDRAS *et al.*, 2000; WANACHIWANAWIN *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2009), o que acarreta um risco já descrito de inclusão de outros eventos, como *debris* e células de outras linhagens, no *gate* selecionado para análise e possível superestimativa do percentual de células HPN (RICHARDS *et al.*, 2000).

Diante da heterogeneidade de procedimentos anteriormente descrita, algumas recomendações e princípios gerais foram recentemente estabelecidos em documento desenvolvido pela *Clinical Cytometry Society* e publicado por Borowitz e colaboradores (2010), a partir de dados disponíveis na literatura e da experiência prática dos autores envolvidos. Os ensaios de rotina foram definidos como tendo sensibilidade de detecção de 1% de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, sendo úteis na triagem da HPN clássica e na pesquisa de clones celulares menores, encontrados nos pacientes com HPN subclínica. Ensaios de alta sensibilidade foram definidos como aqueles capazes de detectar clones tão pequenos quanto 0,01% das células, sendo que a experiência com esta metodologia é menor. Este nível de sensibilidade não é necessário para o rastreamento e diagnóstico da HPN clássica, mas é recomendado para detecção dos clones HPN pequenos, subclínicos, associados à AA e SMD (RICHARDS *et al.*, 2007). Sangue periférico colhido em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) constitui a amostra preferida para análise. Os protocolos devem incluir análise de eritrócitos e leucócitos. Amostras colhidas em EDTA permanecem estáveis para análise de hemácias por até 48 horas após a coleta, havendo relatos de estabilidade de amostras refrigeradas por períodos maiores; para a análise de leucócitos, é recomendado o processamento da amostra nas primeiras horas após a coleta, sendo tolerado o armazenamento por 24 a 48 horas (MADKAIKAR *et al.*, 2009; BOROWITZ *et al.*, 2010).

A análise de eritrócitos é indicada para distinção e quantificação das células que apresentam deficiência parcial ou total das proteínas ancoradas ao GPI (células tipo II e III) daquelas que apresentam expressão antigênica normal (células tipo I). Entretanto não deve ser realizada de maneira isolada, pois está sujeita a resultados falso-negativos, associados a episódios hemolíticos ou transfusões sanguíneas recentes (BRODSKY, 2008). É recomendado que a

análise de hemácias seja feita antes do paciente receber hemotransfusões ou após intervalo mínimo de 1 mês (PARKER *et al.*, 2005). É preconizado o estudo da expressão dos antígenos CD55 e CD59 nesta população celular, devendo ser caracterizada a deficiência simultânea de ambos os marcadores para definição do clone HPN, com o objetivo de afastar a possibilidade rara de deficiência congênita de um dos marcadores, individualmente (MADKAIKAR *et al.*, 2009).

A análise de leucócitos, especialmente granulócitos e monócitos, permite avaliação mais precisa do tamanho do clone, já que o tempo de meia-vida dessas células não é afetado pela doença e transfusões sanguíneas não determinam interferência analítica (PIEDRAS *et al.*, 2000; MADKAIKAR *et al.*, 2009). A análise de linfócitos não é recomendada devido ao longo tempo de meia-vida das células B e T residuais normais, geradas antes do início da doença, e à expressão variável das proteínas ancoradas ao GPI nas células T normais (HALL *et al.*, 1996; RICHARDS *et al.*, 2000; BOROWITZ *et al.*, 2010).

Os marcadores CD55, CD59, CD16, CD24 e CD66b têm se mostrado úteis na análise de granulócitos. Para a identificação de monócitos HPN, podem ser utilizados os marcadores CD14, CD55 e CD59, entretanto deve ser considerada a menor expressão de CD59 nestas células (HERNÁNDEZ-CAMPO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2009; BOROWITZ *et al.*, 2010). Idealmente, devem ser realizadas análises de pelo menos duas proteínas ancoradas ao GPI em duas linhagens celulares distintas, para excluir a possibilidade de resultados falso-positivos, decorrentes de deficiências congênitas isoladas das proteínas e possíveis problemas técnicos (RICHARDS *et al.*, 2000; PARKER *et al.*, 2005; BRODSKY, 2008; BOROWITZ *et al.*, 2010).

A análise imunofenotípica em pacientes com SMD requer a adoção de critérios rigorosos para definição do clone HPN, em função da hipogranulação dos neutrófilos; da expressão por vezes alterada do CD45 e dos marcadores de linhagem celular, dificultando a separação precisa das diferentes populações; e da expressão reduzida de proteínas ancoradas ao GPI em células displásicas e imaturas, principalmente CD16 e CD55, em granulócitos, e CD14 e CD55, em monócitos. Estas anormalidades imunofenotípicas são intrínsecas à doença e podem trazer dificuldades técnicas, comprometendo a

acurácia da pesquisa do clone HPN nestes pacientes (WANG *et al.*, 2009; BOROWITZ *et al.*, 2010).

A análise de plaquetas tem mostrado imprecisão na distinção das populações normais e deficientes em proteínas ancoradas ao GPI. Não foram estabelecidas a utilidade diagnóstica, relevância clínica e padronização metodológica para a análise desta população (HALL *et al.*, 1996; RICHARDS *et al.*, 2000; MADKAIKAR *et al.*, 2009).

### **1.3.1 Reagente de aerolisina fluorescente**

O FLAER (*Fluorescent Aerolysin* - Pinewood Scientific Services, Victoria, BC, Canada) é um reagente de aerolisina fluorescente recentemente desenvolvido, que tem apresentado uso crescente no ensaio de citometria de fluxo para detecção do clone HPN (MADKAIKAR *et al.*, 2009). A aerolisina é o principal fator de virulência da bactéria *Aeromonas hydrophila*. É secretada como uma pró-toxina, proaerolisina, que se liga de maneira seletiva e com alta afinidade à porção glicana da âncora GPI, o que determina ativação da toxina, com conseqüente formação de canais de membrana e morte celular (BRODSKY *et al.*, 2000; BRODSKY, 2008). As células HPN verdadeiras são resistentes à lise pela aerolisina por não apresentarem a molécula do GPI (WANG *et al.*, 2009). O FLAER é uma variante da proaerolisina marcada com o fluorocromo Alexa Fluor 488, que apresenta propriedades fluorescentes similares aos anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (MOYO *et al.*, 2004). Encontra-se atualmente disponível em formulação líquida, com estabilidade e exigências de armazenamento semelhantes aos anticorpos monoclonais típicos (BOROWITZ *et al.*, 2010). A proaerolisina modificada geneticamente mantém a propriedade de ligação à molécula do GPI, mas não determina morte celular (SUTHERLAND *et al.*, 2007). Assim, o uso do FLAER permite avaliação direta da expressão do GPI em diferentes linhagens celulares, com exceção das hemácias, provavelmente porque estas células expressam glicoforina, uma proteína que se liga à aerolisina (BRODSKY, 2008), ou porque elas não possuem as enzimas proteolíticas necessárias para processar a proaerolisina (SUTHERLAND *et al.*, 2007). O seu uso é promissor por apresentar alta acurácia na análise da expressão da molécula do GPI, o

que permite avaliar de maneira direta a consequência bioquímica das mutações do gene *PIG-A* (MUKHINA *et al.*, 2001). Desta forma, o ensaio não sofre interferência pela diferença de expressão das proteínas ancoradas ao GPI em células que se encontram em diferentes estágios de maturação (BRODSKY, 2008; BOROWITZ *et al.*, 2010), o que constitui uma das vantagens do uso do reagente. Alguns estudos demonstraram maior acurácia do FLAER em detectar pequenos clones HPN, quando comparados com os ensaios de citometria de fluxo que utilizam somente anticorpos monoclonais (MUKHINA *et al.*, 2001; MOYO *et al.*, 2004). Torna-se importante ressaltar que o FLAER pode ser utilizado de maneira isolada ou em combinação com os anticorpos monoclonais tradicionais em ensaios de citometria de fluxo (RICHARDS *et al.*, 2007).

O FLAER é um produto ainda não registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil, apesar de estar sendo testado e utilizado de forma incipiente por alguns serviços laboratoriais de rotina. Busca realizada em base de dados nacionais utilizando os termos FLAER, aerolisina e aerolisina fluorescente não revelou publicações.

#### **1.4 Revisão da literatura nacional**

A busca por estudos publicados em periódicos nacionais utilizando a palavra-chave “hemoglobinúria paroxística noturna” resultou em um número pequeno de artigos. Parte das publicações aborda principalmente aspectos clínicos da doença, como os relatos de casos publicados por Araújo e colaboradores (2002), Nomura e colaboradores (2004), Peres e colaboradores (2008), e Matos e colaboradores (2010). Arruda e colaboradores (2010) publicaram revisão da literatura, abordando aspectos da fisiopatologia, curso clínico, diagnóstico e tratamento da HPN. Estudos de foco laboratorial e de caráter experimental são encontrados ainda em menor número. O estudo de Carvalho e colaboradores (2001) foi voltado para a caracterização das mutações do gene *PIG-A* em pacientes brasileiros com HPN. Modesto e colaboradores (2006) avaliaram por citometria de fluxo apenas 6 pacientes com suspeita clínica de HPN e positividade no teste de Ham, não tendo como objetivo a detecção de clones HPN subclínicos. Torres e colaboradores (2009)

avaliaram 22 pacientes com AA, quanto à expressão dos antígenos CD55 e CD59 em granulócitos. Utilizaram técnica de baixa sensibilidade, adquirindo 10.000 eventos em cada amostra e avaliando a expressão de cada marcador individualmente na população de granulócitos, separada apenas por características físicas de dispersão da luz. Desta forma, como consideraram os próprios autores, foi necessário optar por um ponto de corte elevado, pela possibilidade de inclusão de eventos espúrios no *gate* selecionado para análise, o que poderia determinar a possível ocorrência de resultados falso-positivos. Consideraram como clones significativos aqueles com proporção superior a 10% dos granulócitos analisados. O estudo revelou que 22,7% dos pacientes apresentavam clone significativo e outros 54,5% apresentavam clones menores que 10%. Entretanto, optaram por não interpretar os resultados referentes aos clones menores, em função das limitações técnicas descritas. Cabe ressaltar que esta técnica não propicia a detecção precisa dos clones subclínicos habitualmente detectados nos pacientes com AA, sabidamente pequenos, muitas vezes presentes em percentuais inferiores a 1% dos eventos analisados. Brito Junior e colaboradores (2011), em análise de 30 pacientes com suspeita clínica de HPN, relataram a presença do clone caracterizado pela deficiência dos marcadores CD55 e CD59 em hemácias e granulócitos em 9 casos, entretanto não descreveram detalhadamente a técnica utilizada, no que se refere à definição do ponto de corte e estratégias de análise.

Sendo assim, observa-se carência de estudos brasileiros com abordagem laboratorial mais ampla, que avaliem a expressão, por citometria de fluxo, de diferentes antígenos ancorados ao GPI em leucócitos e que visem alcançar técnica com maior sensibilidade analítica, propiciando a detecção de clones HPN subclínicos, como recomenda a literatura internacional.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a expressão de moléculas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) em células sanguíneas de pacientes portadores de AA e SMD, em acompanhamento no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Padronizar a técnica para detecção das células deficientes em proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), por citometria de fluxo, no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas/UFMG;
- Avaliar a capacidade do FLAER (reagente de aerolisina fluorescente) em detectar as células com fenótipo HPN;
- Comparar a capacidade dos diferentes reagentes (anticorpos monoclonais e FLAER) em detectar as células com fenótipo HPN;
- Avaliar a prevalência das células com fenótipo HPN na população em estudo.

### **3 POPULAÇÃO E MÉTODOS**

Trata-se de estudo observacional transversal descritivo desenvolvido no Setor de Hematologia do Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFMG, em Belo Horizonte, Minas Gerais (MG). Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP (parecer nº ETIC 0048.0.203.000-11 – ANEXO I) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão – DEPE (processo nº 16/11). Todos os pacientes incluídos no estudo concordaram em participar do mesmo, após leitura, esclarecimento e assinatura do termo de consentimento (ANEXO II).

#### **3.1 População**

Vinte pacientes com AA, dentre aproximadamente 27, e 30 pacientes com SMD, dentre aproximadamente 80, em acompanhamento no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, foram selecionados, por conveniência, para este estudo. Os pacientes convidados a participar foram aqueles agendados para os primeiros horários do atendimento ambulatorial. As amostras foram coletadas no período compreendido entre julho e dezembro de 2011.

Os critérios de inclusão foram: idade acima de 17 anos e diagnóstico estabelecido de AA ou SMD através de mielograma e biópsia de medula óssea realizados como parte da propedêutica laboratorial da doença de base, pelos métodos convencionais, de acordo com as padronizações do Serviço de Medicina Laboratorial e do Serviço de Anatomopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Não foram incluídos dois pacientes que se recusaram a participar.

Transfusões sanguíneas realizadas nos meses precedentes à coleta do material não representaram restrição à participação dos pacientes, já que não determinam interferência na análise das populações de leucócitos, como foi demonstrado em estudo realizado por Modesto e colaboradores (2006).

Informações clínicas dos pacientes participantes do estudo foram coletadas dos prontuários de atendimento dos mesmos, mediante

preenchimento de questionário padronizado (ANEXO III), e estão apresentadas na seção Resultados.

O grupo controle foi constituído por vinte voluntários adultos, não portadores de doenças hematológicas, que concordaram em participar do estudo.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Amostras**

Sangue venoso periférico (5 mL) foi colhido em tubos contendo EDTA, para detecção de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, por citometria de fluxo, durante o atendimento ambulatorial ou no Setor de Coleta do Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas/UFMG.

### **3.2.2 Ensaios de imunofenotipagem**

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram realizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante, com pequenas modificações, conforme descrito a seguir. Em tubos de poliestireno (12x75mm), foram adicionados 2 $\mu$ L (ou volume definido após titulação do reagente) do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse, marcado com fluorocromo. Combinações específicas de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos distintos foram utilizadas para a análise simultânea de marcadores de superfície celular, necessários para a caracterização de subpopulações celulares de interesse. Para cada combinação de anticorpos monoclonais, foram adicionadas alíquotas de 100 $\mu$ L de sangue periférico total, coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, foi realizada a lise dos eritrócitos, utilizando-se 2mL de solução contendo citrato de sódio dihidratado, dietilenoglicol e formaldeído, em cada tubo. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (1700rpm por 5

minutos). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 2mL de tampão fosfato em solução salina (PBS) - 0,015M, pH 7,4 - empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. O sobrenadante foi novamente descartado e o centrifugado ressuspenso em 300 $\mu$ L de PBS para análise.

Para os ensaios de imunofenotipagem de hemácias do sangue periférico, foi realizado o preparo de suspensão de hemácias a 0,1%, em salina albuminada (salina-BSA 2%), seguindo o procedimento descrito a seguir. Uma alíquota de 200 $\mu$ L de sangue total coletado em EDTA foi lavada três vezes com 3mL de salina. Após retirar o excesso de sobrenadante, foi pipetado 1 $\mu$ L de concentrado de hemácias e adicionados 999 $\mu$ L de salina-BSA 2%. Em tubos de poliestireno 12x75mm, foram pipetados 50 $\mu$ L da suspensão de hemácias e adicionados os anticorpos monoclonais específicos para os marcadores de superfície celular de interesse, marcados com fluorocromos, em volumes definidos após titulação dos reagentes. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura de 37°C e ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 2mL de salina 0.9% e as preparações foram submetidas à centrifugação (2200rpm por 7 minutos). O sobrenadante foi descartado e o centrifugado ressuspenso em 300 $\mu$ L de salina para análise.

### **3.2.3 Reagentes utilizados**

Para a análise dos neutrófilos, foram utilizados anticorpos monoclonais dirigidos às seguintes proteínas ancoradas ao GPI: CD16, CD24, CD55 e CD59.

Para a análise dos monócitos, foram utilizados anticorpos monoclonais dirigidos aos marcadores CD14 e CD55.

O reagente FLAER foi utilizado no estudo da expressão da molécula de GPI em neutrófilos e monócitos.

Para a análise das hemácias, foram utilizados anticorpos monoclonais dirigidos aos marcadores CD55 e CD59.

Como marcadores de linhagem celular, foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-CD45 (panleucocitário), anti-CD15 (neutrófilos), anti-CD33 (monócitos) e anti-CD235a (hemácias).

#### **3.2.4 Estratégia de aquisição e análise de dados no citômetro de fluxo**

Para a aquisição de eventos e análise de parâmetros, foi utilizada a estratégia convencional de citometria de fluxo, com variações, dependendo da população celular analisada.

A aquisição e a análise dos dados foram realizadas em equipamento FACScalibur™ - Becton Dickinson, em uso na rotina do Setor de Hematologia do Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFMG, utilizando o programa CELLQuest™.

Após a aquisição dos dados, a análise dos mesmos foi realizada a partir da seleção da população celular de interesse, com base em aspectos morfométricos, em gráficos de distribuição pontual de tamanho (*FSC*) *versus* granulosidade (*SSC*) e pelas características imunofenotípicas (CD45 e CD15 para neutrófilos; CD45 e CD33 para monócitos e CD235a para hemácias), em gráficos de distribuição pontual de marcador fenotípico *versus* *SSC*. Após a seleção da população celular de interesse, a frequência de células, expressando ou não as moléculas ancoradas ao GPI (CD14, CD16, CD24, CD55 e CD59) e marcadas ou não com FLAER, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (gráficos *dot plot*).

O detalhamento da padronização da metodologia está apresentado na seção Resultados, por ter sido um dos objetivos deste estudo.

#### **3.2.5 Análise estatística**

Foi realizada análise descritiva das variáveis para caracterização dos grupos controle e de pacientes, e determinada a frequência de células com fenótipo HPN nas populações estudadas. Para definição do limite de sensibilidade analítica do teste, foram calculadas medidas de tendência central, medidas de variabilidade e percentis dos resultados obtidos nas amostras dos indivíduos do grupo controle. A comparação do tamanho dos clones HPN

detectados nas populações de neutrófilos e monócitos (proporções de células com fenótipo HPN) pelas diferentes combinações de reagentes foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas, e através do cálculo dos coeficientes de correlação de *Pearson*, após verificação da distribuição gaussiana dos resultados positivos, por meio de testes de normalidade (*Q-Q plot* e teste de *Kolmogorov-Smirnov*). A comparação entre os protocolos de aquisição de 50.000 e 100.000 eventos foi realizada através do cálculo dos coeficientes de correlação de *Spearman*, considerando todos os resultados obtidos, após confirmação da distribuição não paramétrica dos dados, por meio dos testes de normalidade descritos anteriormente.

Foram utilizados os programas estatísticos SPSS, versão 15.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA) e GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da população de estudo

O grupo de pacientes com AA foi composto por 11 mulheres e 9 homens, com idades compreendidas entre 17 e 73 anos (mediana: 30 anos). O tempo de evolução da doença antes de iniciado o estudo foi de 1 a 103 meses, com média de 24,4 meses. Informações sobre a gravidade da doença e outros dados clínicos foram obtidos nos prontuários de atendimento de 18 pacientes. Destes, 5 apresentavam AA não grave e 13 apresentavam AA grave ou muito grave. Dentre os pacientes que apresentavam indicação de uso de imunossupressores, apenas um foi incluído no estudo prontamente após o diagnóstico da AA, antes de iniciado o tratamento. Os demais pacientes já estavam em uso de medicamentos imunossupressores no momento da inclusão ou haviam feito uso prévio da medicação e, portanto, tiveram suas amostras analisadas, por citometria de fluxo, após início do tratamento. Os pacientes com AA não grave não haviam recebido imunossupressores.

A população de pacientes com SMD foi representada por 13 homens e 17 mulheres, com idades entre 21 e 88 anos (média: 63 anos; mediana: 67 anos). O tempo de evolução da doença antes de iniciado o estudo foi de 2 a 180 meses, com média de 33,3 meses. A classificação prognóstica pelo

*International Prognostic Scoring System (IPSS)* revelou 25 pacientes com doença de baixo risco (13 pacientes com *IPSS* baixo e 12 pacientes com *IPSS* intermediário-1) e 5 pacientes com doença de alto risco, classificados como *IPSS* intermediário-2. Nenhum paciente foi classificado como *IPSS* alto.

A população controle foi composta por 13 indivíduos do sexo feminino e 7 indivíduos do sexo masculino, com idades compreendidas entre 18 e 73 anos (média: 44 anos; mediana: 47 anos).

Os parâmetros hematológicos das amostras analisadas encontram-se descritos na TABELA 3.

