

ANA PAULA DE AZAMBUJA

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES QUE
APRESENTAM CLONE DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA
DETECTADO POR CITOMETRIA DE FLUXO.**

CURITIBA

2013

ANA PAULA DE AZAMBUJA

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES QUE
APRESENTAM CLONE DE HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA
DETECTADO POR CITOMETRIA DE FLUXO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós Graduação em Medicina Interna, do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr Ricardo Pasquini

Coorientadora: Ms. Mariester Malvezzi

CURITIBA

2013

Dedico este trabalho à minha querida mestre Dra. Mariester Malvezzi, pela amizade e firmeza com que tem me conduzido nos últimos anos, por ter me proporcionado os caminhos para chegar até aqui, e pelo altruísmo científico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por nortear meus caminhos e a todos os pacientes, por serem motivação e propósito deste trabalho.

Agradeço à mestre e amiga Dra. Mariester Malvezzi, pelo início do trabalho com HPN há mais de 15 anos.

Agradeço aos Professores Dr. Ricardo Pasquini e Dr. Alberto Orfao, pelos ensinamentos, rigor científico e orientação neste trabalho.

Ao Dr. Marco Antonio Bittencourt, por ter atendido desde sempre os pacientes com HPN e pela criação e manutenção do complicado Ambulatório de Falência Medular. Aos amigos e colegas Michel Michels Oliveira, Jefferson Ruiz e Larissa Alessandra Medeiros, por terem continuado o trabalho com HPN, e por acreditarem no Ambulatório de Falência. À amiga Larissa Alessandra Medeiros especialmente pelo apoio incondicional ao longo deste trabalho.

À Dra. Noemi Farah Pereira, pelos ensinamentos de ética, integridade e pela amizade incondicional.

À Dra. Márcia pelo imenso auxílio estatístico.

Às colegas e amigas do laboratório de Imunfenotipagem, especialmente Miriam e Rosana, pelos laudos pré-históricos. Agradeço claro a todas (Leila, Noely, Julie, Mari Tadeu, Isabel, Suély, Juliana, Yara, Elisa e Edna), pela gentileza em ajudar nos dados (pipetar e coletar HPN não é fácil!) e pela amizade demonstrada.

A todos os médicos, equipe de enfermagem e equipe multidisciplinar do serviço de Transplante de Medula Óssea e do Laboratório de Imunogenética, pelo apoio, dedicação e desprendimento.

À minha família, por me apoiar por todos esses anos, e ao Dudu e à Natália, por aceitarem a contragosto as minhas prioridades.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é caracterizada clinicamente por hemólise intravascular crônica, falência medular e hipercoagulabilidade levando a trombozes. A facilidade na detecção de clone HPN através do uso de técnicas sensíveis aumentou o número de pacientes com este diagnóstico, entretanto, a heterogeneidade da doença torna imprescindível a correlação clínica.

OBJETIVOS: Analisar as características clínico-biológicas de uma população brasileira de pacientes com clone HPN, e avaliar as diferenças na apresentação, sobrevida global, diferença entre as categorias clínicas e significado do clone HPN.

MÉTODOS: 103 pacientes foram selecionados através de uma busca nos exames de imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) realizados entre dezembro de 1999 e dezembro de 2011, no Laboratório de Imunofenotipagem, HC-UFPR. Definição de Clone HPN+: CF com defeito de expressão >0,1% em pelo menos dois marcadores (CD55, CD59, CD16, CD24, CD66b, CD14) em duas linhagens hematopoéticas distintas. Análise retrospectiva foi realizada nos pacientes que tinham prontuário clínico com pelo menos uma consulta avaliável, feita no ambulatório de Falência Medular HC-UFPR.

RESULTADOS: 103 pacientes incluídos no estudo, 52M / 51F, idade mediana 24,1 anos (5,5–62). Sintomas iniciais: astenia 95,1%; infecção 46,6%; sangramentos 66%, sendo 47,1% petéquias e equimoses; hemoglobinúria 23,2%; dor abdominal 38,8%; icterícia 13,6%. Trombose foi observada em 17 (16,5%) pacientes. Citopenias estavam presentes em 101 pacientes: 83(80,6%) pancitopenia, 12(15,2%) anemia e trombocitopenia, e 4(3,9%) anemia e leucopenia. A mediana de hemoglobina foi 8,8g/dL (3,8–14,5 g/dL), neutrófilos $940 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($260\text{--}1.450 \times 10^3/\mu\text{L}$), e plaquetas $25 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($2\text{--}294 \times 10^6/\mu\text{L}$).

Os pacientes foram divididos em 3 grupos, conforme a celularidade da medula óssea e presença de hemólise: 10 pacientes HPN clássica, 39 pacientes HPN + SFM e 54 pacientes HPN subclínica. A celularidade mediana da medula óssea foi 5% em HPN subclínica, 10% na HPN+SFM e 70% na HPN clássica.

Vinte e seis pacientes desenvolveram hemólise após uma mediana de 2,35 anos após o diagnóstico da aplasia. A sobrevida global em 10 anos estimada pela curva de Kaplan–Meier foi 81,7% no grupo todo; o grupo HPN subclínica apresentou menor SG (76,5%).

Houve diferenças significativas nos sintomas clínicos, leucócitos, plaquetas, DHL, reticulócitos e tamanho do clone HPN entre as três subcategorias, especialmente entre HPN clássica e subclínica.

As percentagens de clone HPN em eritrócitos e granulócitos foram significativamente diferentes entre os três grupos ($p < 0.001$), com percentagens medianas respectivamente: 0,04% (0-10%) e 7,3% (6,4-19,0%) em HPN subclínica; 15,8% (14-52%) e 63% (56-78%) em HPN+SFM, e 82,2% (89,7-92,2%) e 98,0% (86,7-98,4%) na HPN clássica.

Também houve diferença estatística entre os pacientes com eventos trombóticos ou não nas variáveis: plaquetas ($p = 0,001$), DHL ($p = 0,002$), mediana do clone HPN em neutrófilos = 92,7% (3,4%-100%) versus 21,5% (0,25%-99,9%), $p < 0,001$, e eritrócitos = 31,8% (0-100%) versus 1,2% (0-100%), $p = 0,008$.

CONCLUSÕES: Esta análise retrospectiva representa a maior coorte de pacientes com clone HPN descrita em um único centro no Brasil, e a primeira descrição dos subgrupos HPN clássica, HPN associada à falência medular e HPN subclínica. Os resultados sugerem que pacientes com clones de tamanho grande tem maior incidência de hemólise e trombose, mesmo quando no cenário das síndromes de falência medular. As três categorias clínicas podem ser diferenciadas não só pela biópsia de medula óssea e presença de hemólise documentada, mas também pelo tamanho do clone HPN. Os resultados da citometria de fluxo em pacientes com clone HPN devem ser correlacionados com as informações clínicas e laboratoriais para o correto diagnóstico, classificação e tratamento.

Palavras-chave: anemia aplástica, falência medular, clone HPN, hemoglobinúria.

ABSTRACT

Background: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired chronic hemolytic anemia, which often manifests with peripheral blood cytopenias and thrombosis. The patients with PNH have acquired mutations in the phosphatidylinositol glycan class-A (PIG-A) gene, which causes the lack of Glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory proteins (GPI-AP) on hematopoietic cells. The clinical course of the disease is highly variable.

Aims: We retrospectively reviewed 103 PNH cases referred to our hospital from December 1999 through December 2011 to assess clinical presentations, thrombosis, survival, difference among subcategories, and clinical significance of PNH clone size.

Methods: The diagnosis of PNH was established by detection of the positive PNH clone by Flow Cytometry (FCM). The proteins studied were CD55 and CD59 on erythrocytes, neutrophils and monocytes, CD16, CD24 and CD66b on neutrophils and CD14 on monocytes. The presence of a clone was defined as the presence of GPI-AP greater than 0.1% of neutrophils or red cells, and the size of the clone was defined by the highest level of red blood cells and neutrophils lacking GPI-anchored proteins. Patients with severe and moderated AA, MDS or AML were subclassified according to literature.

Results: 103 patients with PNH clone were included into this study. The median age at presentation was 24.1 years (5.5–62 years). Hemoglobinuria as the initial symptomatic manifestation were seen in 23.2% of the patients, while the frequencies of infectious (46.6%) and bleeding symptoms (47.1%) were higher than other series. 17 (16,5%) patients developed thrombosis during monitoring.

Peripheral blood abnormalities were present in 101 patients: 83(80.6%) had pancytopenia, 12(15.2%) anemia and thrombocytopenia, and 4(3.9%) anemia with leucopenia. The median hemoglobin level were 88g/L (38–145 g/L), median ANC of $0.94 \times 10^9/L$ ($0.26-1.45 \times 10^9/L$), and with median PLT of $25 \times 10^9/L$ ($2-294 \times 10^9/L$). The median LDH were 328U/L (30-7970U/L, normal range 190-240U/L). 86.4% had hypocelular bone marrow.

The cohort of patients were divided into subcategories of classic PNH (10 patients), PNH/AA (39 patients), and PNH-sc/AA (54 patients) based on the proposed PNH working clinical classification. 26 patients developed hemolysis after 2.35 years (median) after AA diagnosis. The overall survival at 10 years after diagnosis estimated by Kaplan–Meier was 81.7%, but PNH-sc/AA patients had lower OS (76,5%).

There are significant differences in terms of median age, size of PNH clones, clinical symptoms, and peripheral blood cell counts among the three subcategories, especially between classic PNH and PNH-sc/AA subcategories.

PNH clone size in erythrocytes and granulocytes were significantly different among the three subcategories ($p < 0.001$), since the median percentages were respectively: 0,04% (0-10%) and 7.3% (6.4-19.0%) in PNH-sc/AA; 15,8% (14-52%) and 63% (56-78%) in PNH/AA, and 82,2% (89.7-92.2%) and 98.0% (86.7-98.4%) in classic PNH.

There were statistical difference in the variables platelets ($p = 0,001$), LDH ($p = 0,002$) and in the median percentages of PNH clone in neutrophils and erythrocytes among patients with or without thrombotic event, respectively neutrophils = 92.7% (3.4%-100%) versus 21.5% (0.25%-99.9%), $p < 0,001$, and erythrocytes = 31.8% (0-100%) versus 1.2% (0-100%), $p = 0,008$.

Summary / Conclusion: In conclusion, these retrospective review 103 PNH patients over a 10-year period represented the largest collection of such patients based on a single center in Brazil. It provided us useful information to understand the disease since our results confirmed the suggestion that large PNH clone are associated with increased risks for hemolytic form and thrombosis, even in patients with bone marrow failure, whereas small PNH clone is associated with a non-hemolytic form of the disease.

Keywords: Bone marrow failure, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA SEGUNDO GRUPO INTERNACIONAL PARA ESTUDO DA HPN (IPIG) | 7 |
| TABELA 2 - ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS | 14 |
| TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS | 18 |
| TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CLONE HPN EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO DAS SÍNDROMES DE FALÊNCIA MEDULAR E DO GRAU DE HIPOPLASIA DA MEDULA ÓSSEA | 19 |
| TABELA 5 - ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS | 19 |
| TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DAS TRÊS SUBCATEGORIAS DE PACIENTES | 22 |
| TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DOS 17 PACIENTES COM TROMBOSE | 26 |
| TABELA 8 - DIFERENÇAS ENTRE PACIENTES COM E SEM TROMBOSE | |
| TABELA 9 - PERCENTAGEM DO CLONE HPN NOS PACIENTES COM TROMBOSE | 28 |
| TABELA 10 - TRATAMENTOS INSTITUÍDOS | 29 |
| ANEXO 1 – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS | 50 |
| ANEXO 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS | 52 |
| ANEXO 3 - EXAMES LABORATORIAIS AO DIAGNÓSTICO | 53 |
| ANEXO 4 - CLONE HPN AVALIADO POR MARCADOR DE CF | 54 |
| ANEXO 5 - HISTOGRAMAS DE FREQUENCIA DE CLONE HPN EM ERITRÓCITOS E GRANULÓCITOS NEUTRÓFILOS NOS DIFERENTES GRUPOS | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| FIGURA 1 | Exemplo de marcação CD59 em hemácias (tipos I, II e III). | 15 |
| FIGURA 2 | Exemplo de análise de neutrófilos (CD55, CD66b, CD59, CD16 e CD24) e de monócitos (CD55 e CD14). | 16 |
| FIGURA 3 | Incidência cumulativa de hemólise e trombose nos grupos <u>HPN clássica</u> (curva verde), <u>HPN+SFM</u> (curva azul) e <u>HPN subclínica</u> (curva vermelha) | 23 |
| FIGURA 4 | Gráfico mostrando a percentagem mediana de clone HPN em neutrófilos (azul) e eritrócitos (vermelho), respectivamente 7,3% e 0,04% para o grupo <u>HPN subclínica</u> , 63% e 15,8% no grupo <u>HPN+SFM</u> e 98,0% e 82,2% no grupo <u>HPN clássica</u> . | 26 |
| FIGURA 5 | Gráfico mostrando três níveis de clone HPN detectado, com separação nítida entre os subgrupos <u>HPN subclínica</u> (azul), <u>HPN+SFM</u> (vermelho) e <u>HPN clássica</u> (preto). | 27 |
| FIGURA 6 | Histogramas mostrando a percentagem de clone HPN em granulócitos com predomínio de percentagens baixas (<10%) na <u>HPN subclínica</u> (2A), percentagens variáveis no grupo <u>HPN+SFM</u> (2B), e percentagens altas (>60%) no grupo <u>HPN clássica</u> (2C). | 29 |
| FIGURA 7 | Representação esquemática da mediana dos clones HPN em neutrófilos ($p < 0,001$) e hemácias ($p = 0,008$) em relação à presença ou ausência de trombose. | 27 |
| FIGURA 8 | Curva de Kaplan-Meier considerando-se todos os casos (mediana de 81,7% em 10 anos). | 32 |
| FIGURA 9 | Curva de Kaplan-Meier considerando-se os grupos <u>HPN clássica</u> e <u>HPN+SFM</u> , versus grupo com aplasia (<u>HPN subclínica</u>). | 35 |
| FIGURA 10 | Clone HPN nos pacientes atendidos no HC-UFPR de 1999 a 2011. | 36 |

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

| | |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| AA | Anemia Aplástica |
| AAS | Anemia Aplástica Severa |
| AAM | Anemia Aplástica Moderada |
| AVCi | Acidente vascular cerebral isquêmico |
| CD | Cluster of differentiation |
| CEP | Comissão de Ética em Pesquisa |
| CF | Citometria de Fluxo |
| CSA | Ciclosporina |
| CTC | Corticoide |
| DAF ou CD55 | Fator acelerador da degradação do complemento, CD55 |
| DHL | Desidrogenase Láctica |
| E | Eritrócitos ou hemácias |
| FITC | Isotiocianato de Fluoresceína |
| FLAER | <i>Fluorescent Labeled AERolysin</i> |
| FSC | Foward Scatter – avalia tamanho celular |
| GPI | Grupos Glicosilados Fostatidil Inositol |
| Hb | Hemoglobina |
| HC-UFPR | Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná |
| HPN | Hemoglobinúria Paroxística Noturna |
| <i>HPN+SFM</i> | HPN com Síndromes de falência Medular |
| <i>HPNsc</i> | HPN subclínica |
| IMF | Intensidade Média de Fluorescência |
| IPIG | International PNH Interest Group |
| M | Monócitos |
| MIRL ou CD59 | Inibidor da lise reativa da membrana, CD59 |
| N | Neutrófilos |
| NIH | National Health Institutes |
| PBS | Tampão fosfato |
| PCy5 | Ficocianina 5 |
| PE | Ficoeritrina |
| PIG A | Glicofostatidil Inositol Classe A |

| | |
|------|----------------------------------------------|
| Plaq | Plaquetas |
| SBC | Síndrome de Budd-Chiari |
| SFM | Síndromes de Falência Medular |
| SMD | Síndrome Mielodisplásica |
| SSC | Side Scatter – avalia complexidade celular |
| TCTH | Transplante de células tronco hematopoéticas |
| TEP | Tromboembolismo pulmonar |
| TVP | Trombose venosa profunda |
| VCM | Volume corpuscular médio |
| VG | Volume globular |
| %[E] | Percentagem de clone em hemácias |
| %[N] | Percentagem de clone em neutrófilos |

SUMÁRIO

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO | 1 |
| 1.1 Aspectos gerais da Hemoglobinúria Paroxística Noturna: Definição, fisiopatologia e manifestações clínicas. | 1 |
| 1.2 Diagnóstico Laboratorial | 4 |
| 1.3 Classificação da HPN | 6 |
| 1.4 Manejo clínico e tratamento da HPN | 8 |
| 2 OBJETIVOS | 9 |
| 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS | 10 |
| 3.1 Desenho do estudo | 10 |
| 3.2 Casuística | 10 |
| 3.3 Métodos de coleta e análise de dados | 11 |
| 3.4 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo | 13 |
| 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 18 |
| 5 RESULTADOS | 19 |
| 5.1 Características Clínicas e Laboratoriais | 19 |
| 5.2 Características dos pacientes estratificados nas três categorias | 22 |
| 5.3 Clone HPN detectado por Citometria de Fluxo | 26 |
| 5.4 Trombose | 30 |
| 5.5 Tratamento | 31 |
| 5.6 Análises de sobrevida | |
| 6 DISCUSSÃO | 37 |
| 7 CONCLUSÕES | 46 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |
| 9 ANEXOS | 53 |

1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA: DEFINIÇÃO, FISIOPATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma enfermidade clonal e adquirida da hematopoese, que se caracteriza clinicamente por hemólise intravascular crônica, falência medular e hipercoagulabilidade levando a trombozes¹⁻⁴.

A HPN é uma entidade considerada rara, com incidência estimada em 1,3 casos por milhão de habitantes por ano⁵, podendo se apresentar com pouca sintomatologia até casos graves e incapacitantes^{2,6}. A sobrevida média varia de 10 a 15 anos após o diagnóstico, e os fenômenos trombóticos são os principais responsáveis pela mortalidade^{1,4}.

Estudos mostram que a HPN é causada por uma mutação somática do gene PIG A (Glicosilfostatidil Inositol Classe A), localizado no cromossoma X (Xp22.1), que leva à deficiência dos Grupos Glicosilados Fostatidil Inositol (GPI), responsáveis pela ancoragem de várias proteínas à membrana celular^{7,8}. As proteínas ancoradas ao GPI têm funções diversas, o que pode explicar as diferentes manifestações clínicas da doença e a heterogeneidade entre os pacientes^{7,9}. Entre as proteínas deficientes em GPI encontram-se o MIRL (inibidor da lise reativa da membrana, CD59) e DAF (fator acelerador da degradação do complemento, CD55), os quais regulam a atividade lítica do

complemento e cuja deficiência provoca a hemólise intravascular crônica característica da HPN^{9,10,11}. A hemólise é causada pela sensibilidade anormalmente aumentada das hemácias deficientes em GPI ao ataque pelo complemento, e é exacerbada em episódios paroxísticos, durante os quais ocorre hemoglobinúria macroscópica^{4,12}. Embora a hemoglobinúria seja considerada patognomônica da HPN, apenas 26% dos pacientes parecem apresentar este sintoma^{1, 12}.