**Tabela 3** - Parâmetros hematológicos - média (mínimo - máximo) - das amostras analisadas dos pacientes com anemia aplásica (AA), síndrome mielodisplásica (SMD) e indivíduos do grupo controle

| Grupos   | Hb (g/dL)        | Leucócitos<br>(cel/mm <sup>3</sup> ) | Neutrófilos<br>(cel/mm <sup>3</sup> ) | Plaquetas<br>(x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> ) |
|----------|------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| AA       | 9,4 (3,7-16,6)   | 3293 (440-5930)                      | 1380 (40-3142)                        | 65 (8-222)   |
| SMD      | 8,8 (4,7-16,2)   | 5809 (786-28500)                     | 3296 (154-23370)                      | 195 (13-648)   |
| Controle | 14,2 (11,7-17,5) | 6431 (3460-10600)                    | 3689 (1780-6740)                      | 249 (163-345)  |

AA, anemia aplásica; SMD, síndrome mielodisplásica; Hb, hemoglobina

#### **4.2 Padronização da metodologia para detecção das células deficientes em proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), por citometria de fluxo**

A padronização da técnica para detecção das células deficientes em proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), por citometria de fluxo, foi alcançada a partir da análise das amostras do grupo controle.

Hemácias, neutrófilos e monócitos foram as populações escolhidas para a detecção de células com o fenótipo HPN.

A expressão das proteínas ancoradas ao GPI foi estudada utilizando os seguintes anticorpos monoclonais como reagentes:

- CD14 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clone MΦP9);
- CD15 conjugado com alofocianina (APC) (clone H198);

- CD16 conjugado com proteína peridina-clorofila cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5) (clone 3G8);
- CD24 - ficoeritrina (PE) (clone ML5);
- CD33 APC (clone WM53);
- CD45 - proteína peridina-clorofila (PerCP) (clone 2D1);
- CD59 FITC (clone p282-H19);
- CD235a PE (clone GA-R2 HIR2) (BD Biosciences; San Jose, CA);
- CD45 FITC (clone AP4) (EasyPath; SP, Brasil);
- CD55 PE (clone 67) (AbD Serotec; Oxford, UK).

O painel incluiu ainda o reagente FLAER Alexa fluor 488 (Pinewood Scientific Services; Victoria, BC, Canada), adquirido em formulação líquida, pronto para uso.

Os seguintes controles isotípicos foram utilizados: IgG2b FITC (clone:27-35); IgG1 PE (clone: X40); IgM APC (clone: G155-228); IgG2a PE (clone: X39); IgG1 PerCP-Cy5.5 (clone: X40); IgG1 APC (clone: X40) (BD Biosciences; San Jose, CA).

Para a análise de hemácias, foi seguido o protocolo descrito na sessão 3.2. Após preparo da suspensão de hemácias, 50µL da mesma foram pipetados em tubos de poliestireno e adicionados às combinações de anticorpos monoclonais descritas na TABELA 4.

**Tabela 4** - Combinações de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos e seus respectivos volumes utilizados para a análise de hemácias

| Hemácias<br>Tubos | Reagentes (volume - µL) |                                    |
|-------------------|-------------------------|------------------------------------|
|                   | FITC                    | PE                                 |
| 1                 | CD59 (3µL)              | CD55 (5µL)                         |
| 2                 | CD59 (3µL)              | CD235a<br>(10µL da diluição 1:200) |

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina

Para a análise de neutrófilos e monócitos, foi seguido o protocolo descrito na seção 3.2. As combinações de reagentes utilizadas para análise de cada uma das populações estão descritas nas TABELAS 5 e 6.

**Tabela 5** - Combinações de reagentes conjugados a fluorocromos e seus respectivos volumes utilizados para a análise de neutrófilos

| Neutrófilos<br>Tubos | Reagentes (volume- $\mu\text{L}$ ) |                         |                         |                         |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                      | FITC/<br>AF488                     | PE                      | PerCP/<br>PerCP-Cy5.5   | APC                     |
| 1                    | CD59 (5 $\mu\text{L}$ )            | CD55 (5 $\mu\text{L}$ ) | CD45 (2 $\mu\text{L}$ ) | CD15 (2 $\mu\text{L}$ ) |
| 2                    | CD45 (2 $\mu\text{L}$ )            | CD24 (3 $\mu\text{L}$ ) | CD16 (1 $\mu\text{L}$ ) | CD15 (2 $\mu\text{L}$ ) |
| 3                    | FLAER (1 $\mu\text{L}$ )           | CD24 (3 $\mu\text{L}$ ) | CD45 (2 $\mu\text{L}$ ) | CD15 (2 $\mu\text{L}$ ) |

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, proteína peridina-clorofila; PerCP-Cy5.5, proteína peridina-clorofila cianina 5.5; APC, alofocianina; AF488, alexa fluor 488

**Tabela 6** - Combinações de reagentes conjugados a fluorocromos e seus respectivos volumes utilizados para a análise de monócitos

| Monócitos<br>Tubos | Reagentes (volume- $\mu\text{L}$ ) |                         |                         |                         |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                    | FITC/<br>AF488                     | PE                      | PerCP                   | APC                     |
| 1                  | CD14 (2 $\mu\text{L}$ )            | CD55 (5 $\mu\text{L}$ ) | CD45 (2 $\mu\text{L}$ ) | CD33 (2 $\mu\text{L}$ ) |
| 2                  | FLAER (1 $\mu\text{L}$ )           | CD55 (5 $\mu\text{L}$ ) | CD45 (2 $\mu\text{L}$ ) | CD33 (2 $\mu\text{L}$ ) |

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCP, proteína peridina-clorofila; APC, alofocianina; AF488, alexa fluor 488

As hemácias foram adquiridas em escala logarítmica e os leucócitos em escala linear. Foram adquiridos 20.000 eventos no *gate* de hemácias e 50.000 eventos no *gate* de leucócitos, inicialmente identificados pelos parâmetros de tamanho celular (*forward scatter* – *FSC*) e complexidade interna (*side scatter* – *SSC*).

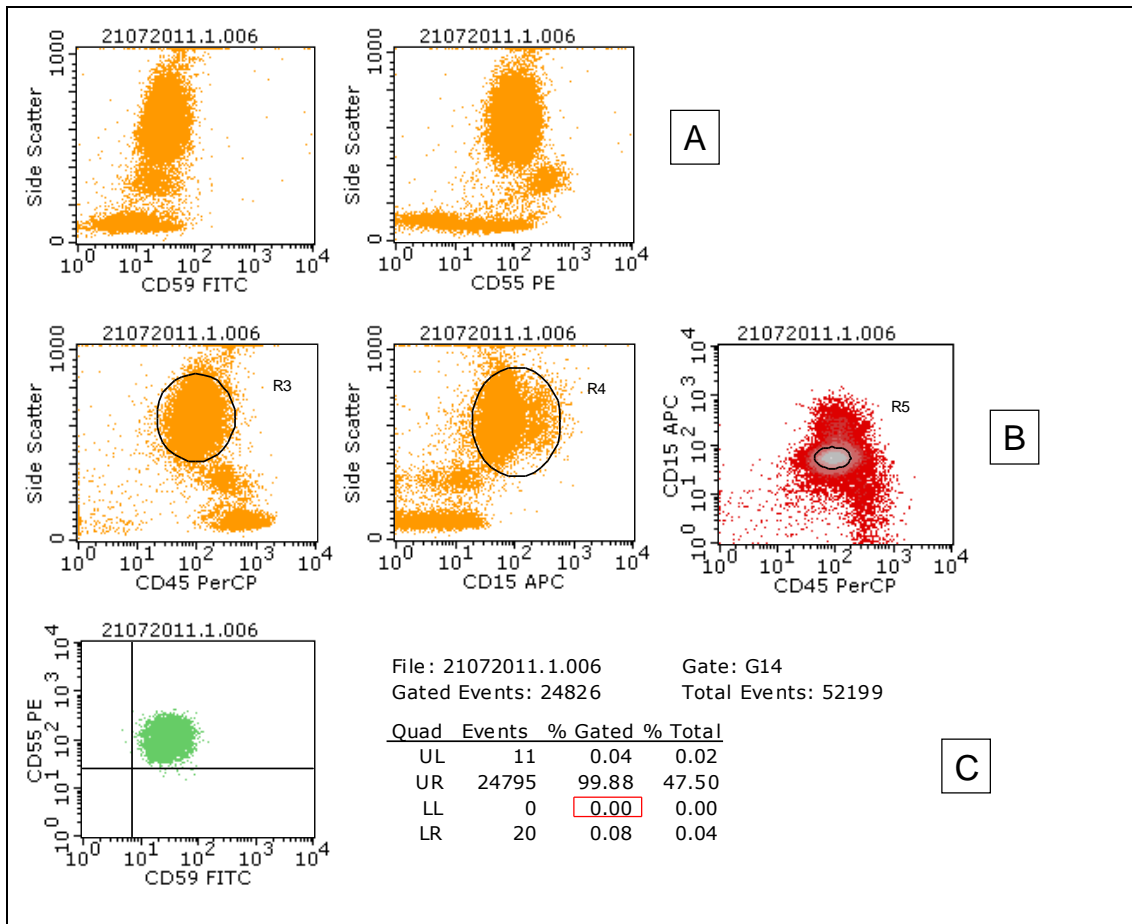
Um segundo protocolo de aquisição de leucócitos foi realizado em amostras de 38 pacientes e consistiu na aquisição de 100.000 eventos. Os demais parâmetros de aquisição foram idênticos nos dois protocolos.

A seleção das populações celulares estudadas foi baseada no uso de marcadores de linhagem celular e análise multiparamétrica com combinações de regiões. O marcador CD235a (glicoforina) foi utilizado para seleção da

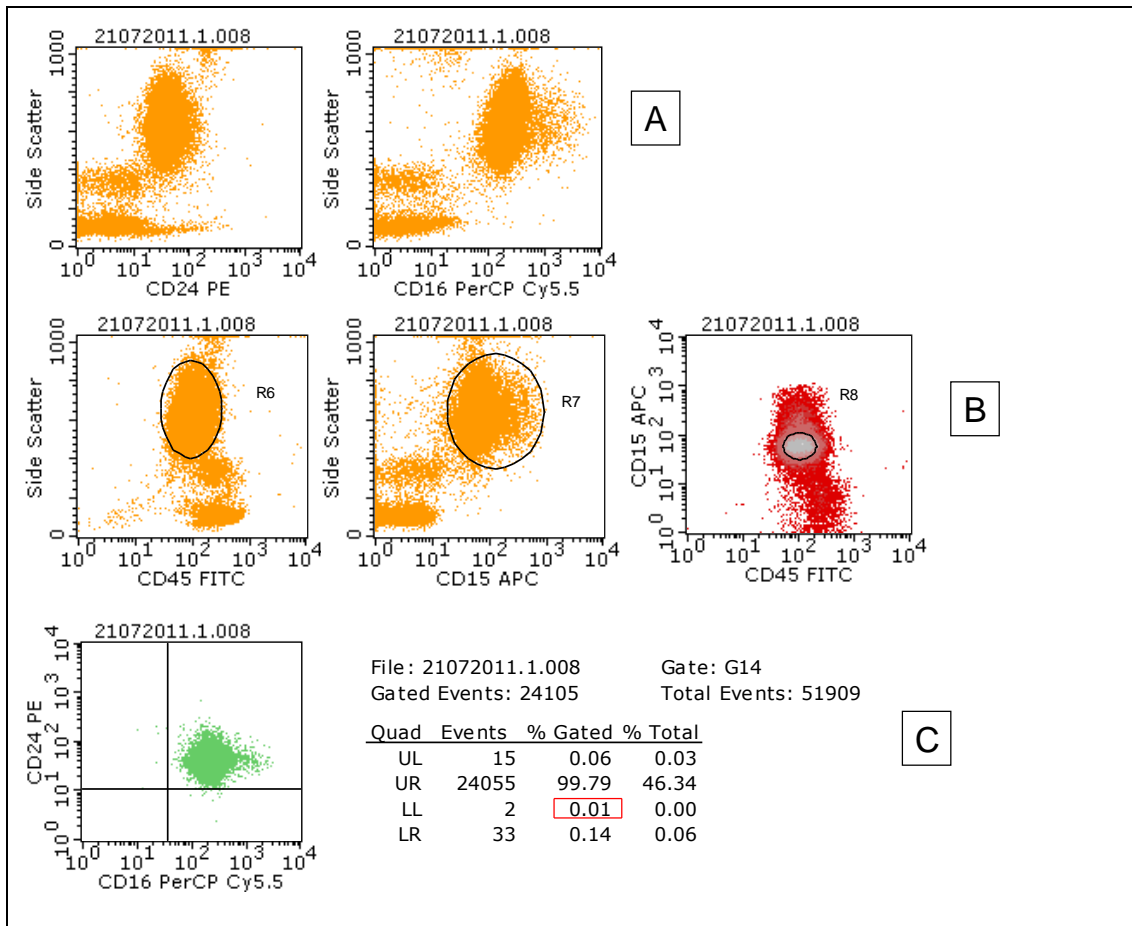
população de hemácias, os marcadores CD45 e CD15 foram utilizados para seleção da população de neutrófilos e os marcadores CD45 e CD33 foram utilizados para seleção da população de monócitos.

As estratégias de análise utilizadas para seleção das populações de neutrófilos, monócitos e hemácias serão descritas a seguir e ilustradas nas FIGURAS 1 a 3, 4 e 5, 6 e 7, respectivamente.

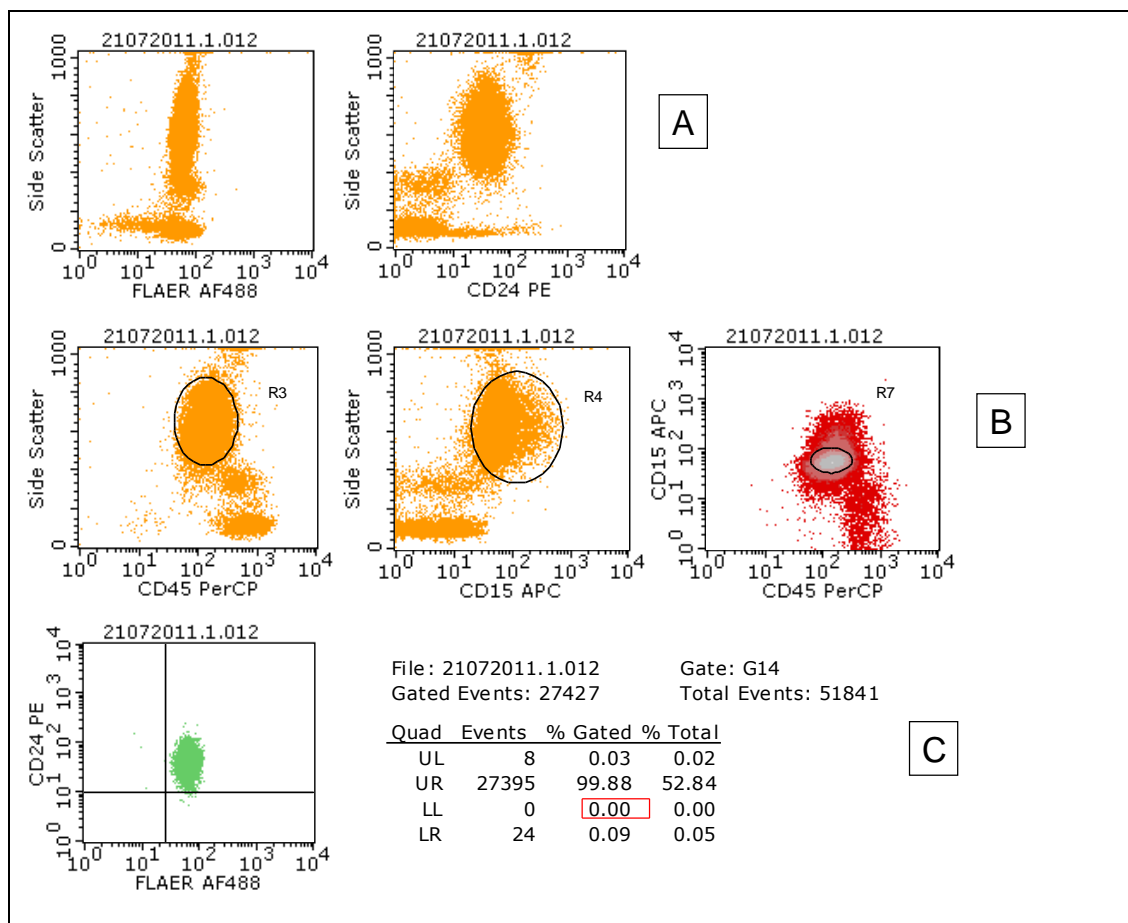
Os neutrófilos foram identificados com base nas propriedades físicas de dispersão da luz (parâmetros *FSC* e *SSC*) e pelas expressões características do antígeno panleucocitário CD45 e do marcador de linhagem CD15, constitutivamente expresso nestas células, não ancorado ao GPI. Foram inicialmente selecionadas duas regiões com base nos parâmetros de expressão do marcador CD45 X *SSC* e expressão do marcador CD15 X *SSC*, nos respectivos gráficos de distribuição pontual de fluorescência (gráficos *dot plot*). Uma terceira região foi selecionada, a partir da avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD15, em gráfico de densidade. Os neutrófilos das três regiões combinadas (G14) foram avaliados quanto à expressão dos marcadores CD59/CD55, CD24/CD16 e FLAER/CD24. As células com fenótipo HPN foram definidas pela ausência simultânea de expressão dos dois marcadores analisados em cada tubo (população duplamente negativa (*Low left* - LL), localizada no quadrante inferior esquerdo dos respectivos gráficos *dot plot*).



**Figura 1** - Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD59 e CD55 em neutrófilos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle. (A) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD59 e CD55 em neutrófilos. (B) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD45 e CD15 em neutrófilos, utilizados para seleção desta população celular, e gráfico de densidade para avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD15. Os neutrófilos foram definidos com base nos parâmetros CD45/SSC (R3), CD15/SSC (R4) e CD45/CD15 (R5). (C) Os neutrófilos das três regiões combinadas (R3 + R4 + R5 = G14) foram avaliados quanto à expressão de CD59/CD55. A população duplamente negativa para os marcadores de interesse foi identificada no quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* (LL).



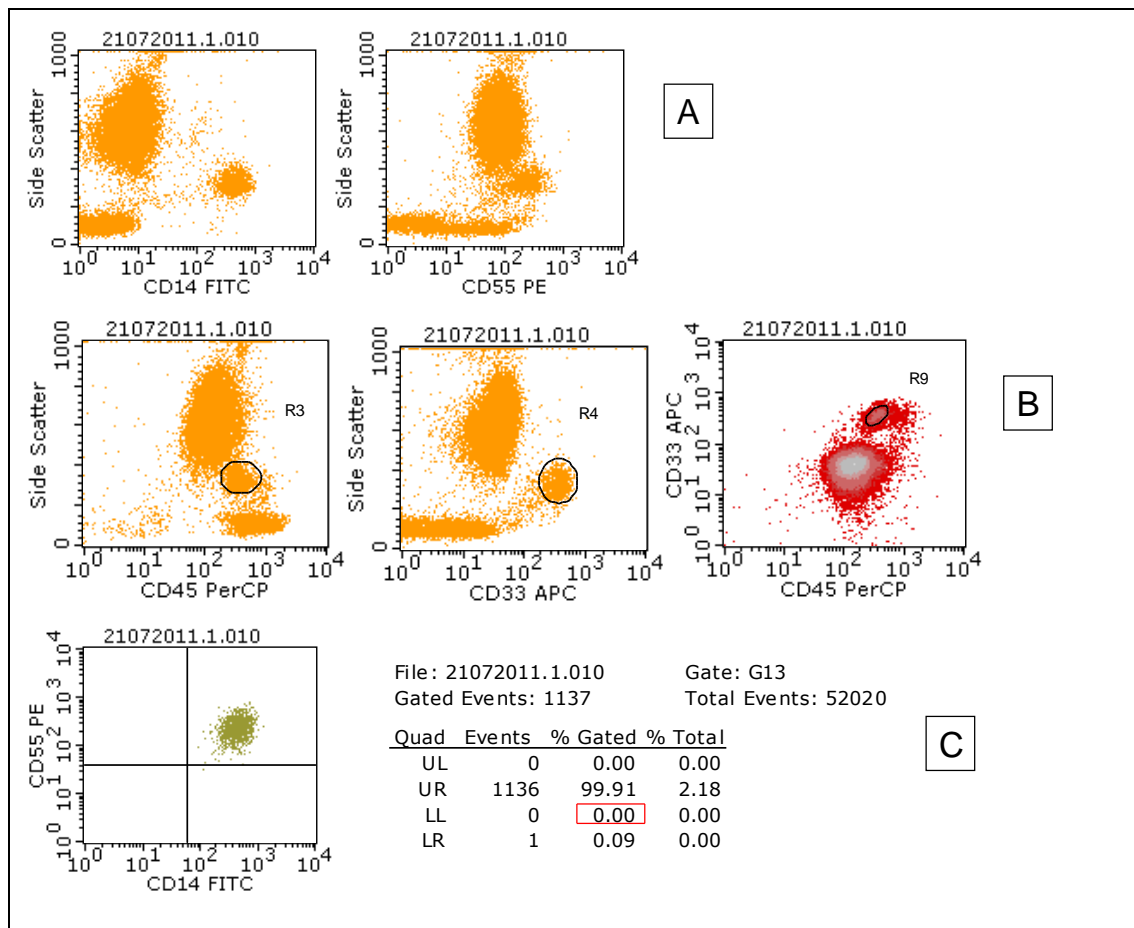
**Figura 2** - Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD24 e CD16 em neutrófilos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle. (A) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD24 e CD16 em neutrófilos. (B) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD45 e CD15 em neutrófilos, utilizados para seleção desta população celular, e gráfico de densidade para avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD15. Os neutrófilos foram definidos com base nos parâmetros CD45/SSC (R6), CD15/SSC (R7) e CD45/CD15 (R8). (C) Os neutrófilos das três regiões combinadas (R6 + R7 + R8 = G14) foram avaliados quanto à expressão de CD24/CD16. A população duplamente negativa para os marcadores de interesse foi identificada no quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* (LL).