A hemólise intravascular crônica é responsável por diversos sintomas e sinais clínicos nos pacientes com HPN, entre os quais anemia com necessidade transfusional, fadiga, hemoglobinúria e urina escura. A hemoglobina livre no plasma tem alta afinidade pelo óxido nítrico e o retira de circulação^{13, 14}, fato este que pode levar a distonia da musculatura lisa, além de ativação e agregação plaquetária. Assim, a depleção tecidual de óxido nítrico se manifesta clinicamente como astenia, dor abdominal, espasmo esofágico, disfagia, impotência sexual masculina e possivelmente trombose^{7, 14}.

A tendência a eventos trombóticos característica da HPN pode ser fatal, uma vez que as trombozes ocorrem predominantemente em sítios não usuais como veias supra-hepáticas (síndrome de Budd-Chiari), veias porta, esplênicas e mesentéricas, ou em veias de sistema nervoso central. A fisiopatologia das trombozes na HPN ainda não é bem compreendida, mas estudos recentes sugerem que pode haver uma relação entre a trombose e a redução do óxido nítrico e hiper-reatividade plaquetária induzidas pela hemólise^{13, 14}.

A associação da HPN com aplasia de medula foi descrita pela primeira vez em 1961 por Dacie e Lewis, com base nos resultados dos testes de Ham e Sacarose⁶. No entanto, as bases fisiopatológicas para esta relação ainda hoje não são completamente compreendidas^{15, 16, 17}. Alguns autores postulam que as células clonais GPI negativas da HPN seriam mais resistentes à destruição pelo sistema imune nos pacientes com aplasia idiopática autoimune. Estas células (clone HPN) substituiriam as células hematopoéticas normais na medula óssea de aplasia em regeneração, tornando-se o clone predominante^{17, 18, 19}. Num segundo momento, haveria uma expansão clonal destas células resistentes ao ataque imune^{7, 8, 17}. Com o aumento da sobrevivência dos pacientes com anemia aplástica, muitos deles apresentam evidências clínicas e laboratoriais de HPN, mesmo depois de meses ou anos após o término da terapia imunossupressora¹⁵⁻¹⁹.

A proporção de pacientes com aplasia que desenvolvem HPN clínica ou subclínica varia amplamente entre os estudos^{2, 3, 16}. Uma pequena população de células GPI deficientes é encontrada em 20 a 50% dos pacientes com Anemia Aplástica (AA)^{15,16} e em 8 a 18% em Síndromes Mielodisplásicas (SMD)²⁰. Em muitos pacientes com aplasia a presença de pequenos clones não se exterioriza em manifestações clínicas, daí a necessidade de monitoração anual do clone HPN nestes pacientes por citometria de fluxo. Clones menores que 1% em pacientes com anemia aplástica severa (AAS) já foram relacionados com melhor resposta ao tratamento imunossupressor¹⁹, mas este dado não foi confirmado por outros estudos^{16, 21}.

1.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da HPN se baseava há 10 anos em testes que mostravam o aumento da sensibilidade das hemácias à lise mediada pelo complemento em meio ácido ou rico em sacarose - testes de Ham e sacarose²². No entanto, o teste de Ham é pouco sensível por avaliar apenas a linhagem eritrocítica, em particular em pacientes com hemólise contínua e que receberam transfusão de hemácias^{5, 9, 10}.

A evidência de uma população de células deficientes em grupos GPI - *Clone HPN* - através da expressão deficiente das proteínas que se ancoram a esta molécula pelo exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) é considerado hoje o padrão ouro para o diagnóstico de HPN^{5, 9}. Os marcadores CD55 e CD59 foram classicamente utilizados em eritrócitos porque além de estarem associados à clínica predominante de hemólise estão distribuídos uniformemente em todas as linhagens hematopoéticas^{5, 9, 10}. Atualmente, a avaliação apenas dos eritrócitos em ensaios de rotina não é considerada adequada uma vez que a hemólise e as transfusões podem subestimar o tamanho do clone^{5, 10}.

A identificação do clone HPN através da investigação da expressão dos marcadores CD16, CD24 e CD66b em neutrófilos e CD14 em monócitos é hoje amplamente recomendada uma vez que estas duas populações costumam apresentar um grau maior de alteração devido a sua meia vida mais curta e por não estarem subjugadas à influência de transfusões^{5, 10, 11}.

Alternativamente, pode-se empregar um derivado fluorescente da toxina bacteriana aerolisina (FLAER - *Fluorescent Labeled AERolysin*), capaz de se unir seletivamente ao GPI nas distintas subpopulações de leucócitos e plaquetas. O FLAER deve ser sempre utilizado em conjunto com outro marcador GPI específico de linhagem²³.

O sangue periférico dos pacientes com HPN é um mosaico de células normais e anormais, com percentagens de clone variando amplamente entre os pacientes. Por exemplo, um paciente hipotético pode ter 90% de clone anormal e 10% de clone com expressão normal de proteínas ancoradas ao GPI. Outro paciente pode ter o contrário, 10% de expressão anormal e 90% de células fenotipicamente normais^{5, 23}. O grau de mosaicismo parece ser determinado pela extensão na qual os clones mutantes se expandem, mas os fatores que determinam essa extensão são especulativos^{8, 15, 23}.

Revisões recentes sugerem que o clone HPN deve ser medido em neutrófilos, e que populações GPI-deficientes são consideradas grandes quando maiores que 50%, moderado entre 25 e 50% e pequeno quando menor que 25%²⁴.

1.3 CLASSIFICAÇÃO DA HPN

O diagnóstico da Hemoglobinúria Paroxística Noturna através da detecção de clones GPI-deficientes por citometria de fluxo não é suficiente para o entendimento da doença, uma vez que a contribuição tanto da hemólise, quanto da falência medular precisam ser consideradas ^{1,3, 5, 6, 24, 25}.

Em 2005, numa tentativa de uniformizar o diagnóstico clínico-laboratorial e classificação da doença, o grupo internacional para o estudo da HPN - IPIG (International PNH Interest Group) propôs critérios que utilizam a presença de alteração na biópsia de medula óssea (aplasia, hipoplasia ou mielodisplasia) e o diagnóstico clínico de hemólise e/ou trombose documentadas^{1, 25}. Três grupos foram definidos (TABELA 1):

HPN clássica: pacientes com evidência clínica de hemólise intravascular (reticulocitose, aumento da desidrogenase láctica (DHL) e bilirrubina indireta (BI)) ou trombose documentada, sem anormalidade na medula óssea (normocelular ou hipercelular, com hiperplasia eritroide, morfologia normal, sem alterações citogenéticas).

HPN com síndromes de falência medular associada (HPN-SFM): pacientes com dados clínicos claros de hemólise, e com diagnóstico confirmado de uma Síndrome de Falência Medular (SFM) primária, como Anemia Aplástica Severa ou não severa (AAS e AANS), Síndrome Mielodisplásica (SMD) ou Mielofibrose Primária.

HPN subclínica: pacientes com SFM, principalmente aplasia, sem evidência de hemólise documentada, mas que apresentam pequenas populações de células GPI deficientes detectadas por métodos sensíveis.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA SEGUNDO INTERNACIONAL PARA ESTUDO DA HPN¹

| Categoria | Medula óssea | Hemólise | Clone HPN* |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| HPN CLÁSSICA | Normal ou hiperclular com morfologia normal ou hiperplasia eritroide | Presente (++) | Geralmente grande |
| HPN + SFM | Alteração na biópsia de medula óssea (aplasia, hipoplasia ou mielodisplasia). | Presente (+) | População de tamanho variável |
| HPN SUBCLÍNICA | | Ausente (-) | Pequena |

Siglas: HPN= hemoglobinúria paroxística noturna; SFM= Síndrome de falência medular. *Clone HPN: percentagem varia entre os estudos.

Esta classificação serviu de base para o presente estudo, que se propõe a avaliar as características clínicas e laboratoriais de uma coorte de pacientes com clone HPN detectados por CF no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), no período histórico de 1999 a 2011.

Analisamos retrospectivamente 103 pacientes com clone HPN que foram reclassificados conforme o descrito na literatura¹, formando a maior coorte de pacientes com clone HPN descrita em um único centro no Brasil. Até o momento do início deste estudo não havia nenhuma publicação em relação à história natural da HPN em pacientes brasileiros^{35, 36}.

1.4 MANEJO CLÍNICO E TRATAMENTO DA HPN

Embora o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) continue sendo a única chance de cura^{26, 27}, este procedimento não parece ser a melhor indicação em casos de tromboembolismo grave²⁷. No passado, a maioria dos pacientes era tratada apenas com prevenção de complicações, transfusões para tratamento sintomático da anemia, anticoagulação para prevenção de trombose^{2, 4}, ou imunossupressão para tratamento da falência medular^{15, 19}. Recentemente o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anti-complemento trouxe novas expectativas para o tratamento da HPN²⁸. O Eculizumab (Soliris®; Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT) é um anticorpo monoclonal humanizado que se une especificamente e com grande afinidade ao componente C5 do complemento, prevenindo a geração do subfragmento C5a e do complexo de ataque à membrana (MAC) C5b-9²⁸. Estudos desenvolvidos nos últimos anos têm mostrado que o Eculizumab diminui a hemólise intravascular, aumentando os níveis de hemoglobina e diminuindo o requerimento transfusional, além de melhorar a sintomatologia clínica que ocorre devido à distonia do músculo liso, por diminuir o sequestro de óxido nítrico pela hemoglobina livre intravascular^{28, 29}. Não está bem definido o mecanismo pelo qual este diminui a incidência de trombose, melhora a função renal e a qualidade de vida²⁹. Este medicamento tem sido indicado nos pacientes que apresentam hemólise grave, tromboes de repetição ou trombose que comprometa a vida, sendo imprescindível valorizar caso a caso^{1, 28, 29}. Por outro lado, nos casos associados a síndromes de falência medular a terapia imunossupressora com timoglobulina e ciclosporina (CSA) e o TCTH tem seu papel bem definido^{15, 16, 18, 19, 21}.

2 OBJETIVOS

2.1 Identificar os pacientes com clone HPN detectado por Citometria de Fluxo (maior que 0,1%) atendidos no ambulatório de Falência Medular do HC-UFPR, no período de dezembro de 1999 a dezembro de 2011.

2.2 Classificar os pacientes nas três categorias definidas pela celularidade da medula óssea e presença de hemólise (HPN subclínica, HPN+SFM e HPN clássica).

2.3. Avaliar as características clínico-biológicas, ocorrência de hemólise e trombose, e sobrevida global nos três subgrupos.

2.4. Avaliar o tamanho do clone HPN detectado por CF nos diferentes subgrupos clínicos e correlacionar com os achados clínicos disponíveis.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo retrospectivo observacional com avaliação de documentação indireta (prontuário clínico), em amostra intencional não probabilística.

3.2 CASUÍSTICA

No período entre dezembro de 1999 e dezembro de 2011 foram solicitados 526 exames de Citometria de Fluxo para pesquisa de Hemoglobinúria Paroxística Noturna, totalizando 398 pacientes analisados.

Foram identificados 125 pacientes (31,4%) com **clone HPN** maior que 0,1% (sensibilidade do método) em algum momento do acompanhamento clínico. Destes, foram estudados os 103 pacientes atendidos no ambulatório de Síndrome de Falência Medular do HC-UFPR, que tinham dados clínicos e laboratoriais suficientes para análise. Os outros 22 pacientes eram provenientes de outros serviços.

As indicações constantes na solicitação médica para a realização da pesquisa de HPN foram: aplasia ou pancitopenia a esclarecer (54 pacientes); pacientes com aplasia com suspeita de evolução para clone HPN (15 pacientes) ou com provas de Ham e sacarose positiva (8 pacientes); hemólise (22 pacientes); trombose (2 pacientes); e não descrito em 2 pacientes.

Os pacientes eram procedentes de diversos estados do Brasil, sendo 53 do Paraná, 14 do Mato Grosso, 14 de Santa Catarina, oito da Bahia,

seis de Minas Gerais e oito de outros estados (Mato Grosso do Sul, Ceará, Distrito Federal, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Maranhão, Rio Grande do Norte, São Paulo).

3.3 METODOS DE COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

Um formulário de coleta de dados (ANEXO 1) foi desenvolvido para este estudo, o qual foi utilizado para revisão dos prontuários.

O diagnóstico de Síndrome de Falência Medular foi estabelecido por biópsia da medula óssea e avaliação do sangue periférico, seguindo os critérios descritos a seguir ³⁰:

- Anemia Aplástica Severa (AAS): celularidade na biópsia menor que 30%, e pelo menos duas das seguintes anormalidades: contagem de neutrófilos menor que 500/ μ L, plaquetas menores que 20.000/ μ L e reticulócitos menores que 60.000/ μ L.
- Anemia Aplástica Não Severa ou Moderada (AANS): celularidade na biópsia menor que 50%, e pelo menos duas das seguintes anormalidades: contagem de neutrófilos menor que 1000/ μ L, de plaquetas menor que 50.000/ μ L e reticulócitos menor que 60.000/ μ L.

Síndrome Mielodisplásica (SMD) foi definida com os critérios morfológicos e citogenéticos recomendados pela Organização Mundial de Saúde³¹, com presença de displasia mieloide e/ou megacariocítica, mas não displasia eritróide ou diseritropoese isolada.

Hemólise foi definida pela presença de hemólise intravascular documentada no prontuário, seja pela presença de hemoglobinúria, icterícia ou crises de anemia e dor abdominal, associadas a aumento da DHL e reticulócitos^{1,25}. A redução da haptoglobina não era disponível nesta casuística.

Os dados foram tabulados com auxílio de uma planilha Excel, e os pacientes foram distribuídos em três categorias definidas pela celularidade da medula óssea avaliada pela biópsia e pela presença ou ausência de hemólise (no diagnóstico ou na evolução), conforme proposto pela literatura¹:

- I. HPN Clássica: biópsia de medula óssea com celularidade maior ou igual a 50%, morfologia do aspirado normal ou com hiperplasia eritroide, e com sinais clássicos de hemólise.
- II. HPN com Síndromes de Falência Medular (HPN+SFM): biópsia de medula óssea com celularidade menor que 50% (hipoplasia ou aplasia medular) ou diagnóstico de SMD, com sinais clínicos de hemólise no início ou na evolução da doença.
- III. HPN subclínica (HPN-sc): aplasia ou hipoplasia de medula óssea (celularidade da biópsia ao diagnóstico menor que 50%) sem sinais clínicos de hemólise no início ou na evolução da doença. Clone HPN de qualquer tamanho.

Este estudo foi autorizado pelo comitê de ética local (Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos – CEP-HC), com a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de estudo retrospectivo, embora assegurado que o caráter anônimo dos pacientes foi mantido e que

suas identidades foram protegidas. Número de registro no CEP-HC sob o número CAAE 00925912.2.0000.0096.

3.4 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

A pesquisa de clones HPN foi realizada em amostras de sangue periférico dos pacientes coletadas em EDTA, e concomitantemente em uma amostra de sangue controle “normal” obtido da rotina da hematologia (hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), leucócitos e plaquetas deveriam estar dentro dos limites de referência do laboratório).

Para a caracterização fenotípica das células hematopoéticas foi empregada técnica de imunofluorescência direta, com marcação tripla⁵. A expressão das diferentes proteínas foi estudada por citometria de fluxo com os reagentes detalhados na tabela 2.

O painel de anticorpos monoclonais utilizado foi composto de cinco tubos, sendo três para estudo dos leucócitos e dois para estudo das hemácias e plaquetas:

CD66b FITC / CD55 PE / CD45 PCy5;

CD16 FITC / CD59 PE / CD45 PCy5;

CD64 FITC / CD24 PE + CD14 PE / CD45 PCy5;

CD41a FITC / CD55 PE ;

CD41a FITC / CD59 PE.

TABELA 2 – ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS

| Anticorpo /Reagente | Fabricante | Clone | Fluorocromo | População Hematopoética avaliada |
|---------------------------------------------|---------------|------------|-------------|----------------------------------|
| Marcadores GPI | | | | |
| CD55 | BD Pharmingen | IA10 | PE | N, M, E, Plaq |
| CD59 | BD Pharmingen | p282 (H19) | PE | N, M, E |
| CD14 | IOTest | RMO52 | PE | M |
| CD16 | IOTest | 3G8 | FITC | N |
| CD24 | IOTest | ALB9 | PE | N |
| CD66b | IOTest | 80H3 | FITC | N |
| Marcadores de Identificação (gating) | | | | |
| CD45 | IOTeste | IMMU19.2 | PCy5 | N, M |
| CD64 | BD Pharmigen | 10.1 | FITC | M |
| CD41a | BD Pharmigen | HIIP8 | FITC | P |

Legenda: N – neutrófilos, M – monócitos; E – eritrócitos ou hemácias; Plaq – plaquetas; FITC – Isotiocianato de fluorosceína; PE – Ficoeritrina; PCy5 – Ficocianina 5.

Para a o estudo dos leucócitos 100 µL da amostra eram marcados com os anticorpos monoclonais conforme o painel estabelecido, e incubados no escuro, a temperatura ambiente por 15 minutos. Após adição de FACS-Lysing ou cloreto de amônio para lise das hemácias, as amostras eram incubadas por mais 10 minutos, centrifugadas 2 vezes por 5 minutos a 1500 rpm e ressuspendidas em 250 µL de solução tamponada de fosfato (PBS). A marcação de hemácias e plaquetas foi realizada sem lise celular, com 5 µL da amostra marcados com CD41a FITC e CD55 PE ou CD59PE, incubados à temperatura ambiente, por 15 minutos.

O citômetro de fluxo de quatro cores *FACSCalibur®* (BD Biosciences, San Jose, EUA) foi utilizado para aquisição das amostras, através do programa *CellQuest Pro* (BD Biosciences, San Jose, EUA). Um total de 50.000 eventos foi adquirido nos tubos de leucócitos e 20.000 eventos nos tubos de hemácias e plaquetas. A análise multiparamétrica foi realizada através dos programas *Paint-a-gate®*, (BD Biosciences, San Jose, EUA) e/ou *Infinicyt™* (Cytognos, Salamanca, Espanha). O controle de qualidade era feito

com calibração diária com o reagente *CaliBRITE™* BD, e a compensação dos fluorocromos seguia as normas do fabricante.