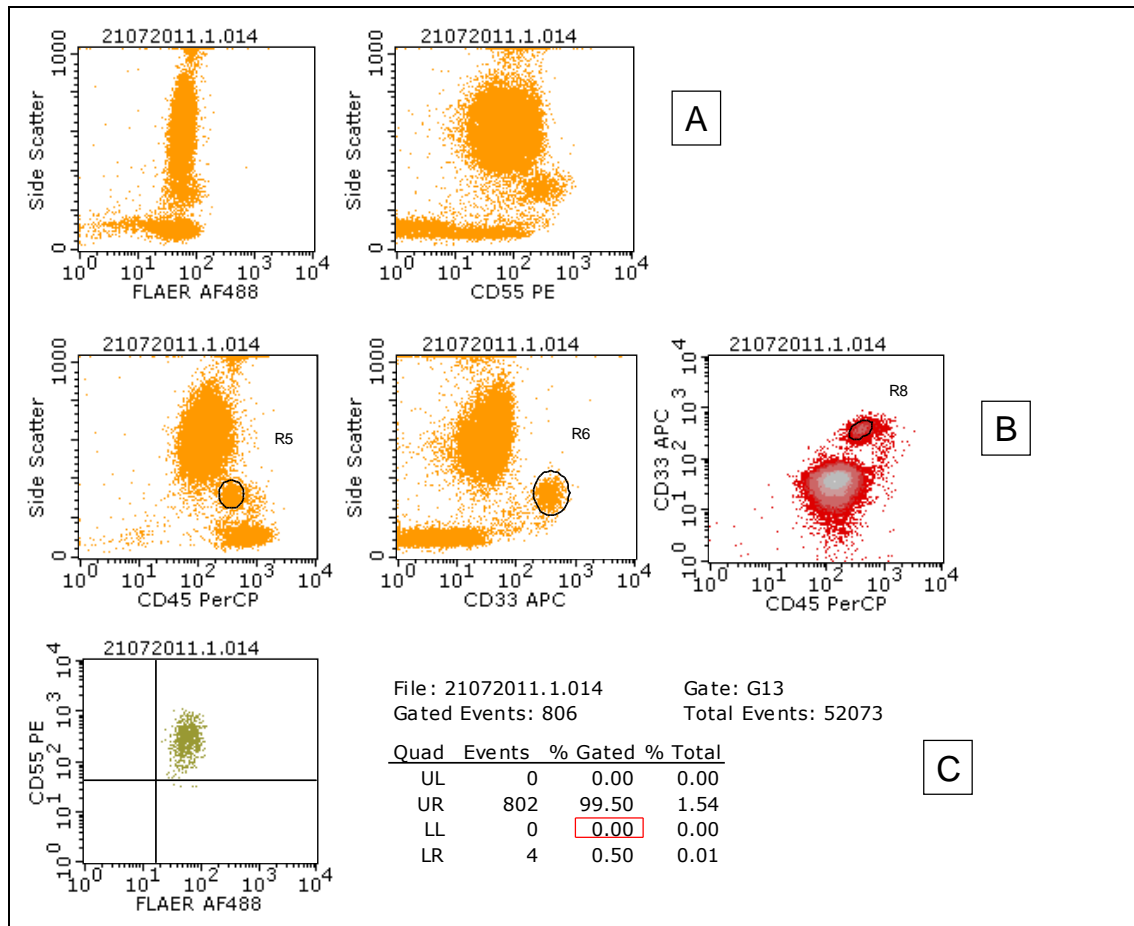
**Figura 3** - Análise, por citometria de fluxo, da marcação com FLAER e da expressão de CD24 em neutrófilos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle. (A) Gráficos de aquisição ilustrativos da marcação com FLAER em neutrófilos e expressão do antígeno CD24 nestas células. (B) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD45 e CD15 em neutrófilos, utilizados para seleção desta população celular, e gráfico de densidade para avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD15. Os neutrófilos foram definidos com base nos parâmetros CD45/SSC (R3), CD15/SSC (R4) e CD45/CD15 (R7). (C) Os neutrófilos das três regiões combinadas (R3 + R4 + R7 = G14) foram avaliados quanto à expressão de CD24 e reação com FLAER. A população duplamente negativa para os marcadores de interesse foi identificada no quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* (LL).

Os monócitos foram identificados com base nas propriedades físicas de dispersão da luz (parâmetros *FSC* e *SSC*) e pelas expressões características do antígeno panleucocitário CD45 e do marcador de linhagem CD33, não ancorado ao GPI. Seguindo a estratégia anteriormente descrita, foram inicialmente selecionadas duas regiões com base nos parâmetros expressão do marcador CD45 X *SSC* e expressão do marcador CD33 X *SSC*, nos respectivos gráficos de distribuição pontual de fluorescência (gráficos *dot plot*). Uma terceira região foi selecionada, a partir da avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD33, em gráfico de densidade. Os

monócitos das três regiões combinadas (G13) foram avaliados quanto à expressão dos marcadores CD14/CD55 e FLAER/CD55. As células com fenótipo HPN foram definidas pela ausência simultânea de expressão dos dois marcadores analisados em cada tubo (população duplamente negativa - LL, localizada no quadrante inferior esquerdo dos respectivos gráficos *dot plot*).



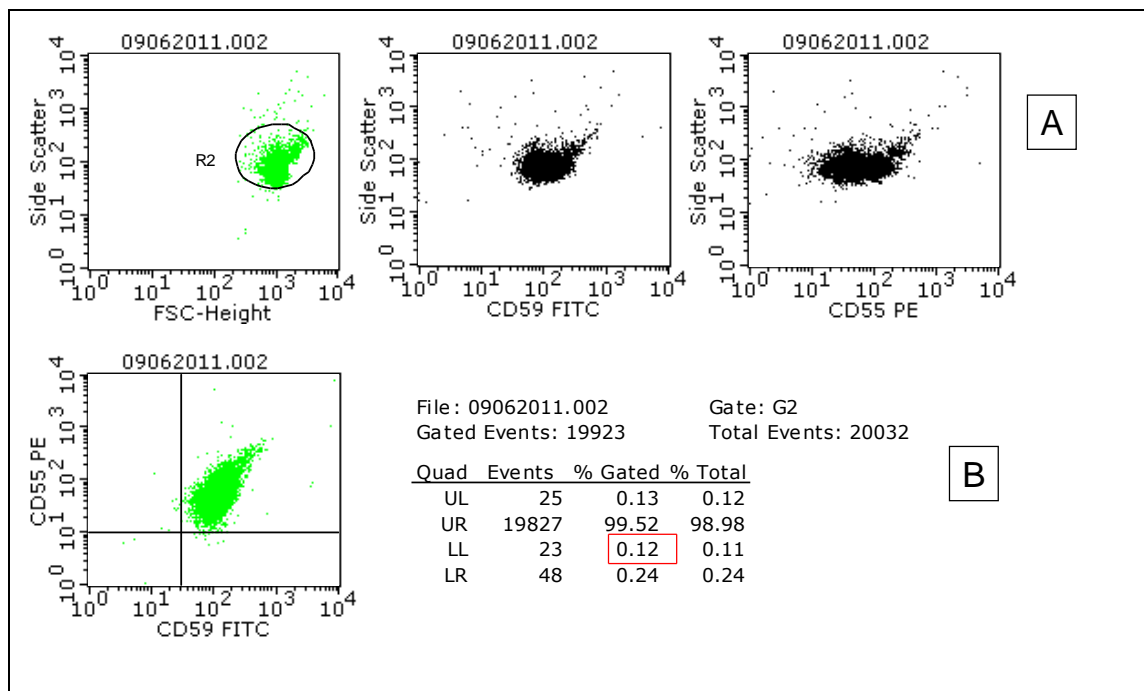
**Figura 4** - Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD14 e CD55 em monócitos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle. (A) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD14 e CD55 em monócitos. (B) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD45 e CD33 em monócitos, utilizados para seleção desta população celular, e gráfico de densidade para avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD33. Os monócitos foram definidos com base nos parâmetros CD45/SSC (R3), CD33/SSC (R4) e CD45/CD33 (R9). (C) Os monócitos das três regiões combinadas (R3 + R4 + R9 = G13) foram avaliados quanto à expressão de CD14/CD55. A população duplamente negativa para os marcadores de interesse foi identificada no quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* (LL).



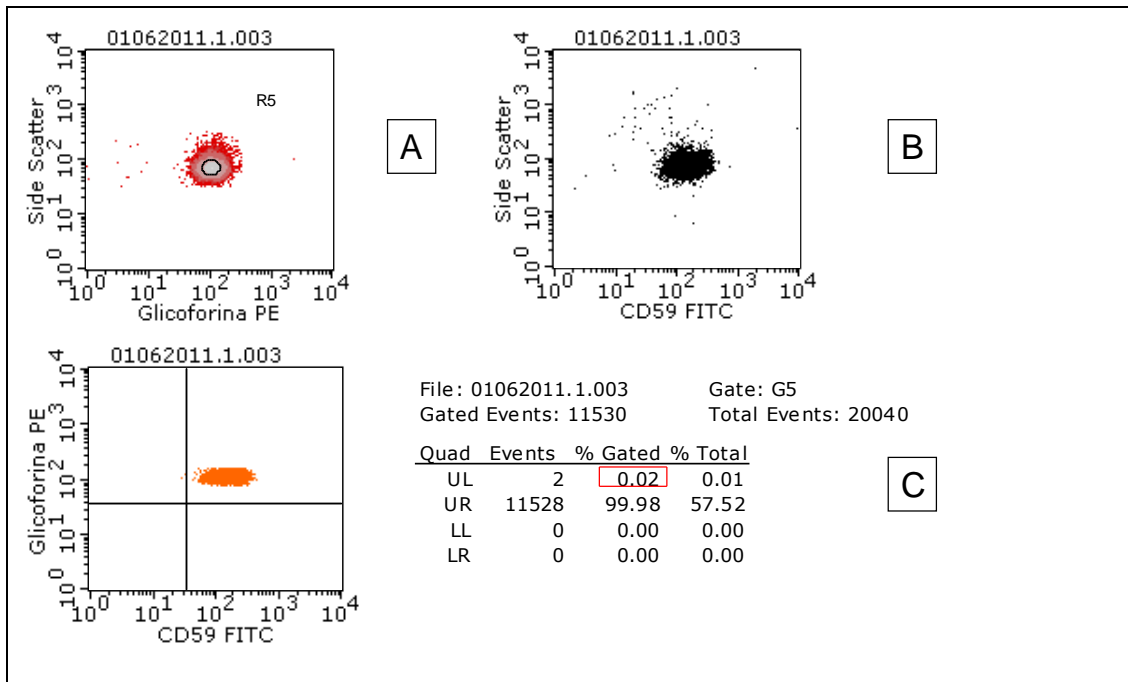
**Figura 5** - Análise, por citometria de fluxo, da marcação com FLAER e da expressão de CD55 em monócitos de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle. (A) Gráficos de aquisição ilustrativos da marcação com FLAER em monócitos e expressão do antígeno CD55 nestas células. (B) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD45 e CD33 em monócitos, utilizados para seleção desta população celular, e gráfico de densidade para avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD33. Os monócitos foram definidos com base nos parâmetros CD45/SSC (R5), CD33/SSC (R6) e CD45/CD33 (R8). (C) Os monócitos das três regiões combinadas (R5 + R6 + R8 = G13) foram avaliados quanto à expressão de CD55 e reação com FLAER. A população duplamente negativa para os marcadores de interesse foi identificada no quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* (LL).

As hemácias foram selecionadas por estratégias distintas, nos dois tubos de análise. O primeiro tubo não incluiu marcador de linhagem celular e, portanto, as hemácias foram selecionadas apenas por suas propriedades físicas de dispersão da luz (parâmetros *FSC* e *SSC*), sendo a população selecionada avaliada quanto à expressão dos marcadores CD55 e CD59. As células com fenótipo HPN foram definidas pela ausência simultânea de expressão dos dois marcadores analisados (população duplamente negativa - LL). O segundo tubo incluiu a glicoforina como marcador de linhagem celular e

a população de hemácias foi selecionada com base nos parâmetros SSC X expressão de glicoforina, em gráfico de densidade. A expressão do antígeno CD59 foi avaliada na população selecionada e as células deficientes na expressão do mesmo foram caracterizadas como células com fenótipo HPN.



**Figura 6** - Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD59 e CD55 em hemácias de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle. (A) Gráficos de aquisição ilustrativos da expressão dos antígenos CD59 e CD55 em hemácias. (B) As hemácias selecionadas por parâmetros físicos (G2 = R2) foram avaliadas quanto à expressão de CD59/CD55. A população negativa para os marcadores de interesse foi identificada no quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* (LL).



**Figura 7** - Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD59 em hemácias de amostra de sangue periférico de indivíduo do grupo controle. (A) A população de hemácias foi definida com base nos parâmetros expressão de glicoforina/SSC, em gráfico de densidade (R5). (B) Gráfico de aquisição ilustrativo da expressão do antígeno CD59 em hemácias. (C) As hemácias selecionadas (G5 = R5) foram avaliadas quanto à expressão de CD59. A população negativa para o marcador de interesse foi identificada no quadrante superior esquerdo dos gráficos *dot plot* (UL).

### 4.3 Detecção das células com fenótipo HPN

#### 4.3.1 Definição dos critérios de positividade do clone HPN

Foram estabelecidos a média, o desvio padrão e os percentis 95 e 100 das células duplo-negativas, nas populações de hemácias, neutrófilos e monócitos, das amostras dos participantes do grupo controle (TABELA 7).

**Tabela 7** - Medidas de tendência central, dispersão e percentis das amostras-controle, expressas em percentual de células alteradas em relação ao total de eventos analisados, fracionadas por populações celulares e combinações de reagentes

| Populações celulares | Combinações de reagentes              | Cálculos estatísticos |              |              |               |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|---------------|
|                      |                                       | Média                 | Média + 2 DP | Percentil 95 | Percentil 100 |
| Neutrófilos          | CD59 <sup>-</sup> /CD55 <sup>-</sup>  | 0,002                 | 0,010        | 0,010        | 0,010         |
|                      | CD24 <sup>-</sup> /CD16 <sup>-</sup>  | 0,004                 | 0,016        | 0,020        | 0,020         |
|                      | FLAER <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> | 0,003                 | 0,015        | 0,020        | 0,020         |
| Monócitos            | CD14 <sup>-</sup> /CD55 <sup>-</sup>  | 0,021                 | 0,087        | 0,080        | 0,080         |
|                      | FLAER <sup>-</sup> /CD55 <sup>-</sup> | 0,004                 | 0,040        | 0,076        | 0,080         |
| Hemácias             | CD59 <sup>-</sup> /CD55 <sup>-</sup>  | 0,192                 | 0,452        | 0,457        | 0,460         |
|                      | CD59 <sup>-</sup> /Glic <sup>+</sup>  | 0,024                 | 0,078        | 0,090        | 0,090         |

DP, desvio padrão

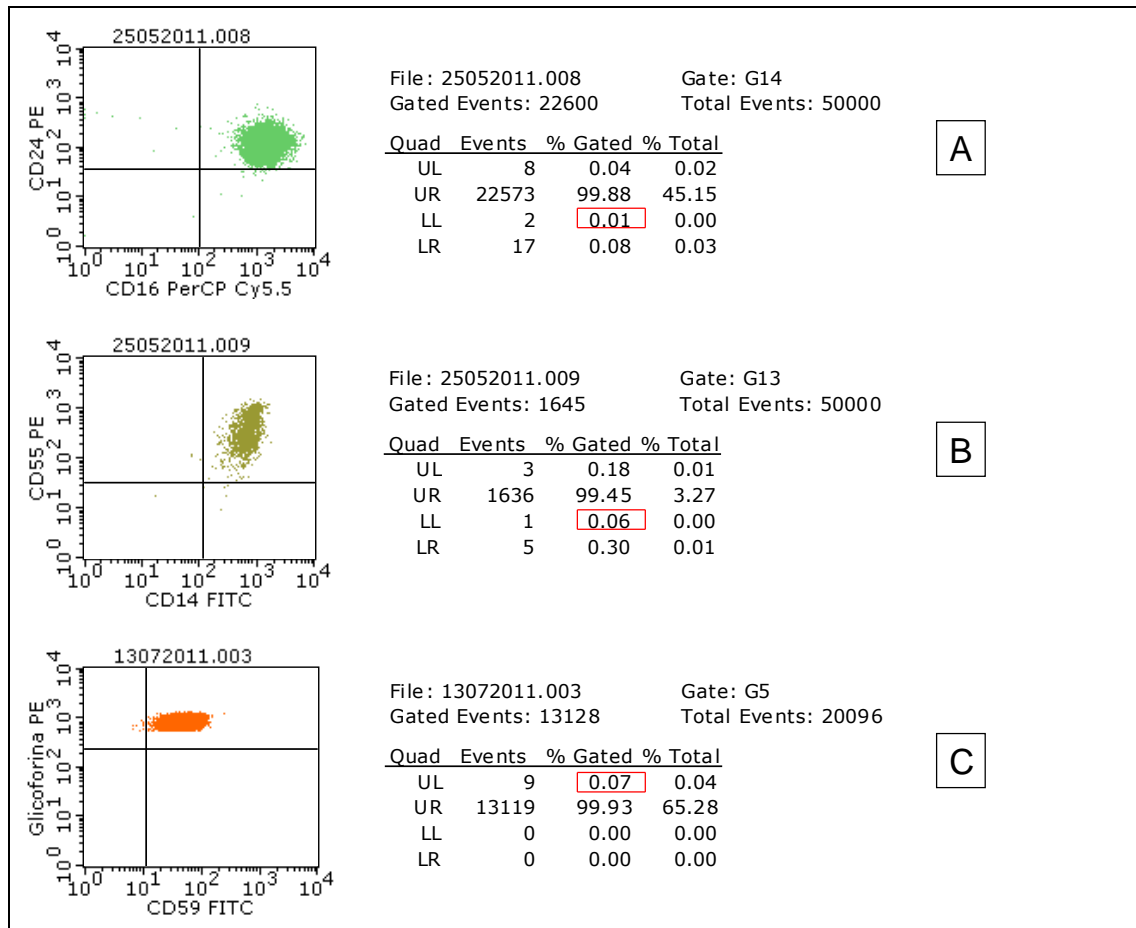
Foi observado que, para as populações celulares devidamente selecionadas através do uso de marcadores de linhagem celular, os cálculos de média + 2DP e percentil 95 apresentaram como limite máximo o valor 0,090, considerando as diferentes populações celulares e combinações de reagentes avaliadas. Como critério para a definição da presença de células HPN nas amostras dos pacientes, foi estabelecido que seria necessário evidenciar separação distinta das células anormais, em gráficos *dot plot*, em percentuais acima do limite superior da faixa observada nos controles saudáveis. Esta população distinta foi vista em proporções superiores a 0,1% dos eventos selecionados para análise, apesar deste valor ter se mostrado acima da média + 2DP e do percentil 95 das amostras-controle. Portanto, somente populações celulares duplo-negativas superiores a 0,1% do total de eventos do *gate* selecionado, que apresentaram separação distinta das células normais em gráficos *dot plot*, foram caracterizadas como células com fenótipo HPN, tendo sido este o ponto de corte definido como limite de detecção confiável. O eventual encontro de proporção superior a 0,1% de células alteradas em tubos isolados não caracterizou a presença do clone HPN, estando este procedimento de acordo com as recomendações disponíveis na literatura, que preconizam a detecção da deficiência de expressão de pelo menos duas proteínas ancoradas ao GPI em duas linhagens celulares distintas, com o

objetivo de aumentar a acurácia do teste (PARKER *et al.*, 2005; BOROWITZ *et al.*, 2010).