A análise multiparamétrica foi realizada com uso do anticorpo monoclonal anti-CD41a para separação entre hemácias e plaquetas, e avaliação da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD55 e CD59 em hemácias, e de CD55 em plaquetas, para separação das populações tipo I, II e III (FIGURA 1). Não consideramos esse dado (três populações) para a análise estatística, apenas a porcentagem do clone GPI deficiente (soma das populações II e III).

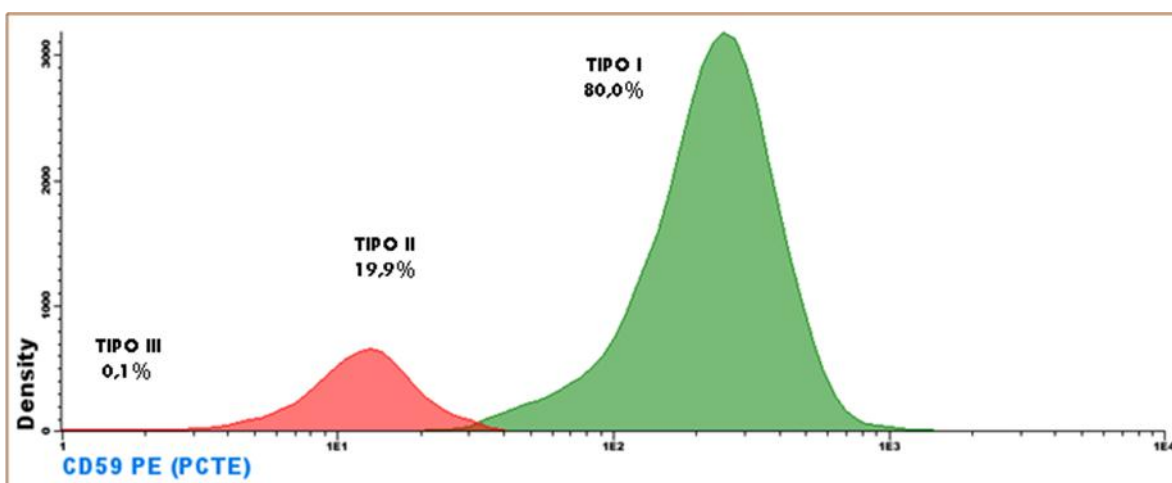


FIGURA 1: EXEMPLO DE MARCAÇÃO CD59 EM HEMÁCIAS (TIPOS I, II E III).

Os parâmetros de luz (FSC – tamanho celular e SSC – complexidade) e a combinação CD64/CD45 foram utilizados para a identificação das diferentes populações de leucócitos. A deficiência de CD16 e CD59 era considerada conjuntamente no dot-plot de interseção CD16 FITC e CD59 PE, assim como os anticorpos CD66b FITC e CD55 PE. A deficiência de CD24 em neutrófilos e de CD14 em monócitos era visualizada no mesmo fluorocromo (PE) (FIGURA 2).

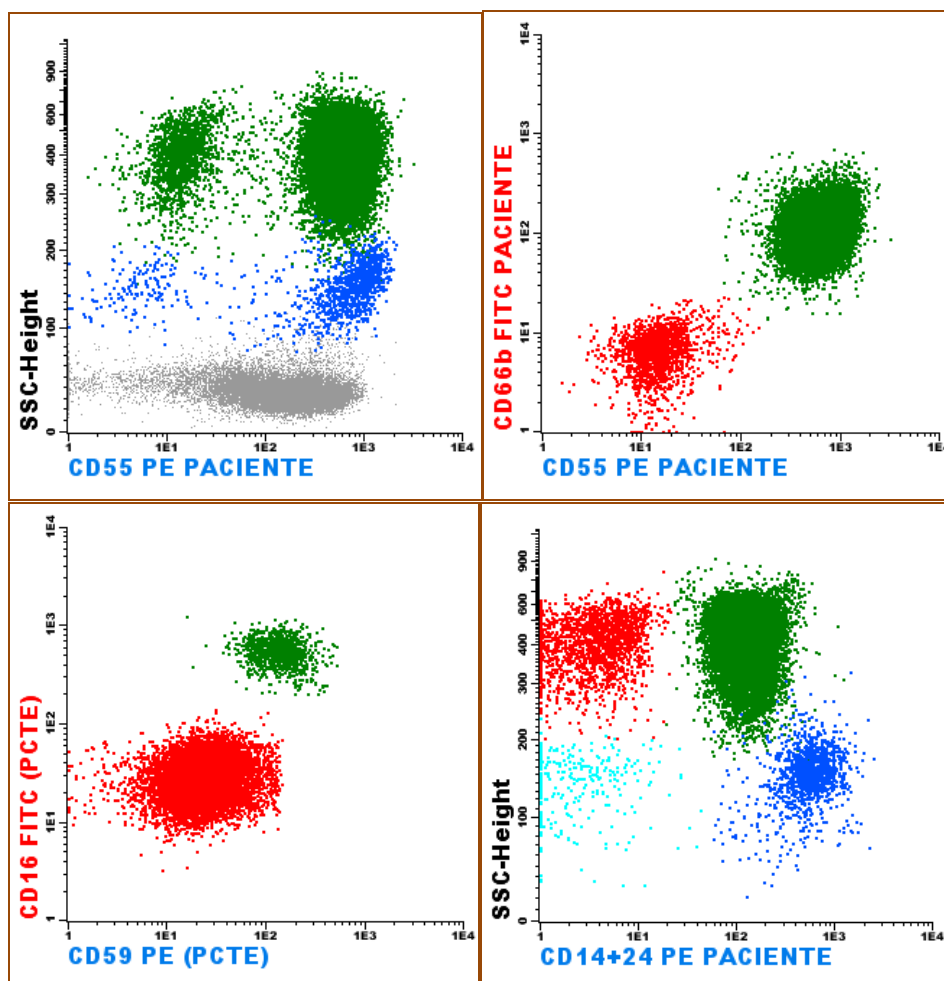


FIGURA 2: EXEMPLO DE ANÁLISE DE NEUTRÓFILOS (CD55, CD66B, CD59, CD16 E CD24) E DE MONÓCITOS (CD55 E CD14).

“Clone HPN” foi considerado presente nos pacientes nos quais foram identificadas mais que **0,1%** de células hematopoéticas com expressão deficiente nos antígenos CD55 e CD59 em neutrófilos, monócitos, hemácias e plaquetas, dos antígenos CD14 em monócitos, e CD16, CD24 e CD66b em neutrófilos. Pelo menos dois destes marcadores deveriam estar deficientes, em pelo menos duas linhagens hematopoéticas distintas⁵.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa *Statistica* v.8.8. Os valores de $p \leq 0,05$ indicaram significância estatística. Para a análise descritiva dos dados foram empregadas frequências, percentagens, médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrão.

Para a comparação de dois grupos em relação a variáveis quantitativas foram considerados o teste *t de Student* para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*. Na comparação de três grupos em relação a variáveis quantitativas, foi usado o modelo de análise da variância ou o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

O teste exato de Fisher e o teste de Qui-quadrado foram usados para avaliar a associação entre variáveis qualitativas. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

Para análise do clone HPN foi utilizada a percentagem de células GPI negativas para cada marcador, a maior percentagem do clone em neutrófilos (%[N]), e em eritrócitos (%[E]), e a razão entre eles (% [E] /% [N]). A percentagem de clone HPN em cada marcador utilizado também foi comparada em histogramas de distribuição.

Curvas de *Kaplan-Meier* foram construídas para descrever o tempo de sobrevida.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Esta casuística consistiu em 52 homens e 51 mulheres, com idade mediana de 24,1 anos (variando entre 5,6 e 62 anos). Destes, 23 pacientes tinham menos de 18 anos ao diagnóstico da anormalidade medular (5,6-17,9 anos, mediana 14,7 anos), sendo que 11 eram HPN subclínica e 13 HPN+SFM. Os pacientes com HPN+SFM evoluíram com hemólise numa mediana de 73,5 meses (0 a 178 meses) após diagnóstico de aplasia.

Os sintomas relatados durante o acompanhamento foram: astenia 95,1%, infecção 46,6% e sangramento 66%, sendo 47,1% petéquias e equimoses; 17,1% gengivorragia e 17,1% metrorragia. Dos 103 pacientes, 43 (47,1%) queixaram-se de urina escura ou hemoglobinúria, sendo que 19 apresentavam este sintoma na primeira avaliação. Os sintomas de dor foram relatados por 49 pacientes, sendo odinofagia em 15, cefaleia em 18, dores abdominais em 33 e dor lombar em 12 pacientes. Durante a evolução 26 pacientes apresentaram icterícia (25,2%) e foram vistos 14 casos de insuficiência renal (13,6%). Não foi possível avaliar as variáveis impotência sexual e hipertensão pulmonar.

Durante o período de acompanhamento 17 pacientes (16,5%) evoluíram com trombose e 50 pacientes (48,5%) apresentavam sinais de hemólise. Dentre estes, 24 (23,2%) tinham sinais de hemólise já na

apresentação, e 26 (25,3%) evoluíram com hemólise após o primeiro ano do diagnóstico (TABELA 3).

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS

| CARACTERÍSTICA (N=103) | N (%) |
|---------------------------------------|----------------|
| Sexo, masculino | 52 (50,5%) |
| Idade, anos – mediana (variação) | 24,1 (5-62) |
| SINAIS E SINTOMAS | |
| Astenia / Fadiga | 98 (95,1%) |
| Infecção / febre | 48 (46,6%) |
| Sangramento | 68 (66,0%) |
| Hemoglobinúria | 43 (41,7%) |
| Ao diagnóstico | 19 (18,4%) |
| Petéquias e equimoses | 33 (47,1%) |
| Gengivorragia | 12 (17,1%) |
| Metrorragia | 12 (17,1%) |
| Sangramentos intestinais | 3 (4,2%) |
| Dor | |
| Dor abdominal | 33 (38,8%) |
| Cefaléia | 18 (23,4%) |
| Odinofagia /disfagia | 15 (14,5%) |
| Dor lombar | 12 (15,2%) |
| Icterícia | 26 (25,2%) |
| Insuficiência Renal | 14 (13,6%) |
| Trombose | 17 (16,5%) |
| Hemólise | 50 (48,5%) |
| Hemólise ao diagnóstico | 24 (23,3%) |
| Evolução com hemólise | 26 (25,2%) |
| PRIMEIRO HEMOGRAMA HC | |
| Só anemia | 4 (3,9%) |
| Anemia e plaquetopenia | 12 (15,2%) |
| Anemia e neutropenia | 4 (3,9%) |
| Pancitopenia | 83 (80,6%) |
| BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA | |
| Aplasia (<5%) | 52/103 (50,5%) |
| Hipocelular (6-49%) | 38/103 (36,8%) |
| Normocelular ou hiper celular (>=50%) | 13/103 (12,6%) |

N= número de pacientes, HC= Hospital de Clínicas

Ao diagnóstico da SFM os pacientes apresentavam pancitopenia (83 pacientes), anemia com plaquetopenia (12 pacientes), anemia com leucopenia (4 pacientes) e anemia apenas (4 pacientes).

A avaliação histológica da medula óssea mostrou que 89 (86,4%) dos pacientes apresentavam celularidade menor que 30%, sendo 50,5% com

celularidade menor que 5%. Entre estes, todos tinham critérios para AAS (34 pacientes) ou AAM (55 pacientes) no hemograma inicial (TABELA 4). Apesar disto, 42 (47,0%) apresentaram hemólise durante a evolução (39 no subgrupo *HPN+SFM* e 3 no subgrupo *HPN clássica*) e 10 desenvolveram trombose. Seis pacientes tinham medula óssea hipercelular (>70%), e 41,7% apresentavam predominância da linhagem eritroide na avaliação morfológica.

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM CLONE HPN EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO DAS SÍNDROMES DE FALÊNCIA MEDULAR E DO GRAU DE HIPOPLASIA DA MEDULA ÓSSEA

| Variável | N (%) | HPNsc (n=54) | HPN+SFM (n=39) | HPN clássica (n=10) |
|----------------------|----------------|--------------|----------------|---------------------|
| AAS | 34 (33,0%) | 22 (40,70%) | 12 (30,8%) | 0 (0,00%) |
| AAM | 62 (60,2%) | 32 (59,25%) | 27 (69,2%) | 3 (30,0%) |
| Medula óssea | | | | |
| Aplasia (<5%) | 52/103 (50,5%) | 35 (64,9%) | 17 (43,6%) | 0 (0,0%) |
| Hipocelular (6-49%) | 38/103 (36,8%) | 18 (33,3%) | 19 (48,7%) | 0 (0,0%) |
| Normocelular (>=50%) | 13/103 (12,6%) | 1 (1,9%) | 1 (2,6%) | 6 (60,0%) |
| Celularidade** | --- | 5% | 10% | 70% |

N= número de pacientes; AAS= anemia aplástica severa; AAM= anemia aplástica moderada; HPNsc = HPN subclínica; HPN+SFM= HPN com síndromes de falência medular. * Celularidade mediana na biópsia de Medula óssea - p<0,001.

O estudo citogenético foi disponível em 51 casos, sendo 42 normais (26 [46,XX] e 16 [46,XY]). As alterações citogenéticas detectadas estão descritas na TABELA 5.

TABELA 5 – ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS

| CITOGENÉTICA | Subgrupo | Evolução |
|-----------------------------------------|----------------|-----------|
| del(17)(p12) [4]; del(11q23)[4];46XX[8] | HPN subclínica | |
| del 17p | HPN subclínica | |
| Monossomia de X e 15 | HPN subclínica | |
| del 17p | HPN subclínica | |
| -y e -18 | HPN+SFM | SMD / LMA |
| del 11q23 | HPN subclínica | |
| del 11q23, mar1, mar2, cp19 | HPN subclínica | SMD / LMA |
| Trissomia 19 | HPN Clássica | |
| 46xx[15]; 46xy[3] | HPN subclínica | |

Testes de HAM e Sacarose foram realizados em 101 pacientes, pelo menos uma vez. Destes, 71 (70,9%) apresentaram teste positivo em algum momento do acompanhamento, sendo que apenas 30 (31,1%) tinham estes testes positivos no primeiro ano de diagnóstico.

O clone HPN foi identificado ao diagnóstico da anormalidade medular em 53 pacientes (51,5%), e na evolução da doença em 50 pacientes (48,5%), sendo entre 12 e 199 meses após o diagnóstico da anormalidade medular, mediana de 72,4 meses.

5.2 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES ESTRATIFICADOS NAS TRÊS CATEGORIAS CLÍNICAS

Os 103 pacientes foram distribuídos da seguinte forma: 10 pacientes HPN clássica, 39 pacientes HPN + SFM e 54 pacientes HPN subclínica.

Dos 54 pacientes com HPN subclínica, 38 tinham clone detectado ao diagnóstico da síndrome de falência medular, e 16 apresentaram clone em outro momento do acompanhamento clínico.

Entre os 39 pacientes com HPN+SFM, 13 pacientes já apresentavam clínica comprovada de hemólise na chegada, e 26 evoluíram com hemólise posterior, numa mediana de 2,35 anos após o diagnóstico. Há um subgrupo de 11 pacientes que evoluíram com hemólise após o quinto ano de diagnóstico da SFM, com interquartil 75% de 7,35 anos (FIGURA 3).

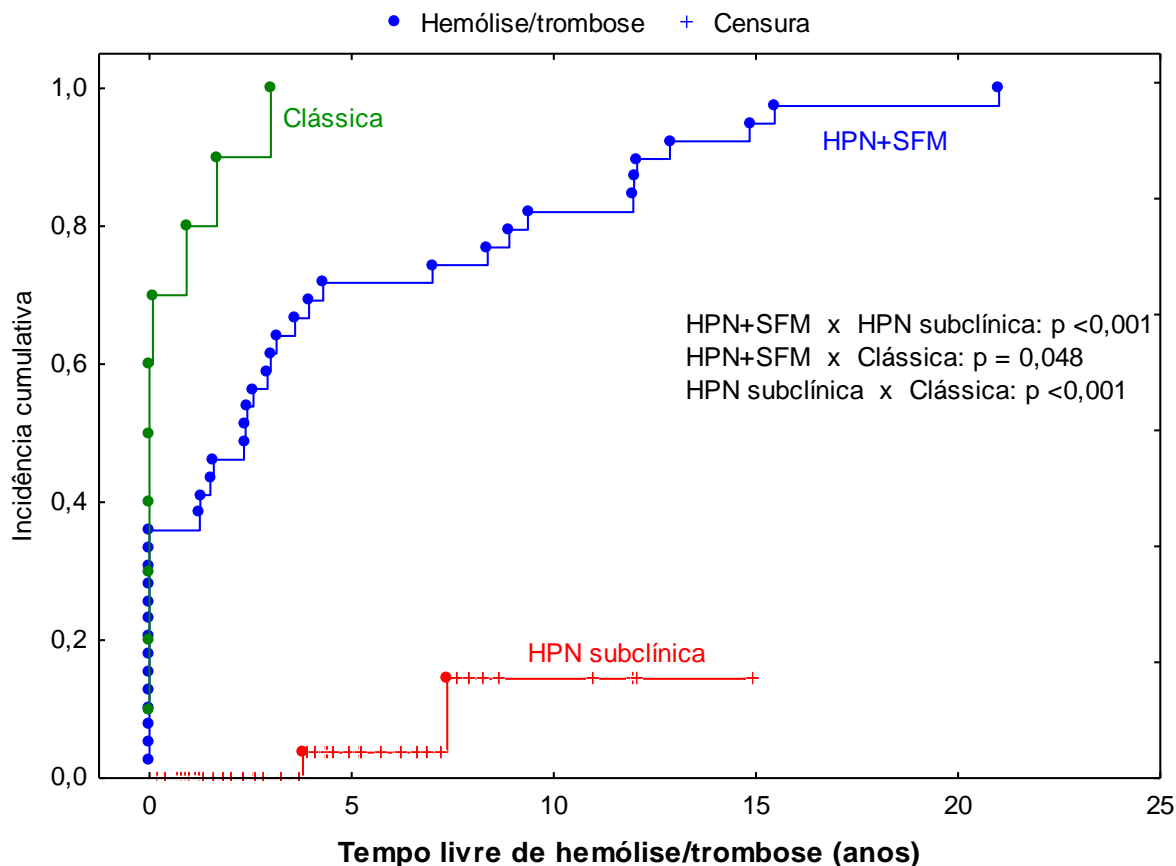


FIGURA 3: INCIDÊNCIA CUMULATIVA DE HEMÓLISE E TROMBOSE NOS GRUPOS HPN CLÁSSICA (CURVA VERDE), HPN+SFM (CURVA AZUL) E HPN SUBCLÍNICA (CURVA VERMELHA).

Houve diferença estatisticamente significativa na incidência de hemólise, trombose, infecção e hemoglobinúria quando comparados os três subgrupos ($p < 0,001$), mas não houve diferença na incidência de astenia e de sangramentos (ANEXO 3). O subgrupo HPN clássica apresentava idade maior que os demais grupos. Foram observadas diferenças entre os três subgrupos em relação à idade, às características do hemograma inicial, parâmetros de hemólise ao diagnóstico da SFM e tamanho do clone HPN (TABELA 6).