Cabe ressaltar que estas definições em relação ao ponto de corte não foram válidas para o tubo de hemácias que avaliou a expressão dos antígenos CD59 e CD55, sem o uso do marcador de linhagem (glicoforina) para a seleção da população de interesse. Todos os valores calculados (média, DP, percentis 95 e 100) foram significativamente superiores aos demais, em função da inclusão de outros eventos, que não hemácias, na região selecionada para análise.

A análise das amostras de sangue periférico dos 20 doadores voluntários, utilizando os critérios de positividade do clone HPN estabelecidos, não mostrou número significativo de células duplo-negativas para as combinações de reagentes descritas e, portanto, os indivíduos do grupo controle foram considerados negativos para a pesquisa de células com fenótipo HPN.

A FIGURA 8 ilustra o *background* (células duplo-negativas para os marcadores de interesse, em indivíduos não portadores de clone HPN), observado nas amostras do grupo controle.



**Figura 8 - Background** observado nas amostras do grupo controle. (A) Neutrófilos de sangue periférico normal, selecionados pelos parâmetros SSC/CD45<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>, marcados com CD24 e CD16. (B) Monócitos de sangue periférico normal, selecionados pelos parâmetros SSC/CD45<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>, marcados com CD14/CD55. (C) Hemácias de sangue periférico normal, selecionadas pelos parâmetros SSC/Glicoforina, marcadas com CD59. Menos de 0,1% dos neutrófilos e monócitos selecionados são negativos para os dois marcadores estudados em cada tubo (quadrante inferior esquerdo - LL dos gráficos *dot plot*). Menos de 0,1% das hemácias selecionadas são negativas para o marcador estudado (quadrante superior esquerdo - UL dos gráficos *dot plot*).

#### 4.3.2 Estudo comparativo dos protocolos de aquisição de 50.000 eventos e de 100.000 eventos

Foram realizados 2 protocolos de aquisição de leucócitos, totalizando 50.000 e 100.000 eventos, em 73% dos tubos das amostras dos pacientes, considerando as diferentes combinações de reagentes incluídas no painel. Para avaliar a concordância entre os dois protocolos, foi calculado o coeficiente de correlação de *Spearman* ( $r_s$ ), escolhido em função da distribuição não paramétrica dos dados. Os cálculos foram feitos para o conjunto de pacientes

e, em seguida, fracionados para os grupos de AA e SMD, e ainda em função dos resultados, contemplando aqueles que se encontravam nas faixas de 0 a 1,0% e de 0 a 0,1% de eventos simultaneamente negativos para a dupla de reagentes analisada em cada tubo. Os resultados, descritos na TABELA 8, evidenciaram correlação moderada ( $0,4 \leq r_s < 0,7$ ) a forte ( $0,7 \leq r_s < 1,0$ ) para os tubos CD59/CD55, CD24/CD16, FLAER/CD24 e FLAER/CD55, em todos os subgrupos avaliados. O tubo proposto para avaliar a expressão dos marcadores CD14 e CD55 em monócitos mostrou correlação moderada e forte nos subgrupos “geral” e “AA”, respectivamente, e correlação fraca ( $0 < r_s < 0,4$ ) nos subgrupos “SMD”, “faixa 0 a 1.0%” e “faixa 0 a 0,1%”.

**Tabela 8** - Coeficientes de correlação de *Spearman* entre os protocolos de aquisição de leucócitos (50.000 e 100.000 eventos), para as cinco combinações de reagentes utilizadas, considerando os subgrupos formados

| <b>Tubos</b> | <b>Geral</b> | <b>AA</b> | <b>SMD</b> | <b>Faixa 0 a 1,0%</b> | <b>Faixa 0 a 0,1%</b> |
|--------------|--------------|-----------|------------|-----------------------|-----------------------|
| CD59/CD55    | 0,703        | 0,857     | 0,520      | 0,564                 | 0,551                 |
| CD24/CD16    | 0,902        | 0,944     | 0,820      | 0,861                 | 0,849                 |
| FL/CD24      | 0,756        | 0,962     | 0,604      | 0,681                 | 0,681                 |
| FL/CD55      | 0,831        | 1,000     | 0,572      | 0,551                 | 0,434                 |
| CD14/CD55    | 0,538        | 0,809     | 0,373      | 0,261                 | 0,205                 |

FL, FLAER

A partir do protocolo de aquisição de 50.000 leucócitos e utilizando a estratégia de seleção de populações descrita anteriormente, baseada em combinações de regiões, foi calculado o número final de neutrófilos e monócitos selecionados para análise da expressão dos marcadores de interesse. Excluindo as amostras que não alcançaram 50.000 eventos por extrema hipocelularidade e, considerando todo o conjunto de amostras analisadas, a aquisição de 50.000 leucócitos permitiu a seleção de um número médio de 17.089 neutrófilos (mediana: 17.249; faixa: 5.137 a 32.868) e 1.204 monócitos (mediana: 1.066; faixa: 91 a 4.159) por tubo. Considerando os três grupos, separadamente, foram obtidos em média 18.708 (mediana: 18.200; faixa: 5.137 a 28.214) neutrófilos e 1.258 (mediana: 1.235; faixa: 225 a 2.423) monócitos nas amostras controle; 16.824 (mediana: 16.246; faixa: 7.258 a

32.868) neutrófilos e 1.097 (mediana: 1.007; faixa: 366 a 2.668) monócitos nas amostras dos pacientes com AA; e 16.232 (mediana: 16.001; faixa: 5.510 a 31.033) neutrófilos e 1.235 (mediana: 952; faixa: 91 a 4.159) monócitos nas amostras dos pacientes com SMD.

#### 4.3.3 Detecção das células com fenótipo HPN em pacientes com AA

Células com fenótipo HPN foram detectadas em 5 pacientes, dentre os 20 participantes que apresentavam diagnóstico de AA. Seguindo as estratégias de análise anteriormente descritas, as populações celulares com fenótipo HPN foram claramente distintas das células normais, utilizando a separação por quadrantes em gráficos *dot plot*, formando aglomerados consistentes. A deficiência de expressão das proteínas ancoradas ao GPI foi detectada por todas as combinações de reagentes incluídas no painel e nas três populações celulares estudadas, em cada uma das amostras definidas como positivas para a presença do clone. A técnica mostrou eficácia na detecção de clones grandes, com acometimento de proporção significativa dos eventos analisados, e de clones pequenos, subclínicos, com menor proporção de células afetadas, incluindo clone com percentual inferior a 1% dos leucócitos analisados. As proporções de células HPN detectadas nas populações selecionadas para análise, em cada uma das amostras positivas para a presença do clone, estão descritas na TABELA 9.

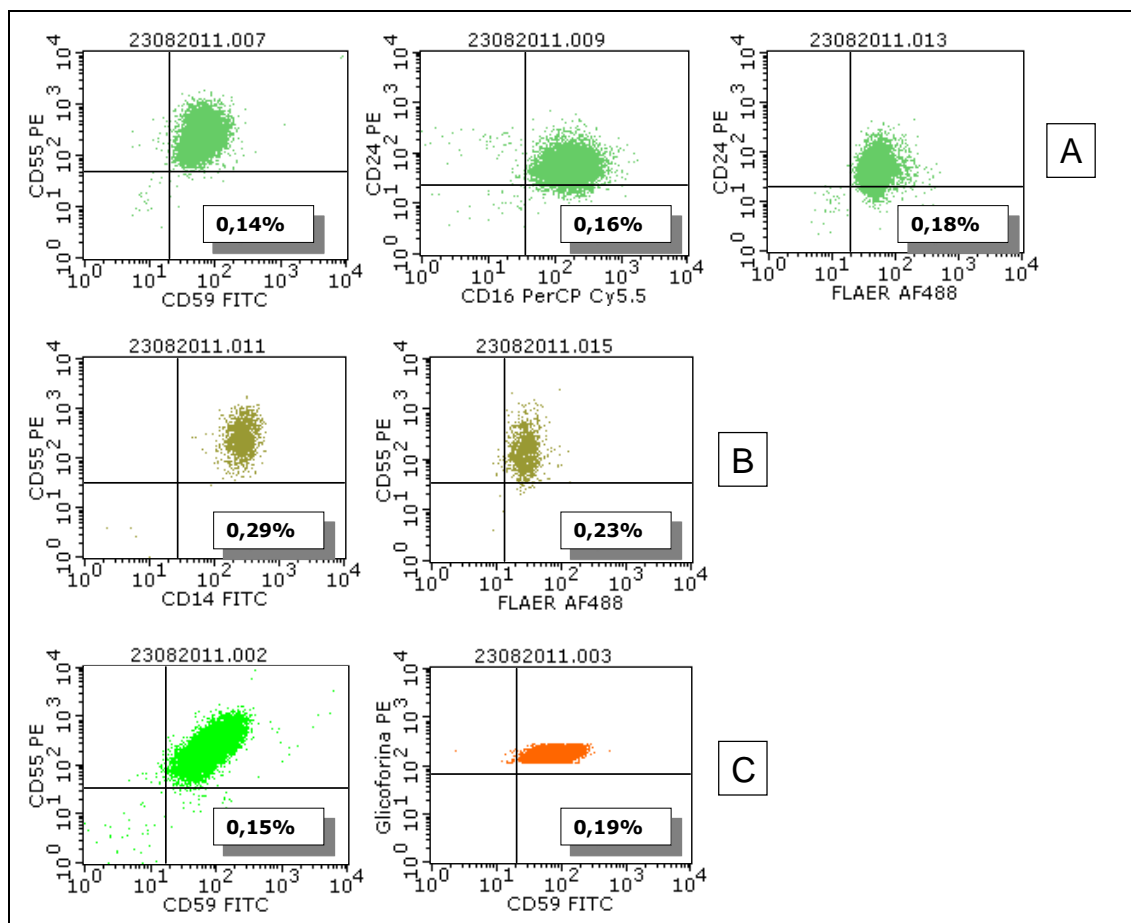
**Tabela 9** - Proporções de células HPN detectadas nas populações celulares estudadas, por combinações de reagentes. Resultados expressos em valor percentual (%)

| Casos | Neutrófilos                        |                                    |                                    | Monócitos                          |                                    | Hemácias                             |
|-------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
|       | CD59 <sup>-</sup> /55 <sup>-</sup> | CD24 <sup>-</sup> /16 <sup>-</sup> | FL <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> | CD14 <sup>-</sup> /55 <sup>-</sup> | FL <sup>-</sup> /CD55 <sup>-</sup> | CD59 <sup>-</sup> /Glic <sup>+</sup> |
| 1     | 0,14                               | 0,16                               | 0,18                               | 0,29                               | 0,23                               | 0,19                                 |
| 2     | 0,75                               | 1,47                               | 2,39                               | 7,87                               | 12,50                              | 2,86                                 |
| 3     | 28,15                              | 34,90                              | 23,26                              | 22,73                              | 24,36                              | 5,16                                 |
| 4     | 88,64                              | 65,43                              | 60,33                              | 50,53                              | 50,45                              | 28,09                                |
| 5     | 78,60                              | 94,84                              | 75,73                              | 81,18                              | 75,12                              | 14,42                                |

FL, FLAER; Glic, glicoforina

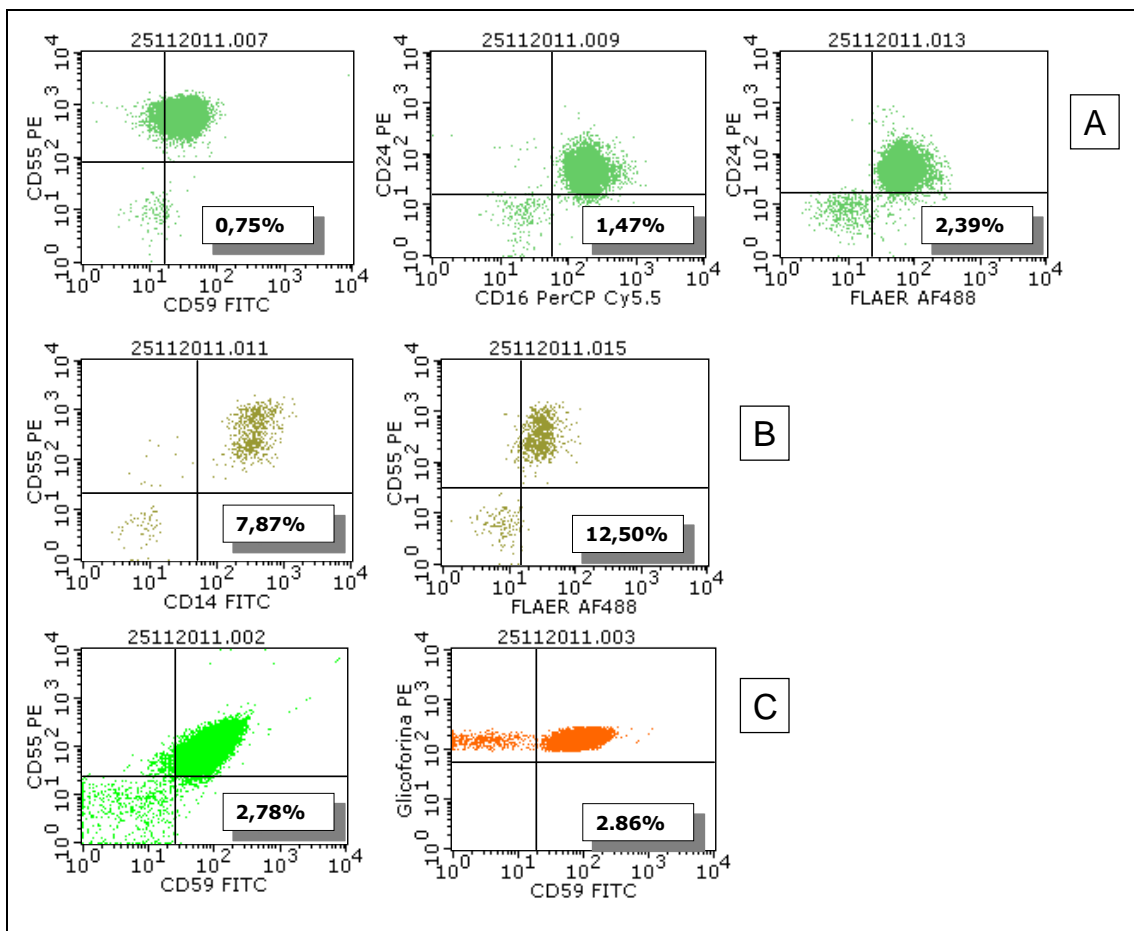
A seguir, são descritas as características clínicas e dados de evolução obtidos dos prontuários de atendimento dos pacientes positivos para a presença do clone HPN, e disponibilizadas as figuras ilustrativas (FIGURAS 9 a 13) das análises das amostras destes pacientes, seguindo a sequência descritiva utilizada na tabela anterior.

Caso 1: paciente feminina, 40 anos, com diagnóstico de AA grave, com 1 ano e 7 meses de evolução. Iniciou uso de medicamento imunossupressor ao final do primeiro ano de doença. Dependente de suporte transfusional, com registro de transfusão sanguínea realizada nos 3 meses que antecederam a coleta do material. Sem registro de complicações hemolíticas e/ou trombóticas.



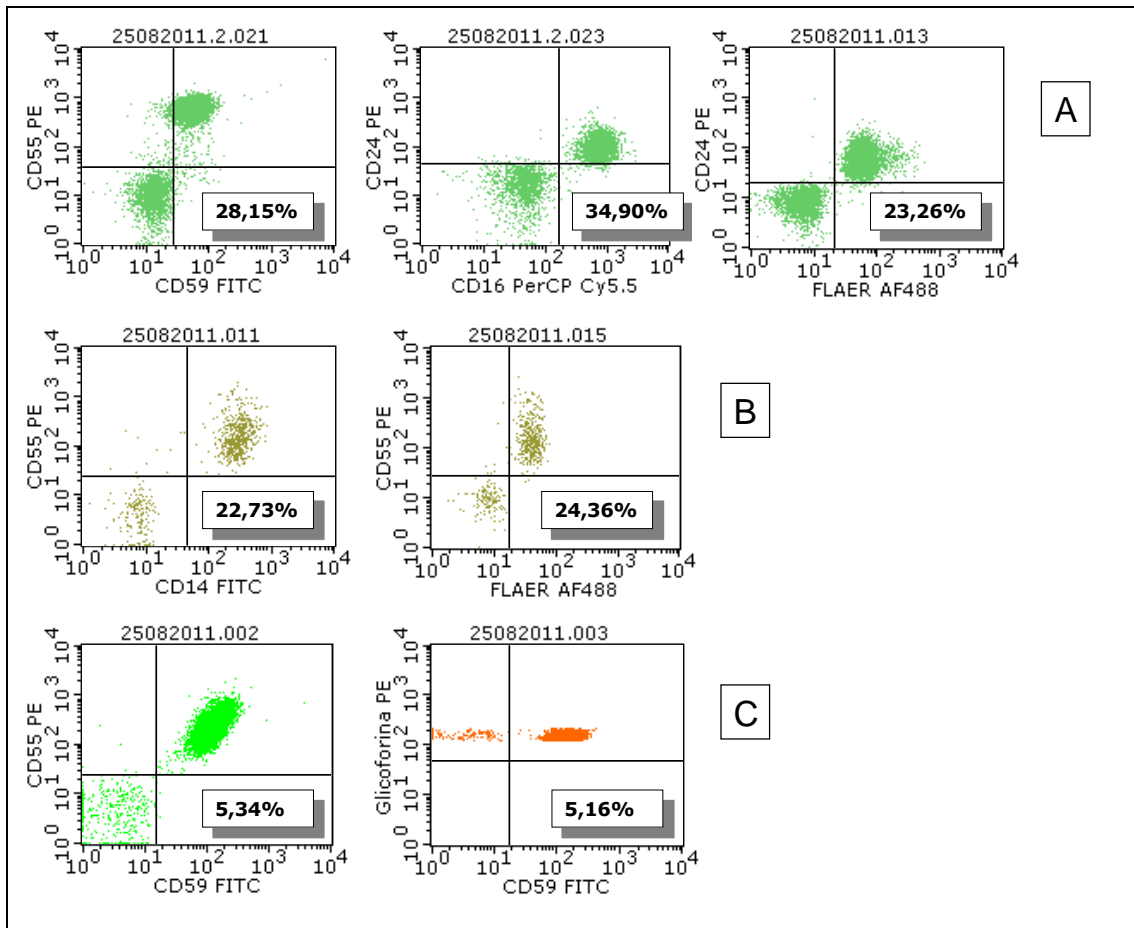
**Figura 9** - Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 1). As células HPN estão presentes em pequenas proporções nas 3 populações analisadas.

Caso 2: paciente feminina, 24 anos, com diagnóstico de AA não grave, com 12 meses de evolução. Ausência de registro de transfusões sanguíneas prévias, uso de medicamentos imunossupressores ou complicações hemolíticas e/ou trombóticas.



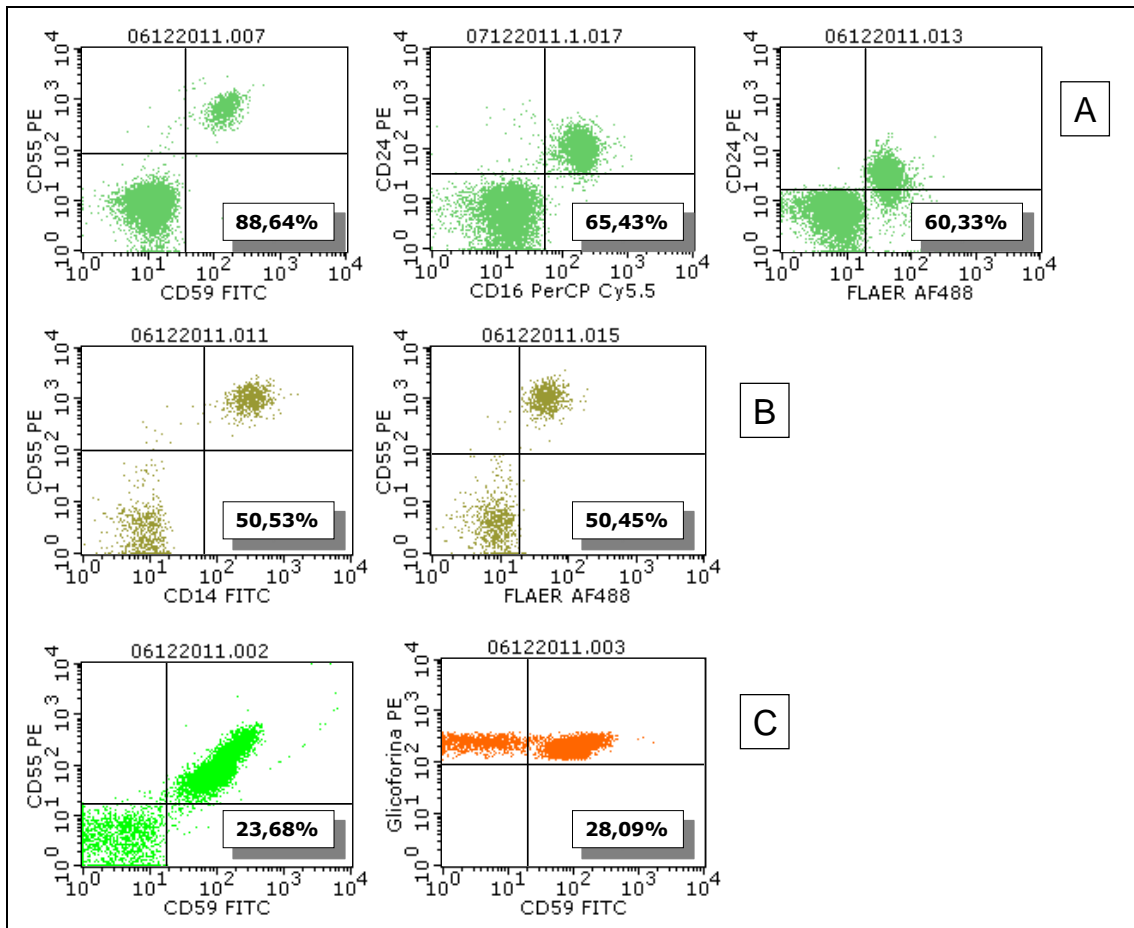
**Figura 10** - Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 2).

Caso 3: paciente feminina, 17 anos, com diagnóstico inicial de AA não grave, realizado no mês anterior à inclusão neste estudo, sem registro de ter recebido transfusões sanguíneas até então. Evolução com piora progressiva dos parâmetros hematológicos nos meses subsequentes, demandando uso de medicamentos imunossupressores e suporte transfusional. Ausência de registros, no prontuário de atendimento, referentes a manifestações clínicas ou laboratoriais de hemólise intravascular e/ou complicações trombóticas.



**Figura 11** - Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico de AA (caso 3).

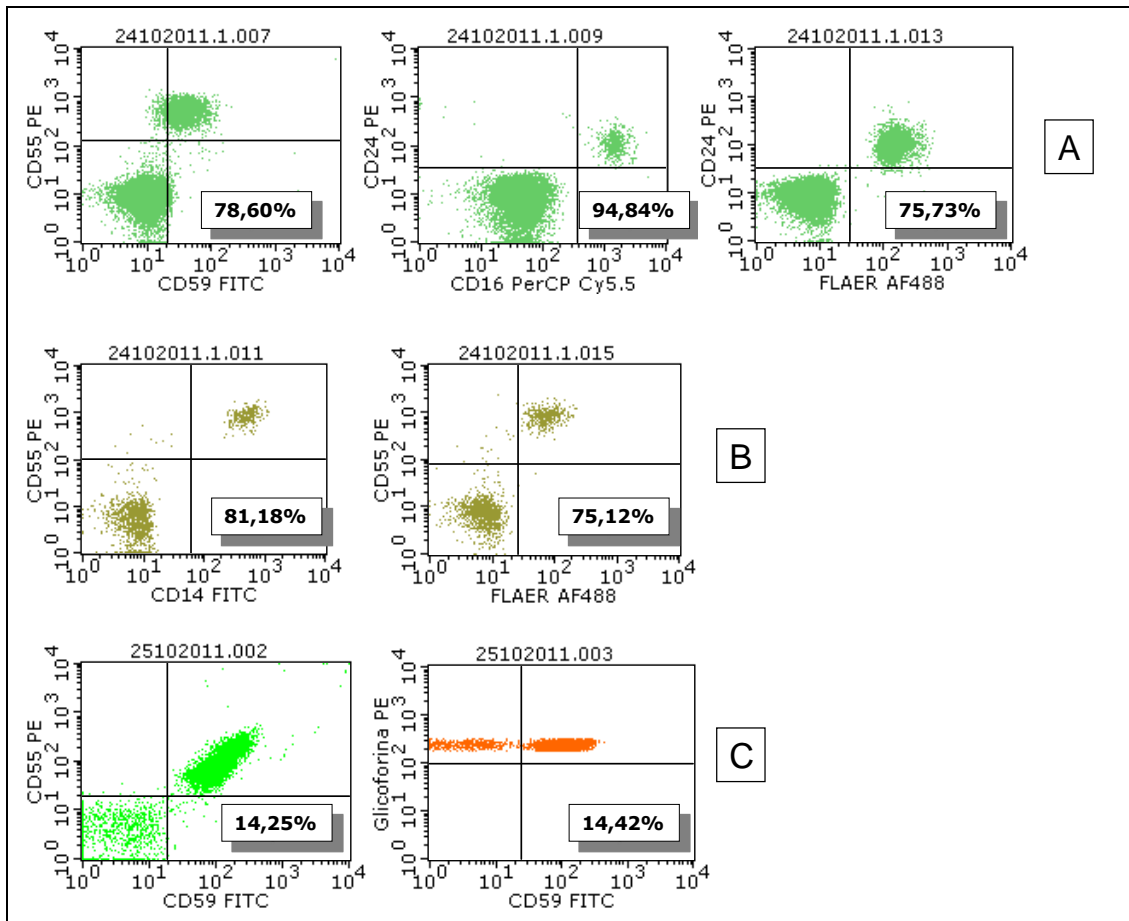
Caso 4: paciente feminina, 28 anos, com diagnóstico de AA grave, com 5 anos e 2 meses de evolução. Recebeu tratamento imunossupressor nos primeiros 6 meses após o diagnóstico da doença, tendo sido a medicação suspensa por ausência de resposta. Mantido suporte transfusional, com registro de transfusão sanguínea nos três meses que antecederam a coleta do material. Não foram encontrados relatos de manifestações clínicas de HPN clássica no prontuário de atendimento desta paciente. Realizado acompanhamento laboratorial com contagem de reticulócitos e dosagem de bilirrubina total e frações, dentro dos parâmetros da normalidade. Não foram encontrados outros dados laboratoriais referentes à pesquisa de hemólise intravascular.



**Figura 12** - Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 4). As células HPN estão presentes em grandes proporções nas populações de leucócitos e em menor proporção na população de hemácias.

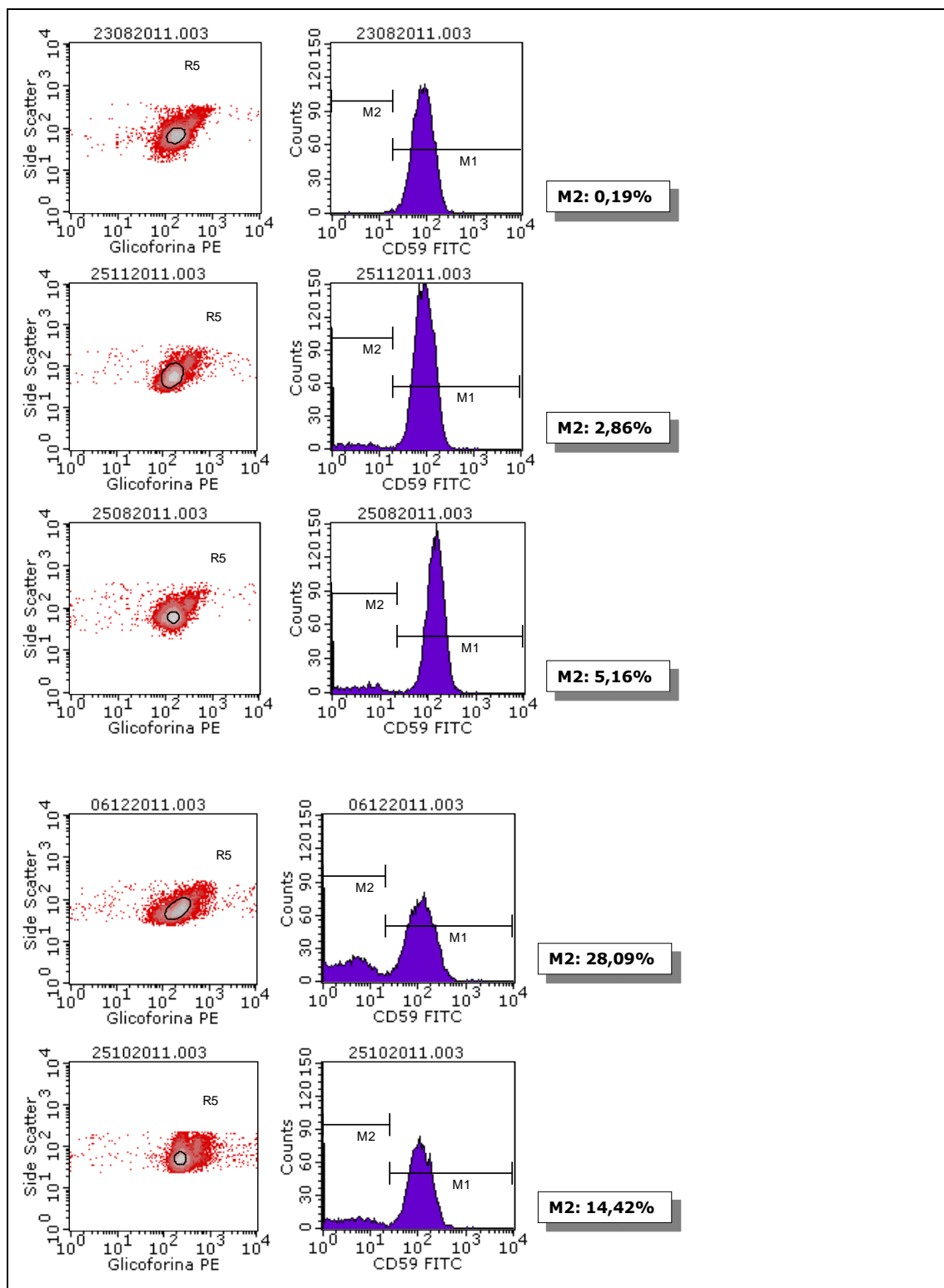
Caso 5: paciente masculino, 26 anos, incluído no estudo com 3 anos e 8 meses de evolução de AA grave, demonstrando excelente resposta ao tratamento imunossupressor até então, não tendo tolerado tentativa de retirada da medicação após 1 ano e 2 meses do diagnóstico da doença. Simultaneamente à detecção do clone HPN por citometria de fluxo, propiciada pela inclusão neste estudo, apresentou quadro clínico-laboratorial de hemólise intravascular, caracterizado por hematúria macroscópica, hemoglobinúria evidenciada em exames de urina rotina sequenciais, reticulocitose e elevação da enzima lactato-desidrogenase (LDH). Assim sendo, este paciente representou um caso de diagnóstico inicial de AA que evoluiu para Síndrome AA-HPN, com manifestação hemolítica. Não foram encontrados registros anteriores referentes à pesquisa do clone HPN no prontuário de atendimento

deste paciente, portanto não se pode inferir sobre a possível evolução de um clone HPN presente em menores proporções em período anterior ao da inclusão neste estudo.



**Figura 13** - Clone HPN detectado nas populações de neutrófilos (A), monócitos (B) e hemácias (C), em amostra de paciente com diagnóstico prévio de AA (caso 5). As células HPN estão presentes em grandes proporções nas populações de leucócitos e em menor proporção na população de hemácias.

Na análise das populações de hemácias das amostras positivas para a presença do clone HPN, não foi evidenciada separação entre células tipo II e tipo III (deficiência parcial ou completa de expressão das proteínas ancoradas ao GPI, respectivamente). Estas amostras revelaram apenas células tipo I e III, conforme ilustrado na FIGURA 14.

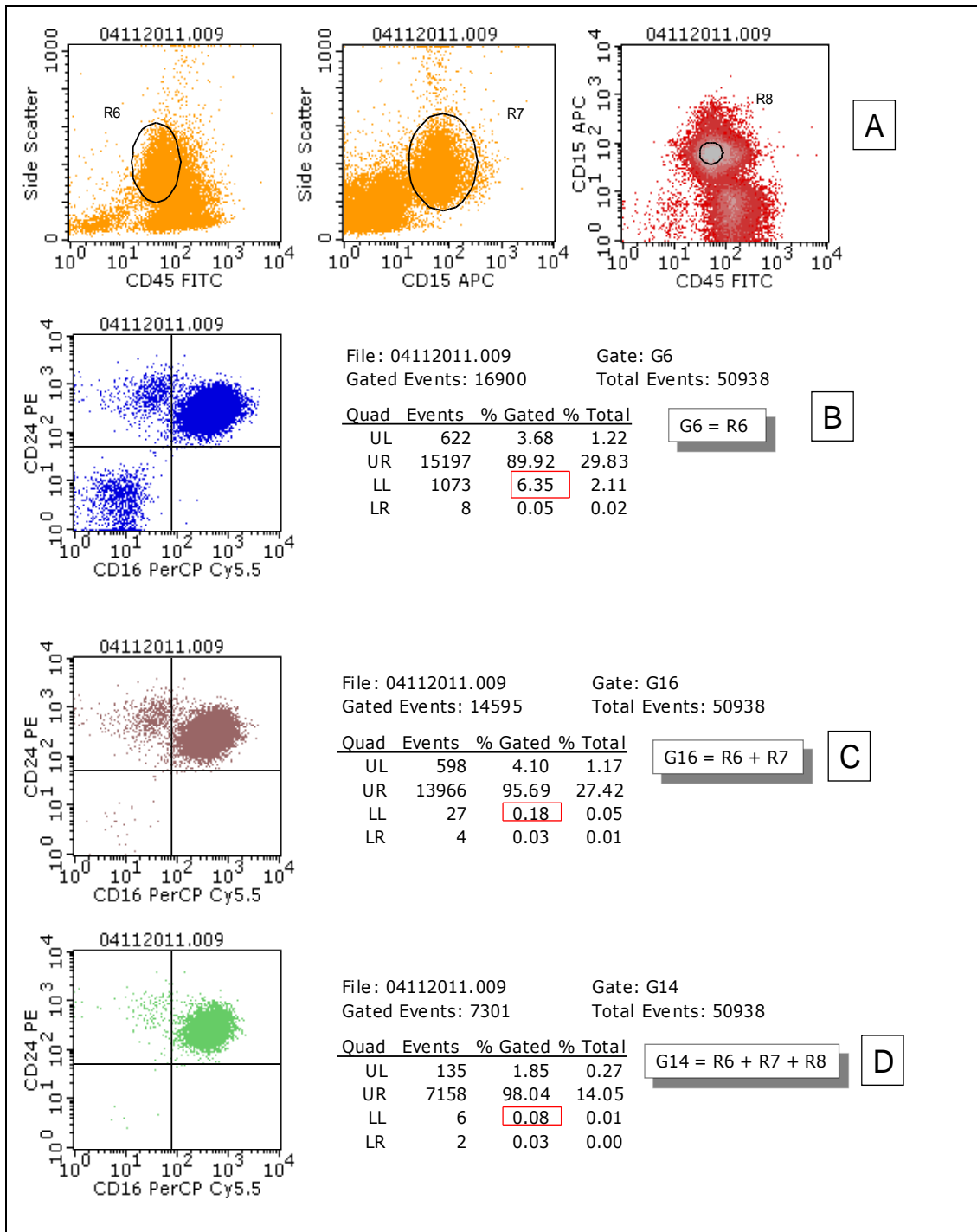


**Figura 14** - Análise por histograma das populações de hemácias das amostras positivas para a presença do clone HPN. Os histogramas evidenciam células tipo I e tipo III.

#### **4.3.4 Detecção das células com fenótipo HPN em pacientes com SMD**

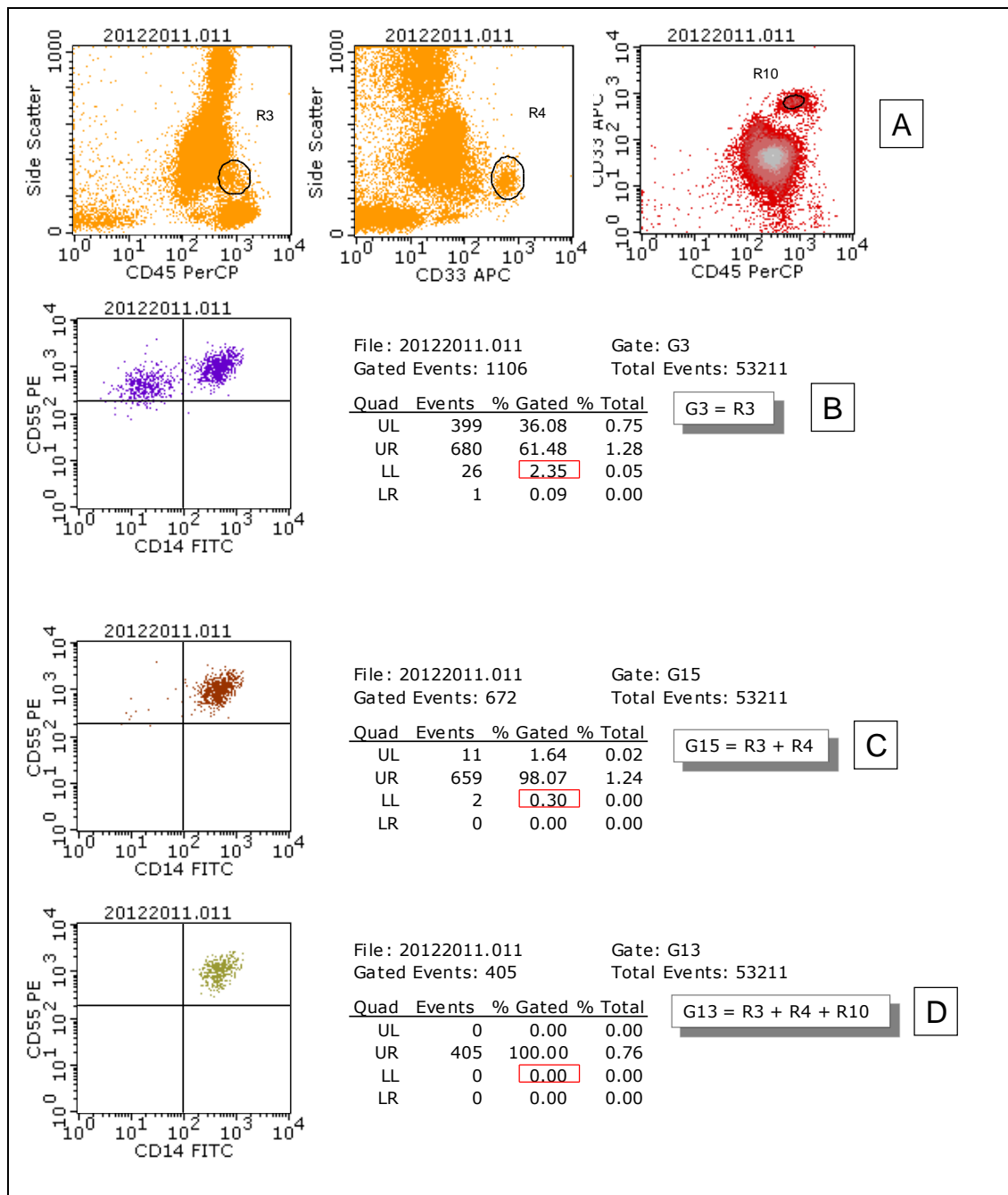
O clone HPN não foi identificado nas amostras avaliadas dos pacientes com diagnóstico de SMD. Entretanto, o estudo destas amostras permitiu evidenciar as dificuldades técnicas e definir os cuidados necessários para a análise das mesmas, em função da presença de células displásicas e imaturas circulantes no sangue periférico destes pacientes. No grupo estudado, neutrófilos hipogranulares, apresentando redução característica do parâmetro de complexidade interna (SSC), e/ou monócitos imaturos, com expressão reduzida do CD45, foram observados em 53% dos pacientes, determinando sobreposição de neutrófilos e monócitos no gráfico SSC/CD45. As FIGURAS 15 e 16 ilustram a sobreposição das populações celulares e a estratégia de *gating* em amostras de pacientes com SMD.