Houve diferença em todos os parâmetros de hemólise (DHL, reticulócitos e bilirrubinas) entre os grupos HPN subclínica, HPN+SFM e HPN clássica, o que era de se esperar já que os grupos foram definidos por este critério. A mediana de DHL foi 328UI/L (30-7970UI/L), sendo o valor normal do laboratório 190-240UI/L.

Houve diferença significativa no número de leucócitos e neutrófilos absolutos entre os grupos HPN subclínica e HPN clássica ($p=0,005$ e $p=0,002$), porém este dado não foi discriminativo entre os grupos HPN subclínica e HPN-SFM ($p=0,05$). Já o número de plaquetas foi maior no subgrupo HPN clássica em relação aos outros dois grupos ($p<0,001$). Não foram observadas diferenças nos parâmetros de anemia (hemoglobina e VCM) possivelmente pela influência de transfusões.

A celularidade mediana da medula óssea foi 5% em HPN subclínica, 10% na HPN+SFM e 70% nas clássicas.

TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS DAS TRÊS SUBCATEGORIAS DE PACIENTES

| Grupo | a | b | c | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Variável | Total (n=103) | HPN subc (n=54) | HPN+SFM (n=39) | Clássica (n=10) | Valor de p* (axbxc) | Valor de p (axb) | Valor de p (axc) | Valor de p (bxc) |
| Idade ao diagnóstico (mediana) | 24 (5,2-62) | 25,1 (7,5-62) | 21,5 (5,6 a 49,4) | 34,7 (26,7 a 55,9) | 0,016 ^(a) | 0,322 | 0,017 | 0,004 |
| Laboratório | | | | | | | | |
| Hb (g/dl) | 8,8 (3,8-14,5) | 8,05 (3,8-13,2) | 9,4 (4,5 – 14,5) | 8,95 (5,1-11,7) | 0,261 ^(a) | | | |
| VCM (fl) | 98,7 (82-139,0) | 97,5 (86-97,5) | 99,7 (84,4-99,7) | 101,5 (87,5-101,5) | 0,062 ^(a) | | | |
| Leucócitos (x10 ³ /μl) | 2970 (1140-8800) | 2675 (1140-8800) | 3110 (1470-7780) | 4490 (1600-6680) | 0,008 ^(a) | 0,05 | 0,005 | 0,106 |
| Neutrófilos (x10 ³ /μl) | 944,7 (26-4951) | 825 (26-4664) | 1064 (59-4951) | 2724 (160-3904) | 0,009 ^(a) | 0,266 | 0,002 | 0,017 |
| Plaquetas (x10 ⁶ /μl) | 25 (2-294) | 20 (2-99) | 27 (3-137) | 181,5 (6-294) | <0,001 ^(a) | 0,041 | 0,00 | 0,00 |
| Reticulócitos (x10 ⁶ /μl) | 53,8 (2,35-437,4) | 35,4 (2,4-153,2) | 70,8 (3,2-214) | 240 (78-437) | <0,001 ^(a) | 0,019 | 0,00 | 0,00 |
| DHL (UI/L) | 328,5 (30-7690) | 234 (30-783) | 517 (187-4550) | 1608 (328-7690) | 0,001 ^(b) | 0,002 | 0,00 | 0,00 |
| Bilirrubinas totais (mg/dl) | 0,9 (0,17-7,1) | 0,7 (0,17-4,93) | 1,06 (0,39-3,32) | 2,54 (0,39-7,06) | <0,001 ^(a) | 0,00 | 0,00 | 0,004 |
| Citometria de fluxo | | | | | | | | |
| %[N] | 25,2% (0,25-100) | 7,3 (0,3-68,7) | 63 (1,7-99,8) | 98 (81,3-100) | <0,001 ^(b) | 0,00 | 0,00 | 0,001 |
| %[E] | 2,2% (0-100) | 0,04 (0-18) | 15,8 (0-100) | 82,2 (0-100) | <0,001 ^(b) | 0,00 | 0,00 | 0,018 |
| %[E] / %[N] | 0,2 (0-3,8) | 0,008 (0-1) | 0,323 (0-3,8) | 0,870 (0-1) | <0,001 ^(b) | 0,00 | 0,00 | 0,110 |

Siglas: N= número de pacientes; Hb=hemoglobina; VCM=volume corpuscular médio; DHL=desidrogenase láctica; MO= medula óssea; %[N]= percentagem de clone HPN em neutrófilos; %[E]= percentagem de clone HPN em eritrócitos; DP=desvio padrão.

* valor de p entre as três variáveis. Tabela completa no Anexo 1.

(a) ANOVA com um fator, p<0,05.

(b) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05.

(c) Teste exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado, p<0,05.

5.3. CLONE HPN DETECTADO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A percentagem máxima de clone HPN detectado por CF foi diferente entre os três grupos, tanto em neutrófilos quanto em eritrócitos, sendo a mediana do maior clone respectivamente 7,3% e 0,04% na HPN subclínica, 63,0% e 15,8% na HPN+SFM e 98,0% e 82,2% na HPN clássica (FIGURA 4 e TABELA 6).

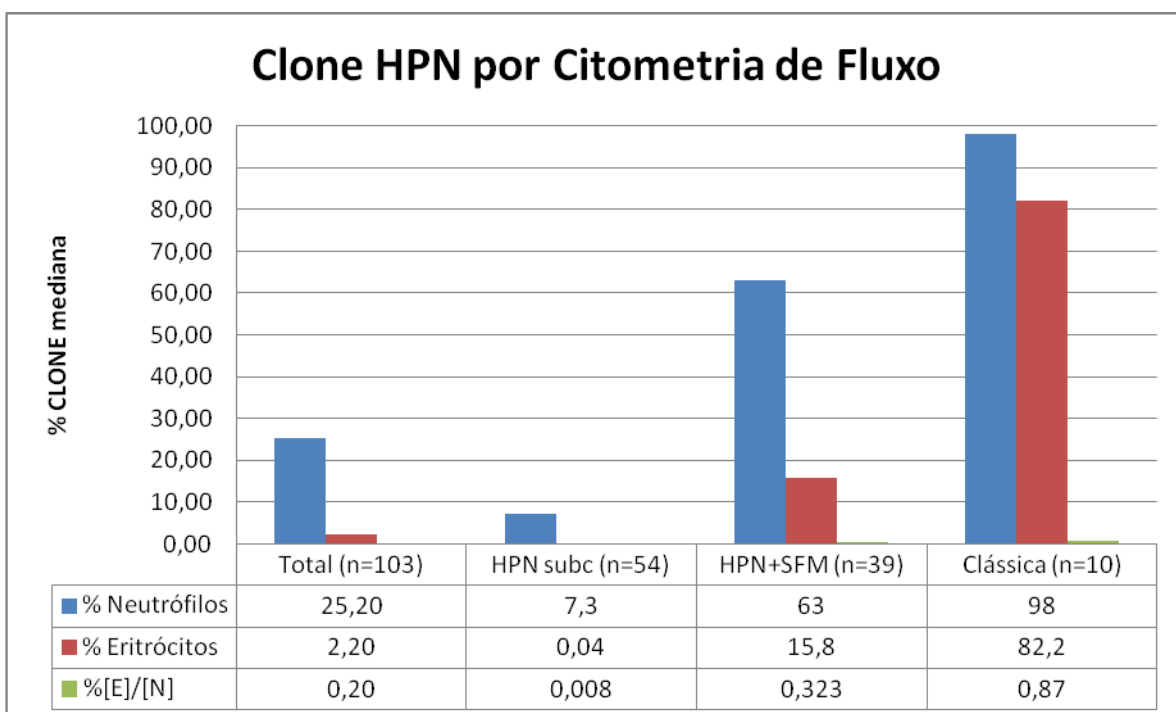


FIGURA 4: GRÁFICO MOSTRANDO A PERCENTAGEM MEDIANA DE CLONE HPN EM NEUTRÓFILOS (AZUL) E ERITRÓCITOS (VERMELHO), RESPECTIVAMENTE DE 7,3% E 0,04% PARA O GRUPO HPN SUBCLÍNICA, 63% E 15,8% NO GRUPO HPN+SFM E 98,0% E 82,2% NO GRUPO HPN CLÁSSICA.

Todos os marcadores utilizados para detecção de clone HPN mostraram-se estatisticamente significativos para discriminar os três subgrupos clínicos, com $p < 0,001$ (FIGURA 5). Assim, a percentagem mediana de células negativas para os marcadores CD55 e CD59 avaliados em eritrócitos e leucócitos, CD16, CD24 e CD66b avaliados em neutrófilos e CD14 em monócitos, parece determinar três níveis percentuais de clone HPN (ANEXO 4). A diferença percentual entre os clones encontrados em eritrócitos e neutrófilos ocorre provavelmente pela influência de transfusões prévias à realização do exame e às crises de hemólise, que selecionariam eritrócitos “normais” no sangue periférico.