Na FIGURA 15, pode ser observado que a tentativa de separação de neutrófilos, utilizando somente os parâmetros de expressão do CD45 X SSC, determina contaminação do *gate* selecionado com monócitos (G6 = R6) e, conseqüentemente, a identificação errônea de eventos duplo-negativos para os marcadores de interesse, em proporções significativas (gráfico *dot plot* 15-B). A introdução do marcador de linhagem celular CD15 e a estratégia de análise por combinação de regiões, definidas pelos gráficos CD45 X SSC (G6 = R6) e CD15 X SSC (G7 = R7), sendo que G16 = R6 + R7, propiciam melhor seleção da população celular, entretanto ainda determinam o encontro de eventos duplo-negativos para os marcadores de interesse, em proporções superiores a 0,1% do total de eventos analisados. (gráfico *dot plot* 15-C). A seleção de uma terceira região, a partir da avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD15 em gráfico de densidade (G8 = R8), e a estratégia de combinação das três regiões para seleção da população de neutrófilos (G14 = R6 + R7 + R8), propiciam a seleção de população celular pura e a identificação precisa dos eventos duplo-negativos para os marcadores de interesse, permitindo alcançar o limite de sensibilidade analítica de 0,1%, estabelecido neste estudo (gráfico *dot plot* 15-D).



**Figura 15** - Estratégia de análise multiparamétrica para a seleção de neutrófilos nas amostras dos pacientes com SMD. (A) Definições dos *gates* para a seleção da população de neutrófilos a ser analisada, considerando a expressão do CD45 X SSC (R6) e CD15 X SSC (R7) em gráficos de distribuição pontual de fluorescência, e expressão do CD45 X CD15, em gráfico de densidade (R8). (B) Análise da expressão dos marcadores CD16 e CD24 em neutrófilos selecionados apenas pelos parâmetros SSC X expressão do CD45 (G6 = R6). (C) Análise da expressão dos marcadores CD16 e CD24 em neutrófilos selecionados pela combinação das regiões R6 + R7 (G16). (D) Análise da expressão dos marcadores CD16 e CD24 em neutrófilos selecionados pela combinação das regiões R6 + R7 + R8 (G14).

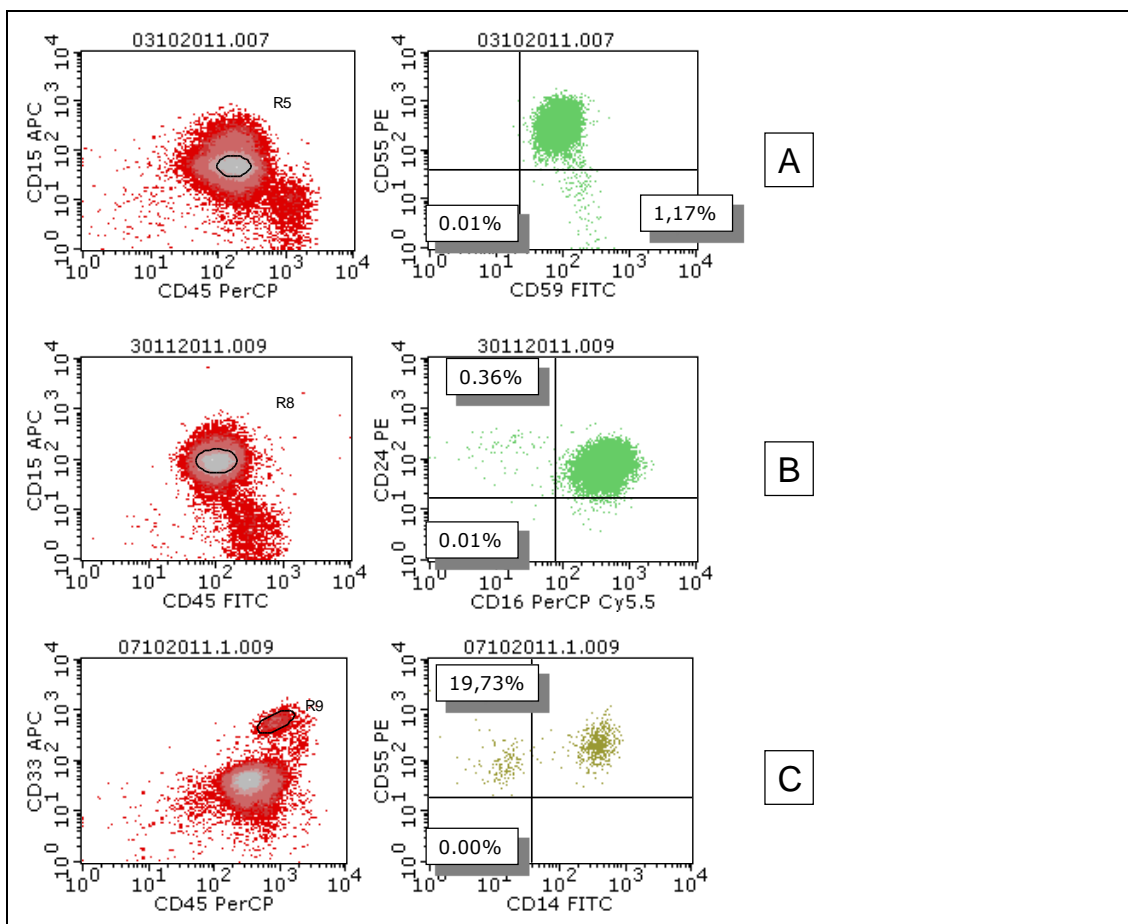
Na FIGURA 16, pode ser observado que a tentativa de separação de monócitos, utilizando somente os parâmetros de expressão do CD45 X SSC, determina contaminação do *gate* selecionado ( $G3 = R3$ ) e, conseqüentemente, a identificação errônea de eventos duplo-negativos para os marcadores de interesse, em proporções significativas (gráfico *dot plot* 16-B). A introdução do marcador de linhagem celular CD33 e a estratégia de análise por combinação de regiões, definidas pelos gráficos CD45 X SSC ( $G3 = R3$ ) e CD33 X SSC ( $G4 = R4$ ), sendo que  $G15 = R3 + R4$ , propiciam melhor seleção da população celular, entretanto ainda determinam o encontro de eventos duplo-negativos para os marcadores de interesse, em proporções superiores a 0,1% do total de eventos analisados (gráfico *dot plot* 16-C). A seleção de uma terceira região, a partir da avaliação conjunta da expressão dos marcadores CD45 X CD33 em gráfico de densidade ( $G10 = R10$ ), e a estratégia de combinação das três regiões para seleção da população de monócitos ( $G13 = R3 + R4 + R10$ ), propiciam a seleção de população celular pura e a identificação precisa dos eventos duplo-negativos para os marcadores de interesse, permitindo alcançar o limite de sensibilidade analítica de 0,1%, estabelecido neste estudo (gráfico *dot plot* 16-D).



**Figura 16** - Estratégia de análise multiparamétrica para a seleção de monócitos nas amostras dos pacientes com SMD. (A) Definições dos *gates* para a seleção da população de monócitos a ser analisada, considerando a expressão do CD45 X SSC (R3) e CD33 X SSC (R4) em gráficos de distribuição pontual de fluorescência, e expressão do CD45 X CD33, em gráfico de densidade (R10). (B) Análise da expressão dos marcadores CD14 e CD55 em monócitos selecionados apenas pelos parâmetros SSC X expressão do CD45 (G3 = R3). (C) Análise da expressão dos marcadores CD14 e CD55 em monócitos selecionados pela combinação das regiões R3 + R4 (G15). (D) Análise da expressão dos marcadores CD14 e CD55 em monócitos selecionados pela combinação das regiões R3 + R4 + R10 (G13).

Outro achado no grupo de pacientes com SMD foi a observação de células imaturas e/ou displásicas, apresentando redução de expressão dos

antígenos CD14, CD16 e/ou CD55, em 50% dos pacientes avaliados. A presença de células apresentando redução de expressão destes antígenos, isoladamente, não caracterizou o clone HPN, por não formar população duplamente negativa distinta, conforme ilustrado na FIGURA 17.

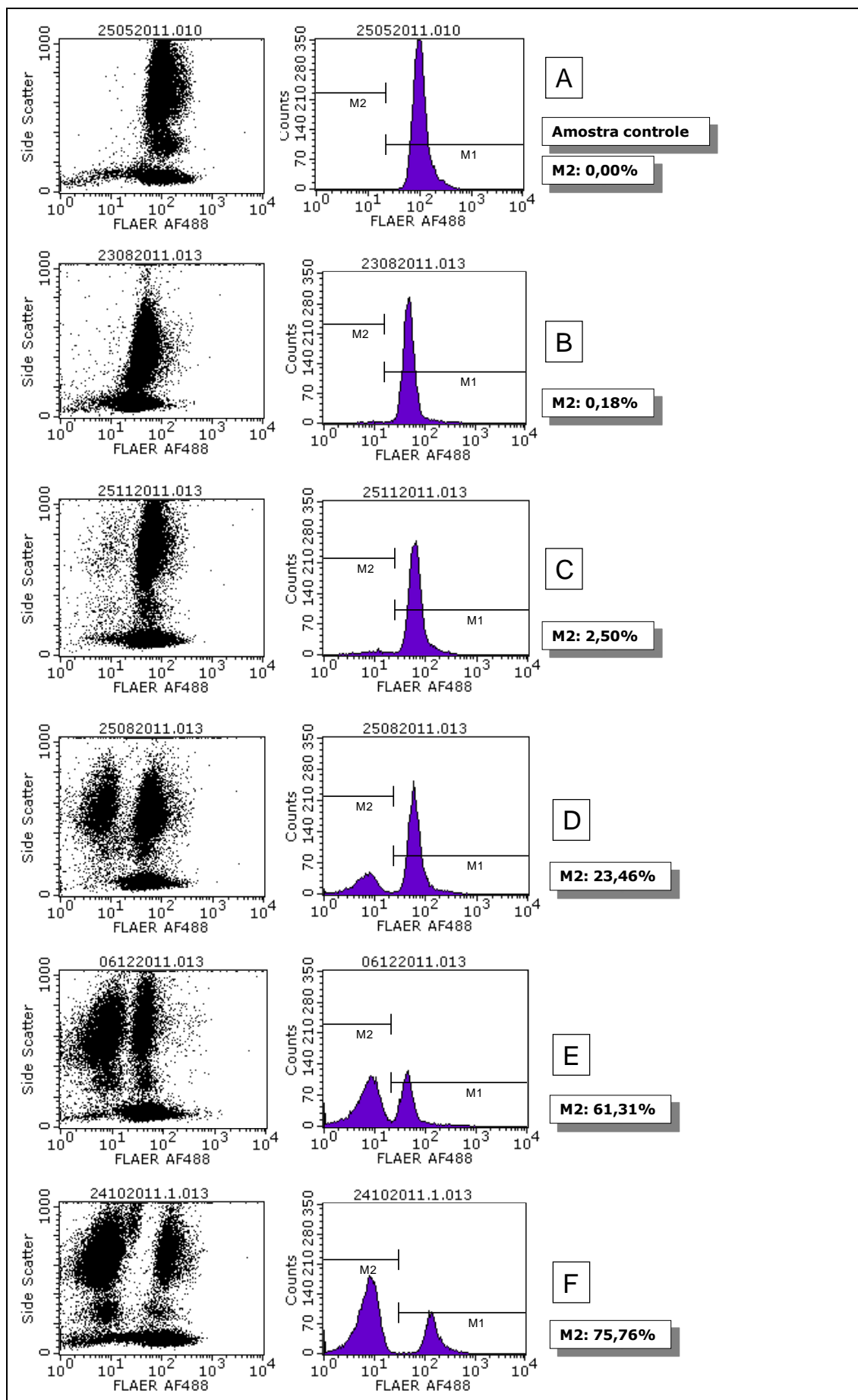


**Figura 17** - Figura ilustrativa de gráficos *dot plot* apresentando neutrófilos com redução isolada de expressão dos antígenos CD55 (A) e CD16 (B), e monócitos com redução isolada de expressão do antígeno CD14 (C), em pacientes distintos com diagnóstico de SMD.

#### 4.3.5 Reagente de aerolisina fluorescente (FLAER)

O reagente FLAER permite avaliação direta da expressão da âncora GPI em diferentes linhagens celulares, com a exceção das hemácias. Desta forma, avalia de maneira direta a consequência bioquímica das mutações do gene *PIG-A*.

Foi observada reação forte do FLAER com neutrófilos e monócitos, propiciando separação clara e precisa entre células normais e células que não apresentavam a âncora GPI. Nenhuma amostra do grupo controle ou do grupo de pacientes estudados mostrou discordância entre a marcação com FLAER e a expressão das proteínas ancoradas ao GPI analisadas. Como ilustrado na FIGURA 18, as cinco amostras do estudo identificadas como positivas para o clone HPN (gráficos B a F) mostraram a formação de duas populações celulares distintas na análise do FLAER. A performance adequada do reagente foi observada tanto na detecção de clones celulares grandes (gráficos D a F), quanto na detecção de clones celulares considerados pequenos, com proporção de células inferior a 1% (gráfico B). A taxa de *background* da população controle (neutrófilos e monócitos negativos para a marcação com FLAER, isoladamente, em indivíduos não portadores do clone HPN) variou de 0,00 a 0,25%, com média de 0,060 e mediana de 0,035 dos neutrófilos analisados e de 0,00 a 0,13%, com média de 0,022 e mediana de 0,00 dos monócitos analisados.



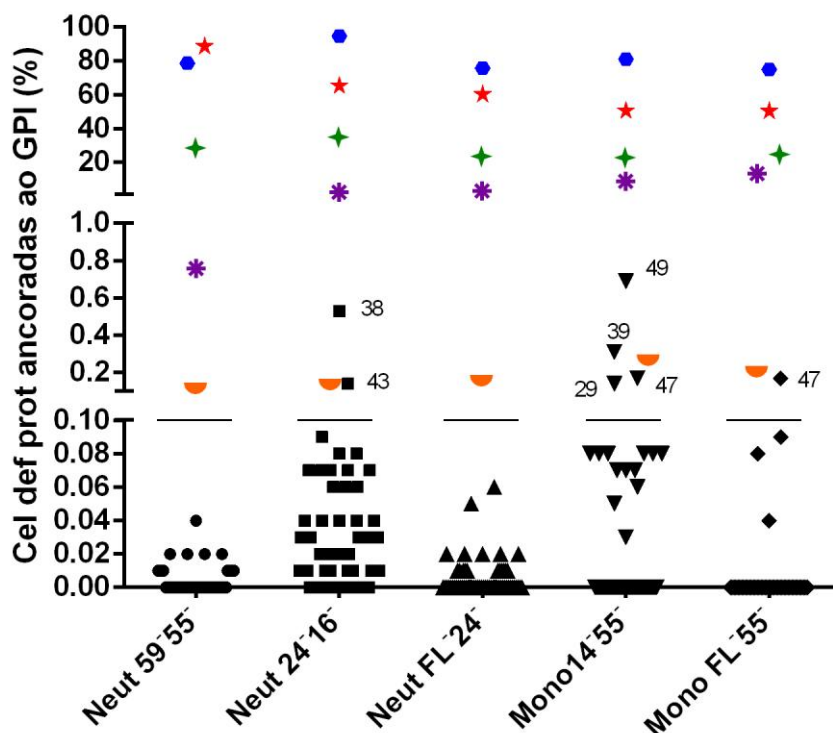
**Figura 18** – Gráficos de aquisição e histogramas ilustrativos da marcação de neutrófilos com FLAER em diferentes situações. A: Indivíduo do grupo controle. B e C: Detecção de clones HPN com pequenas proporções de células alteradas. D a F: Detecção de clones HPN maiores, com proporções crescentes de células alteradas. Os gráficos B a F representam a análise das cinco amostras do estudo identificadas como positivas para o clone HPN.

A capacidade do FLAER em detectar as células com fenótipo HPN não pôde ser estatisticamente comparada, de maneira isolada, com a capacidade de detecção dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo, em função da estratégia de análise utilizada, já descrita, de avaliação simultânea de dois reagentes (2 anticorpos monoclonais ou 1 anticorpo monoclonal e FLAER) em cada tubo. Entretanto, se comparados os tubos que avaliaram a marcação com FLAER associada à expressão dos antígenos CD24 e CD55 em neutrófilos e monócitos, respectivamente, com os tubos que avaliaram somente a expressão dos antígenos ancorados ao GPI, pode-se dizer que aqueles que incluíram o FLAER como reagente apresentaram melhor desempenho analítico, por apresentarem separação clara entre populações normais e alteradas e baixa frequência de resultados falso-positivos (apenas 1 tubo isolado apresentando 0,17% de monócitos alterados, em paciente não portador do clone HPN), como demonstrado na FIGURA 19, exibida na próxima seção.

#### ***4.3.6 Sinopse dos resultados relativos à detecção das células com fenótipo HPN nas amostras dos grupos controle e de pacientes (AA e SMD)***

A FIGURA 19 apresenta os resultados obtidos nas populações controle e de doentes, por combinações de reagentes, nas populações de neutrófilos e monócitos. Os grupos controle e de pacientes com SMD apresentaram células duplamente negativas para os marcadores estudados em cada tubo, em proporções inferiores a 0,1% e, portanto, foram considerados negativos para a presença do clone HPN, segundo os critérios de positividade estabelecidos anteriormente. Os pacientes definidos como positivos para a presença do clone apresentaram células com fenótipo HPN em proporções superiores a 0,1%, detectadas pelas diferentes combinações de reagentes utilizadas, nas populações de neutrófilos e monócitos. Seis pacientes apresentaram células

alteradas em proporções entre 0,1 e 1,0% em tubos isolados, não caracterizando a presença do clone HPN.



**Figura 19** - Resultados obtidos na pesquisa de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI nas amostras dos grupos controle e de doentes (anemia aplásica e síndrome mielodisplásica), por combinações de reagentes, nas populações de neutrófilos e monócitos. A barra em preto representa o ponto de corte escolhido (0,1%) para detecção das células com fenótipo HPN. Pacientes com o clone HPN estão representados por símbolos em cores. Pacientes que apresentaram células alteradas em proporções acima de 0,1% em tubos isolados, não características do clone HPN, estão representados por símbolos em preto, acima da barra, acompanhados pelos respectivos números de identificação do banco de dados.

#### **4.3.7 Comparação estatística entre as diferentes combinações de reagentes utilizadas para detecção das células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, nas populações de neutrófilos e monócitos**

Não houve diferença estatística entre as proporções de células com fenótipo HPN detectadas nas populações de monócitos e neutrófilos, pelas diferentes combinações de reagentes utilizadas, em estudo feito por meio de análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas.

Para avaliar a concordância (similaridade) entre os tamanhos dos clones detectados pelas diferentes combinações de reagentes em neutrófilos e

monócitos, foram calculados ainda os coeficientes de correlação de *Pearson*, após verificação da distribuição paramétrica dos dados. Os resultados, descritos na TABELA 10, confirmam a similaridade entre as proporções de células HPN detectadas, seguindo modelo de análise estatística utilizado por Richards e colaboradores (2000).

**Tabela 10** – Coeficientes de correlação de *Pearson* entre as proporções de células com fenótipo HPN, detectadas pelas diferentes combinações de reagentes utilizadas na análise de neutrófilos e monócitos

| <b>Combinações de reagentes comparadas</b> | <b>Coeficientes de correlação de <i>Pearson</i></b> | <b>Nível de significância</b> |
|--|---|-------------------------------|
| CD59/CD55 X CD24/CD16                      | 0,939   | 0,05                          |
| CD59/CD55 X FL/CD24                        | 0,970   | 0,01                          |
| CD59/CD55 X CD14/CD55                      | 0,911   | 0,05                          |
| CD59/CD55 X FL/CD55                        | 0,920   | 0,05                          |
| CD24/CD16 X FL/CD24                        | 0,992   | 0,01                          |
| CD24/CD16 X CD14/CD55                      | 0,989   | 0,01                          |
| CD24/CD16 X FL/CD55                        | 0,986   | 0,01                          |
| FL/CD24 X CD14/CD55                        | 0,983   | 0,01                          |
| FL/CD24 X FL/CD55                          | 0,983   | 0,01                          |
| CD14/CD55 X FL/CD55                        | 0,997   | 0,01                          |

FL, FLAER

## 5 DISCUSSÃO

A detecção de células hematopoiéticas deficientes em antígenos ancorados ao GPI, por citometria de fluxo, representa um teste diagnóstico específico para HPN, considerando que este perfil imunofenotípico não é visto em outras condições. Entretanto, para introdução do teste na rotina de um laboratório clínico, é necessário estabelecer padronização metodológica adequada, visando garantir sensibilidade analítica e acurácia na detecção das células com fenótipo HPN. A metodologia desenvolvida neste estudo foi padronizada seguindo as recomendações mais atuais da literatura, no que se refere à seleção dos reagentes, estratégia de análise e definição dos critérios de positividade do clone HPN. O estudo permitiu verificar que a estratégia de análise utilizada foi essencial para minimizar a ocorrência de resultados falso-

positivos e permitir a identificação precisa de pequenas populações de células com fenótipo HPN (clones pequenos). A análise multiparamétrica, incluindo o uso de marcadores de linhagem, propiciou a seleção de populações celulares puras, reduzindo a possibilidade de inclusão de outros eventos na região selecionada (células de outras linhagens, *debris*, eventos espúrios), os quais poderiam ser erroneamente interpretados como células deficientes em expressão dos marcadores estudados e, portanto, representantes do clone HPN. Considerar a população duplo-negativa em gráficos *dot plot* promoveu maior discriminação e acurácia na identificação de pequenas populações celulares alteradas, corroborando as recomendações publicadas, que ressaltam a importância de demonstrar a deficiência simultânea de dois antígenos ancorados ao GPI na mesma célula (RICHARDS *et al.*, 2007; BOROWITZ *et al.*, 2010). Assim, reduções ou perdas parciais de expressão de um marcador isolado não foram caracterizadas como fenótipo HPN.

O clone HPN foi identificado em 25% dos pacientes com diagnóstico de AA incluídos no presente estudo. A frequência observada é condizente com os dados da literatura, que descreve o encontro de células HPN em 22 a 68% dos pacientes com AA (DUNN *et al.*, 1999; MACIEJEWSKI *et al.*, 2001; MUKHINA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001; ISHIYAMA *et al.*, 2003; SUGIMORI *et al.*, 2006; SUGIMORI *et al.*, 2009; SCHEINBERG *et al.*, 2010). Esta variabilidade de prevalência ocorre, provavelmente, em função das diferenças metodológicas entre os testes utilizados, que definem diferentes limites de sensibilidade analítica. A elevada frequência de 68% foi obtida em estudo publicado por Sugimori e colaboradores (2006), em análise de 122 pacientes, utilizando metodologia que apresentava limite inferior de detecção do clone de 0,003% em granulócitos. Assim, foi observada proporção de granulócitos HPN abaixo de 0,1% em mais de 40% dos pacientes com o clone. Nosso estudo não alcançou limite tão baixo de detecção das células HPN, o que pode explicar a frequência de positividade encontrada nos pacientes com AA. Considerando que foram analisadas amostras de 20 dentre 27 pacientes com AA em acompanhamento no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas/UFMG no período compreendido entre julho e dezembro de 2011 (74,1% dos pacientes), torna-se possível extrapolar a prevalência encontrada de

portadores do clone HPN no grupo de pacientes com AA (25%) para a população de pacientes com AA atendidos pelo referido serviço.

É importante ressaltar que os cinco pacientes considerados positivos para a presença do clone tiveram células HPN identificadas por todas as combinações de reagentes utilizadas e nas 3 populações celulares estudadas (hemácias, neutrófilos e monócitos), o que reforça a real presença destas células e indica que o teste apresenta acurácia na detecção e quantificação das células com fenótipo HPN, mesmo quando presentes em pequenas proporções.

Cabe considerar que amostras de sangue periférico de pacientes com AA podem se mostrar extremamente leucopênicas e neutropênicas, o que pode conferir dificuldade técnica adicional no processamento das mesmas. Em duas das 20 amostras avaliadas, não foi possível obter 50.000 leucócitos para análise em todos os tubos do painel, conforme padronizado.

Na análise de hemácias, o uso da glicoforina foi considerado essencial para excluir eventos não celulares e *debris*, propiciando alcançar menores limites de detecção do clone, assim como observado por Sutherland e colaboradores (2009). O tubo que avaliou a expressão simultânea dos antígenos CD55 e CD59 nestas células, mas sem o uso da glicoforina para seleção da população, apresentou taxas de *background* mais elevadas nas amostras do grupo controle, como demonstram os valores calculados de média, DP e percentis 95 e 100 apresentados na TABELA 7. O limite inferior de detecção de 0,1% não foi alcançado neste tubo e, portanto, pode-se dizer que apresentou pior desempenho que o tubo que avaliou somente a expressão do CD59 em hemácias selecionadas pelo marcador de linhagem. A alta diluição da glicoforina utilizada (1:200) foi necessária para evitar aglutinação celular e, ainda assim, permitiu marcação específica e separação precisa das hemácias.

Nas amostras com clone HPN detectável, não foram identificadas hemácias com deficiência parcial das proteínas ancoradas ao GPI (células tipo II). Como ilustrado na FIGURA 14, foram evidenciados somente dois picos distintos nos histogramas de análise, representando as células tipo I (expressão antigênica normal) e tipo III (deficiência completa das proteínas ancoradas ao GPI). É possível que a não detecção de células tipo II tenha ocorrido em função do pequeno número de pacientes que apresentaram o

clone HPN na população estudada. Hill e colaboradores (2007), em revisão da literatura, descreveram que somente 40% dos pacientes com clone HPN apresentam a combinação de células tipos I, II e III e Madkaikar e colaboradores (2009) relataram variação importante na distribuição destas populações celulares dentre os pacientes. Acrescentaram ainda que a separação entre os tipos celulares nem sempre é clara, podendo haver sobreposição entre células tipo II e hemácias residuais normais, sendo que a distinção das células tipo II é variável em função do marcador escolhido (CD59 propicia melhor separação do que CD55) e, segundo Borowitz e colaboradores (2010), inclusive em função do clone do anticorpo monoclonal utilizado. Dados semelhantes foram publicados por Hall e colaboradores (1996) a partir do estudo de 54 pacientes com HPN, dos quais 50% apresentaram hemácias tipo II, melhor demonstradas pelo anticorpo anti-CD59.

Em 3 dos 5 pacientes que apresentaram o clone HPN, o percentual de hemácias afetadas foi significativamente menor do que o percentual de leucócitos deficientes em proteínas ancoradas ao GPI (dados apresentados na TABELA 9). Este achado está de acordo com os dados da literatura, que o justificam em função da destruição das hemácias com fenótipo HPN mediada pelo complemento (hemólise intravascular) e pelas transfusões sanguíneas, muitas vezes necessárias como tratamento, que determinam diluição e consequente redução da proporção de hemácias HPN (SUTHERLAND *et al.*, 2009; BOROWITZ *et al.*, 2010). Sutherland e colaboradores (2009), em análise de 536 amostras, observaram menores proporções de hemácias afetadas mesmo em pacientes que não haviam recebido transfusões sanguíneas prévias e descreveram clones de leucócitos em amostras que não apresentavam hemácias HPN. Entretanto, não detectaram clones significativos de hemácias na ausência de clones de leucócitos. Dessa forma, em concordância com os achados de outros autores (PIEDRAS *et al.*, 2000; BRODSKY, 2009; SUTHERLAND *et al.*, 2009), nosso estudo confirmou que as proporções de neutrófilos e monócitos deficientes em proteínas ancoradas ao GPI representam de maneira mais acurada o tamanho do clone HPN, em relação às hemácias.

A análise de monócitos mostrou ser tecnicamente difícil em função do número habitualmente pequeno destas células circulantes, especialmente nos

pacientes pancitopênicos. Como esperado, o número médio de monócitos selecionados para análise nos grupos controle e de doentes foi significativamente menor em relação ao número médio de neutrófilos analisados, conforme descrito na seção 4.3.2 deste trabalho, o que pode ter contribuído para a redução da acurácia da pesquisa de células HPN nesta linhagem celular e propiciado o encontro de proporções superiores a 0,1% de monócitos alterados em tubos isolados, sem, entretanto, caracterizar a presença do clone HPN. Esta foi uma possível justificativa encontrada para os resultados obtidos em cinco dos sete tubos isolados que apresentaram células duplo-negativas para os marcadores analisados em proporções superiores ao ponto de corte, sem caracterizar o clone (dados representados na FIGURA 19). As populações de monócitos selecionadas para análise nestes tubos foram pequenas (291 a 712 células; média: 497). Assim, apenas 1 ou 2 eventos localizados no quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* representaram proporções superiores a 0,1% em relação ao total de células analisadas. Entretanto, estes eventos não formaram aglomerados consistentes e estes achados não foram reproduzidos em outros tubos. Desta forma, estes resultados isolados não caracterizaram a presença de células com fenótipo HPN e foram considerados falso-positivos.

Diante das limitações colocadas em relação às análises de hemácias e monócitos, foi possível comprovar que os neutrófilos representam a população celular mais adequada para pesquisa das células com fenótipo HPN, por estarem habitualmente presentes em número significativo, não sofrerem interferência por episódios hemolíticos e transfusões prévias e por permitirem avaliação acurada da proporção de células afetadas. Entretanto, de acordo com as recomendações da literatura, a análise de hemácias e monócitos deve ser realizada concomitantemente. Esta indicação persiste principalmente em função da necessidade de detectar a deficiência de expressão das proteínas ancoradas ao GPI em duas linhagens celulares distintas para a definição do clone HPN. A análise de hemácias permite, adicionalmente, a possível distinção entre células tipos II e III e, ainda, tem sido utilizada no acompanhamento dos pacientes em uso do Eculizumab. A distinção entre os subtipos de hemácias pode trazer informação clínica útil, pois a presença de células tipo III em proporções superiores a 20% está mais frequentemente

associada a quadros de hemólise intravascular clinicamente manifesta, enquanto populações grandes de hemácias tipo II, na ausência de células tipo III, habitualmente determinam sintomatologia mais discreta (PARKER *et al.*, 2005; BOROWITZ *et al.*, 2010). No acompanhamento do tratamento com Eculizumab, o aumento da proporção de hemácias HPN em testes sequenciais indica resposta adequada ao medicamento, em função da redução da destruição das hemácias afetadas e diminuição das necessidades transfusionais (RICHARDS *et al.*, 2007).

Dentre as populações leucocitárias analisadas, monócitos e neutrófilos mostraram proporções similares de células com fenótipo HPN, considerando os resultados dos 5 pacientes positivos para a presença do clone, de acordo com as análises estatísticas realizadas, descritas na seção 4.3.7. Foi observado, de acordo com os dados apresentados na TABELA 10, que os cálculos das correlações de *Pearson* evidenciaram correlação forte ( $0,7 \leq r \leq 1,0$ ), quando os resultados obtidos nos diferentes tubos foram comparados entre si, o que significa que as proporções de células com fenótipo HPN detectadas em neutrófilos e monócitos, pelas diferentes combinações de reagentes, são similares. Entretanto, ao observar os resultados obtidos nos diferentes tubos em cada um dos pacientes, individualmente, pode ser verificado que o paciente identificado como “caso 2” apresentou proporção visivelmente maior de monócitos alterados em relação aos neutrófilos. Situação semelhante foi descrita por Sutherland e colaboradores (2007), não tendo sido encontradas justificativas para tal.

Embora todas as combinações de marcadores tenham se mostrado efetivas em detectar o clone, foi observado que os anticorpos monoclonais dirigidos aos antígenos CD16 e CD24 (neutrófilos), CD14 (monócitos) e o reagente FLAER (neutrófilos e monócitos) identificaram células HPN com maior distinção, promovendo separação clara entre populações normais e deficientes nas proteínas ancoradas ao GPI. O mesmo não foi observado em relação aos marcadores CD59 (neutrófilos) e CD55 (neutrófilos e monócitos), em concordância com os dados descritos por Hernández-Campo e colaboradores (2006). A variabilidade observada com a marcação de CD55 e CD59 em leucócitos pode ter sido resultante do número variável de hemácias nas amostras e da escolha do protocolo “corar-lisar-lavar” para o processamento

das mesmas. Em função dos antígenos CD55 e CD59 serem expressos em hemácias e leucócitos, alguns autores recomendam realizar a lise das hemácias antes de marcar os leucócitos (protocolo “lisar-lavar-corar”), com os objetivos de reduzir a quantidade de reagente necessária e alcançar melhores padrões de expressão antigênica. Entretanto, como afirmam Borowitz e colaboradores (2010), a maioria dos ensaios para pesquisa de antígenos ancorados ao GPI é realizada pelo protocolo de primeiro corar e depois lisar, porque as características físicas de dispersão da luz, úteis para adequada separação das populações estudadas, são melhor preservadas, em relação ao protocolo em que as amostras são primeiramente lisadas e depois coradas. Madkaikar e colaboradores (2009) acrescentam ainda que a solução de lise com fixador pode determinar ligação inespecífica dos anticorpos aos neutrófilos e conseqüente falha na detecção do clone HPN. Assim, a escolha do protocolo “corar-lisar-lavar” foi baseada nestes aspectos, considerando o benefício de uso da solução de lise da rotina em um protocolo único para análise dos diversos marcadores incluídos no painel.

O benefício de uso do reagente FLAER para detecção de células com fenótipo HPN tem sido descrito por vários autores. Ele oferece discriminação clara entre células normais e alteradas (BRODSKY *et al.*, 2000; RICHARDS *et al.*, 2007) e, como marca a âncora GPI, é superior em situações onde um ou mais marcadores de superfície ligados a esta molécula de ancoragem apresentam expressão reduzida, podendo sugerir erroneamente a presença de células com fenótipo HPN (BATTIWALLA *et al.*, 2010). Este estudo permitiu verificar o bom desempenho do reagente, ao propiciar, de fato, separação clara e distinta entre células normais e alteradas. Os tubos que incluíram o FLAER como reagente na análise de neutrófilos e monócitos apresentaram resultados concordantes com os tubos que utilizaram somente anticorpos monoclonais como reagentes. O FLAER apresentou acurácia na detecção de clones grandes e pequenos, como descrito anteriormente e ilustrado na FIGURA 18. O reagente adquirido na formulação líquida apresentou excelente estabilidade em temperaturas entre 4 a 8°C, assim como os anticorpos monoclonais, e foi considerado como de fácil manuseio.

A não detecção de células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI nos pacientes portadores de SMD pode ter sido conseqüência da menor

frequência do clone HPN nesta população, como descrito por vários autores (MACIEJEWSKI *et al.*, 2001; OKAMOTO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; SUGIMORI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009), aliado ao fato do número relativamente pequeno de pacientes analisados. É válido ressaltar ainda que dentre os 30 pacientes com SMD, 25 apresentavam doença de baixo risco (IPSS baixo ou Intermediário-1), mas apenas 2 foram classificados morfológicamente como portadores de anemia refratária, sendo este o subgrupo que mais frequentemente apresenta o clone, segundo relatos da literatura (OKAMOTO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; ISHIYAMA *et al.*, 2003; SUGIMORI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009). O número de pacientes com diagnóstico de SMD analisados não foi considerado representativo do total de pacientes com SMD atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas/UFMG (30 pacientes incluídos dentre aproximadamente 80 pacientes em acompanhamento) e, portanto, o achado referente à não detecção do clone HPN no grupo estudado não pode ser extrapolado para a população de pacientes com SMD atendida pelo referido serviço.

Apesar das amostras dos pacientes com SMD não terem revelado a presença do clone HPN neste estudo, foi possível reconhecer as dificuldades técnicas inerentes à análise destas amostras e definir estratégias para superar estas dificuldades. Conforme colocado anteriormente, é conhecido que a hipogranulação de neutrófilos, a presença de células mielóides imaturas (linhagens granulocítica e monocítica) e as alterações imunofenotípicas intrínsecas à doença dificultam sobremaneira a separação precisa das populações celulares a serem analisadas nas amostras dos pacientes com SMD (WANG *et al.*, 2009). Foi observado que, para superar a dificuldade de separação das populações de neutrófilos e monócitos nestas amostras, é essencial a utilização dos marcadores de linhagem celular, como anteriormente descrito, e a utilização de estratégias apropriadas para a seleção rigorosa das populações. As FIGURAS 15 e 16 ilustram o impacto da análise da expressão das proteínas ancoradas ao GPI em populações de neutrófilos e monócitos selecionadas segundo a estratégia multiparamétrica utilizada neste trabalho ou selecionadas somente pelos parâmetros de complexidade interna (SSC) e expressão do CD45 ou complexidade interna (SSC) e expressão do CD15 e CD33, respectivamente. Ficou claramente demonstrado nestas figuras, que o

uso da estratégia de análise por combinações de regiões permite a seleção de populações celulares puras e, assim, propicia alcançar menores limites de detecção de células HPN. O mesmo não acontece ao utilizar critérios menos rigorosos para a seleção das populações celulares, pois outros eventos são incluídos no *gate* de análise, podendo ser erroneamente interpretados como clone HPN (quadrante inferior esquerdo dos gráficos *dot plot* das figuras 15-B, 15-C, 16-B e 16-C).

Entretanto, apesar da estratégia de seleção de populações utilizada, foi evidenciada deficiência simultânea de expressão dos marcadores CD24/CD16 em 0,53% dos neutrófilos em uma amostra de paciente com SMD, não portador do clone HPN. Neste caso, a deficiência de expressão de proteínas ancoradas ao GPI não foi evidenciada em outros tubos. Esta amostra apresentava sobreposição importante de granulócitos e monócitos, devido à redução significativa do parâmetro de complexidade interna em neutrófilos e expressão fraca do CD45 em monócitos. Sendo assim, acredita-se que um pequeno número de monócitos, inseparáveis dos neutrófilos, tenha sido incluído no *gate* de análise. Como monócitos apresentam fenótipo CD24-/CD16-, determinaram a ocorrência do achado falso positivo neste tubo. Este dado está representado na FIGURA 19. Um segundo resultado falso-positivo em tubo isolado pode ser verificado nesta figura, na análise da expressão dos marcadores CD24 e CD16 em neutrófilos (0,14% de células alteradas). Este resultado espúrio foi associado a questões técnicas que determinaram reação inadequada do CD24.

Na análise de amostras de pacientes com SMD, é importante considerar ainda que as proteínas ancoradas ao GPI podem variar em expressão de acordo com o estágio de maturação celular (DUNN *et al.*, 1999). Hernández-Campo e colaboradores (2007), em análises de amostras medulares de indivíduos saudáveis, demonstraram que a expressão do CD55 aumenta progressivamente do estágio promielocítico em direção aos neutrófilos maduros; que a expressão do CD16 é maior em bastonetes e neutrófilos maduros se comparada a mielócitos e metamielócitos; e que a expressão do CD24 é ausente nos precursores neutrofílicos precoces, aumenta progressivamente até o estágio mielocítico e sofre redução posterior em direção aos estágios de bastonetes e neutrófilos maduros. De maneira semelhante, foi demonstrado que monócitos maduros apresentam maior

expressão do CD14 e do CD55 do que células precursoras monocíticas. Como os pacientes com SMD apresentam frequentemente células imaturas e displásicas circulantes, a análise isolada destes marcadores nas respectivas populações celulares pode determinar a ocorrência de resultados falso-positivos para a presença do clone HPN. A estratégia de avaliar conjuntamente a expressão de dois marcadores em cada tubo e considerar como representantes do clone HPN apenas as células que são negativas para ambos, simultaneamente, se mostrou eficaz em reduzir este risco, aumentando a precisão e a especificidade analíticas, como ilustrado na FIGURA 17. Em relação aos demais marcadores e reagentes incluídos no painel de análise deste estudo, cabe considerar que não são descritas diferenças significativas de expressão do CD59 durante os diferentes estágios de maturação dos neutrófilos (população em que este marcador foi avaliado) e a marcação com FLAER não sofre interferência relacionada ao estágio de maturação celular, pois o reagente se liga diretamente à âncora GPI.

Este estudo não pôde avaliar o clone HPN como preditor de resposta à imunossupressão, pois, para isso, o clone deveria ter sido pesquisado em pacientes recém-diagnosticados, antes de iniciado o tratamento imunossupressor e, então, estabelecida a correlação com resposta subsequente ao tratamento. Neste trabalho, somente um paciente teve o clone HPN detectado por citometria de fluxo prontamente após o diagnóstico da AA (intervalo de 1 mês) e, portanto, antes de iniciar tratamento medicamentoso. Entretanto, não foi acompanhado prospectivamente, por não ter sido este o objetivo do estudo. Os demais apresentaram tempo de evolução da doença variável, quando da detecção do clone HPN, com média de 34 meses (faixa: 12 – 62 meses), sendo que 3 dos 4 pacientes estavam em uso ou haviam feito uso prévio de imunossupressores.

Em relação à comparação entre os dois protocolos de aquisição realizados (aquisição de 50.000 e 100.000 eventos), foi observado, de acordo com os dados apresentados na TABELA 8, que os cálculos das correlações de *Spearman* evidenciaram correlação moderada ( $0,4 \leq r_s < 0,7$ ) a forte ( $0,7 \leq r_s < 1,0$ ) para os tubos CD59/CD55, CD24/CD16, FLAER/CD24 e FLAER/CD55, em todos os subgrupos avaliados, o que significa que não houve superioridade do protocolo de aquisição de 100.000 eventos sobre o protocolo de aquisição de

50.000 eventos. O tubo proposto para avaliar a expressão dos marcadores CD14 e CD55 em monócitos mostrou correlação moderada e forte nos subgrupos “geral” e “AA”, respectivamente, mas correlação fraca ( $0 < r_s < 0,4$ ) nos subgrupos “SMD”, “faixa 0 a 1.0%” e “faixa 0 a 0,1%”. Estes resultados podem ser justificados pela dificuldade, já descrita neste trabalho, de separação das populações de neutrófilos e monócitos em parte das amostras dos pacientes com SMD, o que pode gerar resultados imprecisos e, principalmente, pelo pequeno número de monócitos selecionados para análise em algumas destas amostras, em função do número sabidamente menor de monócitos circulantes. Assim, pode-se inferir que o protocolo de aquisição de 100.000 leucócitos provavelmente possibilitou análise mais precisa nestas situações. Quanto aos resultados obtidos nas faixas de 0 a 1,0% e de 0 a 0,1%, há que se considerar ainda que parte dos dados que não apresentaram correlação linear, baseado no cálculo do  $r_s$ , não representaram impacto real na interpretação dos resultados, por terem se mantido na mesma faixa de interpretação.

Entretanto, cabe considerar que a aquisição de um número ainda maior de eventos provavelmente teria se mostrado superior ao protocolo de aquisição de 50.000 leucócitos. Uma estratégia recomendável seria proceder à aquisição dos eventos das diferentes linhagens celulares utilizando *gates* específicos, previamente definidos, delimitando estas populações de interesse inicialmente por parâmetros físicos. Desta maneira, seria possível obter um número maior de neutrófilos e monócitos posteriormente selecionados pela estratégia de análise por combinações de regiões. Para atingir o limite de detecção de 0,01% de células com fenótipo HPN (testes de alta sensibilidade), seria recomendável considerar um cluster de 10 células duplamente negativas para os marcadores analisados, em uma população final de 100.000 neutrófilos selecionados. Entretanto, este procedimento não seria factível para a população de monócitos, considerando o menor número destas células circulantes em sangue periférico. Esta questão, referente ao número de eventos adquiridos e selecionados para análise, representou uma limitação reconhecida deste estudo, devendo ser trabalhada e superada em ensaios posteriores.

## 6 CONCLUSÕES

- A análise multiparamétrica por citometria de fluxo apresenta sensibilidade e acurácia na detecção de pequenas proporções de células com fenótipo HPN, sendo adequada para a pesquisa de clones subclínicos em pacientes com AA e SMD.
- O reagente FLAER apresenta excelente capacidade de detecção de neutrófilos e monócitos com fenótipo HPN, tendo apresentado resultados concordantes com aqueles obtidos com o uso dos anticorpos monoclonais.
- O reagente FLAER apresenta como vantagens o poder de discriminação clara entre células normais e alteradas e a alta acurácia na análise de amostras que apresentam células em diferentes estágios de maturação e/ou displásicas.
- Considerando o desempenho observado e a facilidade de manuseio, o FLAER se apresenta como um potencial reagente a ser incluído em um painel mínimo para triagem do clone HPN, em um laboratório clínico de rotina, com os objetivos de redução de custos da reação e facilitação da técnica.
- A triagem do clone HPN em um laboratório clínico de rotina pode ser baseada na análise de leucócitos (neutrófilos e monócitos), sendo necessário o ensaio de hemácias somente no contexto do encontro de leucócitos com fenótipo HPN.
- A prevalência do clone HPN em pacientes com AA atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG é condizente com os dados da literatura, considerando a sensibilidade analítica alcançada pela metodologia utilizada neste estudo.
- A não detecção de células com fenótipo HPN em pacientes com SMD atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG pode ser justificada pela menor frequência do clone HPN nesta população e pelo número relativamente pequeno de pacientes incluídos neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARATEN, D. *et al.* Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 5209-5214, 1999.

ARAÚJO, C.J. *et al.* Hemoglobinúria paroxística noturna: relato de dois casos. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 4, p. 286-290, 2002.

ARRUDA, M.M. *et al.* Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 2, p. 214-221, 2010.

BATTIWALLA, M. *et al.* Multiparameter flow cytometry for the diagnosis and monitoring of small GPI-deficient cellular populations. **Cytometry Part B**, v. 78B, p. 348-356, 2010.

BOROWITZ, M.J. *et al.* Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. **Cytometry Part B**, v. 78B, p. 211-230, 2010.

BOWEN, D. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v. 120, p. 187-200, 2003.

BRITO, J.L.C. *et al.* Frequency of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients attended in Belém, Pará, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 33, n. 1, p. 35-37, 2011.

BRODSKY, R.A. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 8, p. 24-28, 2006.

BRODSKY, R.A. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood Rev**, v. 22, n. 2, p. 65-74, 2008.

BRODSKY, R.A. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6522-6527, 2009.

BRODSKY, R.A. *et al.* Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. **Am J Clin Pathol**, v. 114, p. 459-466, 2000.

CARVALHO, R.F. *et al.* Detection of somatic mutations of the *PIG-A* gene in Brazilian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 6, p. 763-766, 2001.

DUNN, D. *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, n. 6, p. 401-408, 1999.

DWORACKI, G. *et al.* Flow cytometric analysis of CD55 and CD59 expression on blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 43, n. 2, p. 117-120, 2005.

FRICKHOFEN, N. *et al.* Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1236-1242, 2003.

GREENBERG, P. *et al.* International Scoring System for evaluating prognosis in myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079-2088, 1997.

GREENBERG, P.L. Current therapeutic approaches for patients with myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v. 150, p. 131-143, 2010.

GREENBERG, P.L. *et al.* NCCN clinical practice guidelines for myelodysplastic syndromes, Versão 2.2013, 15 ago. 2012. Disponível em <<http://www.nccn.org/>>. Acesso em: 5 nov. 2012.

GUPTA, R. *et al.* A prospective comparison of four techniques for diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Int Jnl Lab Hem**, v. 29, p. 119-126, 2007.

HALL, S.E.; ROSSE, W.F. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 87, n. 12, p. 5332-5340, 1996.

HERNÁNDEZ-CAMPO, P.M. *et al.* Comparative analysis of different flow cytometry-based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 e CD55 expression on major peripheral blood cell subsets. **Cytometry (Clinical Cytometry)**, v. 50, p. 191-201, 2002.

HERNÁNDEZ-CAMPO, P.M. *et al.* 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 Part B**, v. 70B, p. 71-81, 2006.

HERNÁNDEZ-CAMPO, P.M. *et al.* Quantitative analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow. **Cytometry Part B**, v. 72B, p. 34-42, 2007.

HILL, A.; RICHARDS, S.J.; HILLMEN, P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **British Journal of Haematology**, v. 137, p. 181-192, 2007.

INTERNATIONAL AGRANULOCYTOSIS AND APLASTIC ANAEMIA STUDY GROUP. Incidence of aplastic anaemia: the relevance of diagnostic criteria. **Blood**, v. 70, p. 1718-1721, 1987.

ISHIKAWA, T. *et al.* A prospective study of Cyclosporine A treatment of patients with low-risk myelodysplastic syndrome: presence of CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup> blood cells predicts platelet response. **Int J Hematol**, v. 86, p. 150-157, 2007.

ISHIYAMA, K. *et al.* Policlonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1211-1216, 2003.

IWANAGA, M. *et al.* Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v. 102, p. 465-474, 1998.

KAIKIFA, G. *et al.* Detection of CD55- and CD59- deficient granulocytic populations in patients with myelodysplastic syndrome. **Ann Hematol**, v. 87, p. 257-262, 2008.

KRAUSS, J.S. The laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): update 2010. **LabMedicine**, v. 43, p. 20-24, 2012.

LUZZATTO, L.; GIANFALDONI, G. Recent advances in biological and clinical aspects of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Int J Hematol**, v. 84, p. 104-112, 2006.

LUZZATTO, L.; GIANFALDONI, G.; NOTARO, R. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view. **British Journal of Haematology**, v. 153, p. 709-720, 2011.

MACIEJEWSKI, J.P. *et al.* Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein-deficient clones. **British Journal of Haematology**, v. 115, p. 1015-1022, 2001.

MADKAIKAR, M. *et al.* Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, and limitations. **Eur J Haematol**, v. 83, p. 503-511, 2009.

MARSH, J.C.W. *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 147, p. 43-70, 2009.

MATOS, J.C.; ARAÚJO, I.R.; BULBOL, W.S. Insuficiência renal aguda na hemoglobinúria paroxística noturna. Relato de caso. **Revistahugv**, v. 9, p. 54-57, 2010.

MODESTO, T.M. *et al.* Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 28, n. 4, p. 275-279, 2006.

MOYO, V.M. *et al.* Natural history of Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. **British Journal of Haematology**, v. 126, p. 133-138, 2004.

MUKHINA, G.L. *et al.* Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 115, p. 476-482, 2001.

NOMURA, M.L.; SURITA, F.G.C.; PARPINELLI, M.A. Hemoglobinúria paroxística noturna e gravidez. **RBGO**, v. 26, n. 7, p. 579-582, 2004.

OGATA, K. *et al.* Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. **Haematologica**, v. 94, n. 8, p. 1066-1074, 2009.

OKAMOTO, M. *et al.* High frequency of several PIG-A mutations in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, v. 20, p. 627-634, 2006.

OKAMOTO, T. *et al.* Relationship between immunological abnormalities and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – associated clones in myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v. 114, p. 731-735, 2001.

OLTEANU, H. *et al.* Differential usefulness of various markers in the flow cytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow. **Am J Clin Pathol**, v. 126, p. 781-788, 2006.

OMIM<sup>®</sup> - Online Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University School of Medicine. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>>. Acesso em: 26 nov. 2012.

PARKER, C.J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Curr Opin Hematol**, v. 19, p. 141-148, 2012.

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

PEFFAULT DE LATOUR, R. *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. **Blood**, v. 112, p. 3099-3106, 2008.

PERES, L.A.B. *et al.* Insuficiência renal aguda na hemoglobinúria paroxística noturna. Relato de caso. **J Bras Nefrol**, v. 30, n. 1, p. 76-78, 2008.

PIEDRAS, J.; LÓPES-KARPOVITCH, X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to asses paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. **Cytometry**, v. 42, p. 234-238, 2000.

PU, J.J. *et al.* Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. **Eur J Haematol**, v. 87, p. 37-45, 2011.

QUEIRÓS, M.L. *et al.* Importância da citometria de fluxo no diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna. **ABO**, n. 4, p. 37-42, 2000.

RICHARDS, S.J.; HILL, A.; HILLMEN, P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Cytometry Part B**, v. 72B, p. 291-298, 2007.

RICHARDS, S.J.; RAWSTRON, A.C.; HILLMEN, P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Cytometry**, v. 42, p. 223-233, 2000.

ROTH, A.; DUHRSEN, U. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of eculizumab. **Eur J Haematol**, v. 87, p. 473-479, 2011.

SCHEINBERG, P. *et al.* Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 144, p. 206-216, 2008.

SCHEINBERG, P. *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. **Haematologica**, v. 95, n. 7, p. 1075-1080, 2010.

SUGIMORI, C. *et al.* Minor population of CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup> blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1308-1314, 2006.

SUGIMORI, C. *et al.* Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. **British Journal of Haematology**, v. 147, p. 102-112, 2009.

SUTHERLAND, D.R. *et al.* Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. **Cytometry Part B**, v. 72B, p. 167-177, 2007.

SUTHERLAND, D.R. *et al.* Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of HPN clones. **Am J Clin Pathol**, v. 132, p. 564-572, 2009.

SWERDLOW, S.H. *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2008.

TORRES, D.C.B.A. *et al.* Avaliação de clone da hemoglobinúria paroxística noturna em pacientes com anemia aplástica. **RBAC**, v. 41, n. 4, p. 247-250, 2009.

VAN DER SCHOOT, C.E. *et al.* Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. **Blood**, v. 76, n. 9, p. 1853-1859, 1990.

WANACHIWANAWIN, W. *et al.* A cohort study of the nature of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and PIG-A mutations in patients with aplastic anemia. **Eur J Haematol**, v. 76, p. 502-509, 2006.

WANG, H. *et al.* Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. **Eur J Haematol**, v. 66, p. 200-205, 2001.

WANG, H. *et al.* Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. **Blood**, v. 100, n. 12, p. 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**, v. 94, n. 1, p. 29-37, 2009.

YOUNG, N.S.; CALADO, R.T.; SCHEINBERG, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2509-2519, 2006.

**ANEXO I**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Parecer nº. ETIC 0048.0.203.000-11**

**Interessado(a): Profa. Silvana Maria Elói Santos  
Departamento de Propedêutica Complementar  
Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de maio de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Expressão de moléculas ancoradas ao glicosil-fosfatidil-inositol (GP) em diferentes linhagens celulares, em pacientes com anemia aplásica e síndrome mielodisplásica"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. T. Marques Amaral', is written over a light blue horizontal line.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

## ANEXO II

### Termo de consentimento livre e esclarecido

**Título do projeto de pesquisa:** EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ANCORADAS AO GLICOSIL-FOSFATIDIL-INOSITOL (GPI) EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES, EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.

**Pesquisadores (ordem alfabética):** Juliana Maria Camargos Rocha, Marcelo Eduardo de Lima Souza, Maria Luíza Silva, Mitiko Murao, Sérgio Schusterschitz da Silva Araújo, Silvana Maria Elói Santos.

**Introdução:** Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda as explicações que serão apresentadas, esclarecendo o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

**Justificativa e objetivos do estudo:** Este estudo envolve a participação de pacientes com diagnóstico de anemia aplásica e síndrome mielodisplásica. Neste grupo de pacientes, podem ser encontradas células sanguíneas que apresentam deficiência de expressão de determinadas proteínas, que são chamadas "células tipo HPN". A detecção destas células é muito importante, pois a sua presença tem sido associada a boa resposta ao tratamento e melhor evolução clínica.

Os objetivos deste estudo são implantar a técnica para detecção das células tipo HPN no Laboratório Central do Hospital das Clínicas/UFMG e pesquisar estas células em pacientes com anemia aplásica e síndrome mielodisplásica.

**Procedimentos:** Serão incluídos neste estudo pacientes com anemia aplásica e síndrome mielodisplásica atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, que concordarem em participar do estudo, após assinatura do termo de consentimento.

Se você concordar em participar do estudo, uma amostra de sangue será colhida de uma veia em seu braço. O sangue coletado será utilizado para a pesquisa das células tipo HPN. Os testes serão realizados no Setor de Hematologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas/ UFMG.

**Desconfortos:** A retirada de sangue poderá causar alterações locais, como vermelhidão e pequenas manchas arroxeadas.

**Benefícios:** A sua participação será muito importante para o estudo da presença das células tipo HPN em pacientes com anemia aplásica e síndrome mielodisplásica e poderá contribuir para o melhor controle dessas doenças.

**Sigilo:** Os seus dados serão mantidos em sigilo até onde é permitido por lei. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

**Desligamento:** A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá interromper a sua participação a qualquer momento, sem afetar seu acompanhamento médico.

**Novas Descobertas:** Todos os novos dados descobertos durante a realização desta pesquisa serão fornecidos a você, assim que tais informações se tornarem disponíveis.

**Compensação:** Você não receberá qualquer compensação financeira pela sua participação no estudo.

**Contato com o pesquisador** pode ser feito pelo telefone 31 3409-9774 com a Professora Silvana ou Professora Juliana. Durante o estudo, caso você tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, favor contactar o Comitê de Ética em Pesquisa-COEP/UFMG, localizado à Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, sala 2005, 2º andar, telefone 31 3409-4592.

**Consentimento:** Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Estou assinando voluntariamente minha participação neste estudo. Receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do orientando

## ANEXO III

## Questionário Projeto HPN

DATA: \_\_/\_\_/\_\_

|                                    |            |          |              |                       |          |                |      |
|------------------------------------|------------|----------|--------------|-----------------------|----------|----------------|------|
| Nome:                              |            |          |              | Sexo: F M             |          |                |      |
| Endereço:                          |            |          |              | Tel:                  |          |                |      |
| Prontuário:                        |            | DN: / /  |              | Idade:                |          |                |      |
| Diagnóstico:                       |            |          |              |                       |          |                |      |
| Data do diagnóstico: / /           |            |          |              |                       |          |                |      |
| Hemograma 1: / /                   |            |          |              |                       |          |                |      |
|                                    | Hb:        | g/dL     | Hm:          | /mm3                  | Ht:      | VCM:           | fL   |
|                                    | GL:        | /mm3     | pro:         |                       | meta:    | mielo:         |      |
|                                    | bast:      |          | neut:        |                       | linf:    | mono:          |      |
|                                    | baso:      |          | eos:         |                       | blastos: |                |      |
|                                    | Plaquetas: |          |              |                       |          |                | /mm3 |
| Hemograma 2: / /                   |            |          |              |                       |          |                |      |
|                                    | Hb:        | g/dL     | Hm:          | /mm3                  | Ht:      | VCM:           | fL   |
|                                    | GL:        | /mm3     | pro:         |                       | meta:    | mielo:         |      |
|                                    | bast:      |          | neut:        |                       | linf:    | mono:          |      |
|                                    | baso:      |          | eos:         |                       | blastos: |                |      |
|                                    | Plaquetas: |          |              |                       |          |                | /mm3 |
| Reticulócitos ( / / ): %           |            |          |              |                       |          | cel/mm3        |      |
| Mielograma ( / / ):                |            |          |              |                       |          |                |      |
| Biópsia MO ( / / ): celularidade - |            |          |              |                       |          |                |      |
| Citogenética MO ( / / ):           |            |          |              |                       |          |                |      |
| Tratamento prévio:                 |            | não      | TMO ( / / )  | TIS - iniciado em / / |          |                |      |
| Medicamentos:                      |            |          |              |                       |          |                |      |
| Transusão:                         |            | não      | Há < 3 meses | Há > 3 meses          |          |                |      |
| Complicações:                      |            | Hemólise |              | Trombose              |          | Doença clonal: |      |
|                                    |            | Outras:  |              |                       |          |                |      |
|                                    |            |          |              |                       |          |                |      |

## ANEXO IV



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
cpg@medicina.ufmg.br



## DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelas professoras doutoras: Silvana Maria Elói Santos, Maria Luiza Silva, Sandra Guerra Xavier e Danielle Marquete Vitelli Avelar, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ANCORADAS AO GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES, EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA”**, apresentada pela mestranda **JULIANA MARIA CAMARGOS ROCHA**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Investigativa, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 20 de fevereiro de 2013.

  
Prof. Silvana Maria Elói Santos  
Orientadora

  
Dra. Maria Luiza Silva  
Coorientadora

  
Prof. Sandra Guerra Xavier

  
Prof. Danielle Marquete Vitelli Avelar

## ANEXO V



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640  
cpq@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **JULIANA MARIA CAMARGOS ROCHA**, nº de registro 2011655875. Às oito horas e trinta minutos do dia **20 de fevereiro de dois mil e treze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLECULAS ANCORADAS AO GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES, EM PACIENTES COM ANEMIA APLÁSICA E SÍNDROME MIELODISPLÁSICA"**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Investigativa. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Silvana Maria Elói Santos, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

|  |   |                            |
|--|---|----------------------------|
| Profa. Silvana Maria Elói Santos/Orientadora | Instituição: UFMG                                     | Indicação: <u>APROVADA</u> |
| Dra. Maria Luiza Silva/Coorientadora         | Instituição: HC-UFMG                                  | Indicação: <u>Aprovada</u> |
| Profa. Sandra Guerra Xavier                  | Instituição: UFMG                                     | Indicação: <u>APROVADA</u> |
| Profa. Danielle Marquete Vitelli Avelar      | Instituição: Clínica de Hematologia Hematológica LTDA | Indicação: <u>APROVADA</u> |

Pelas indicações, a candidata foi considerada aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2013.

Profa. Silvana Maria Elói Santos Silvana Maria Elói Santos

Dra. Maria Luiza Silva Maria Luiza Silva

Profa. Sandra Guerra Xavier Sandra Guerra Xavier

Profa. Danielle Marquete Vitelli Avelar Danielle Marquete Vitelli Avelar

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) Rosa Maria Esteves Arantes

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina / UFMG