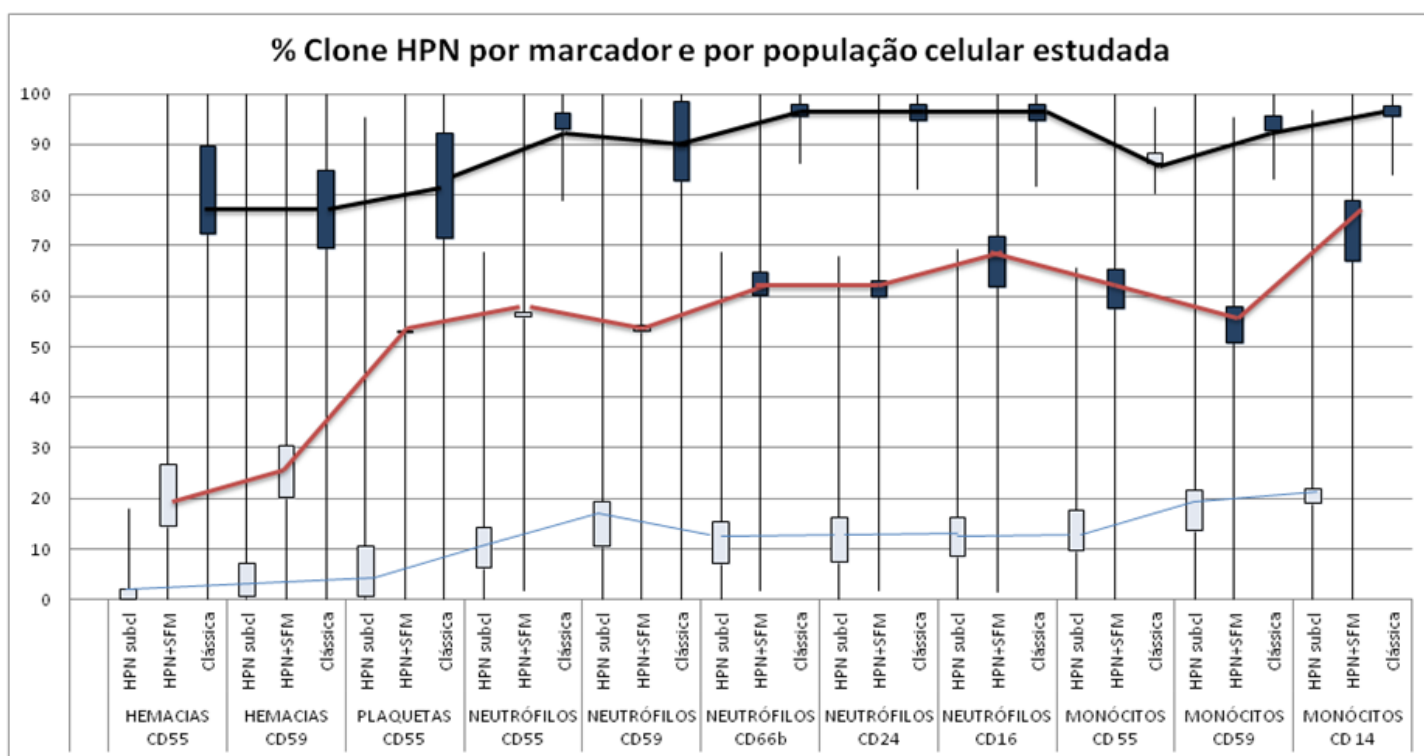


FIGURA 5: GRÁFICO MOSTRANDO TRÊS NÍVEIS DE CLONE HPN DETECTADO, COM SEPARAÇÃO NÍTIDA ENTRE OS SUBGRUPOS HPN SUBCLÍNICA (AZUL), HPN+SFM (VERMELHO) E HPN CLÁSSICA (PRETO).

CLONE EM HEMÁCIAS E PLAQUETAS:

- HPN SUBCLÍNICA: ENTRE 0% E 10% (MEDIANA 0,75%).
- HPN+SFM: ENTRE 14,3% E 52,0% (MEDIANA 20,2%).
- HPN CLÁSSICA: ENTRE 89,7% E 92,2% (MEDIANA 84,9%).

CLONE EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS:

- HPN SUBCLÍNICA (LINHA AZUL): ENTRE 6,4% E 19,0% (MEDIANA 7,1%).
- HPN+SFM (LINHA VERMELHA): ENTRE 56,0% E 78,9% (MEDIANA 63,0%).
- HPN CLÁSSICA (LINHA PRETA): ENTRE 86,7% E 98,4% (MEDIANA 97,8%).

O grupo HPN subclínica apresentava predominantemente clones pequenos: 33 pacientes (61%) tinha clone menor que 10% em neutrófilos, e 51 pacientes (94,4%) tinha clone menor que 10% em hemácias.

No grupo HPN+SFM, dezesseis (41%) e 15 (36,6%) pacientes apresentava clone menor que 10% em granulócitos e hemácias, respectivamente.

Em todos os pacientes com HPN clássica os clones foram maiores que 50% em neutrófilos, e maiores que 10% em hemácias.

Estes dados podem ser observados nos histogramas de frequência de clone HPN em granulócitos (FIGURA 6) e eritrócitos.

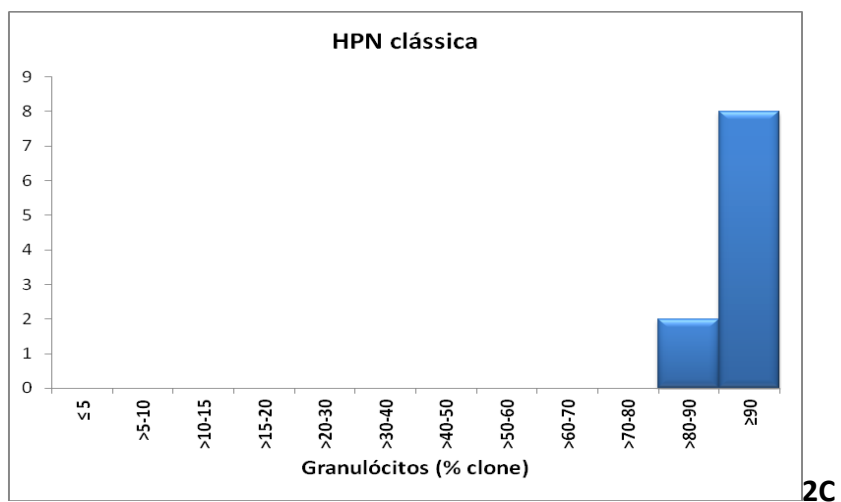
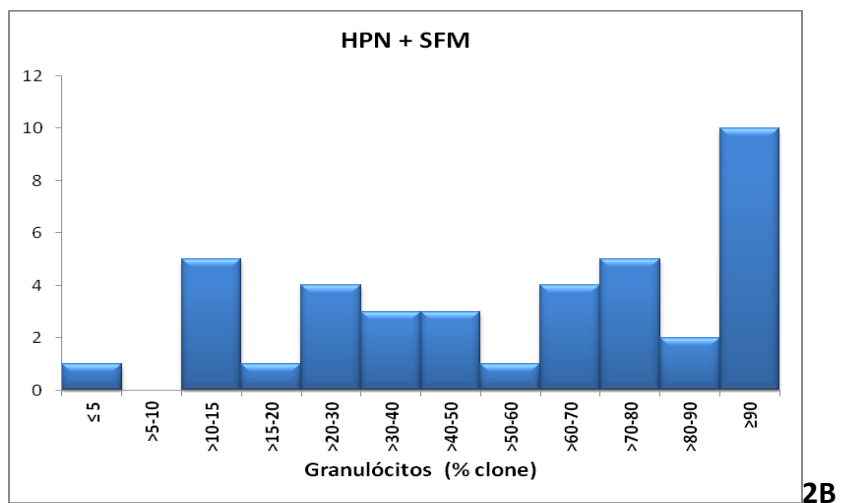
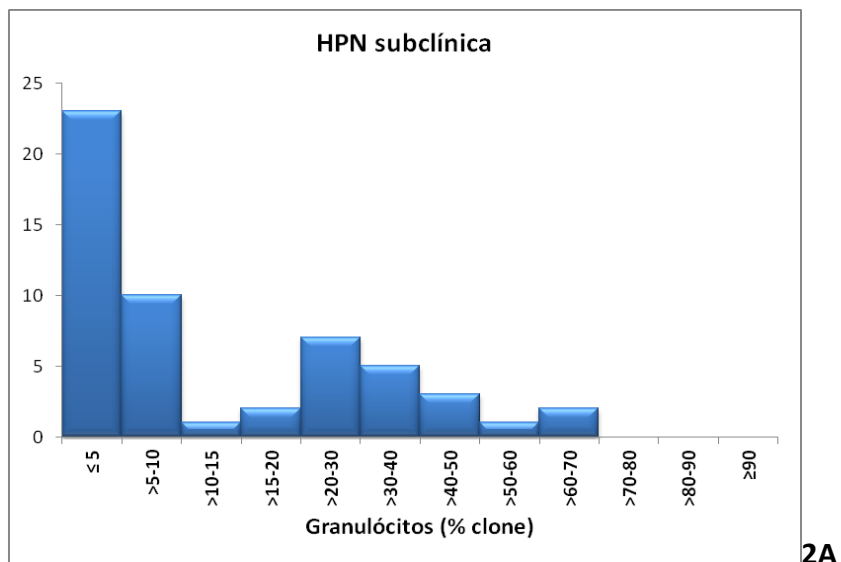


FIGURA 6: HISTOGRAMAS MOSTRANDO A PERCENTAGEM DE CLONE HPN EM GRANULÓCITOS NEUTRÓFILOS COM PREDOMÍNIO DE PERCENTAGENS BAIXAS (<10%) NA HPN SUBCLÍNICA (2A), PERCENTAGENS VARIÁVEIS NO GRUPO HPN+SFM (2B), E PERCENTAGENS ALTAS (>60%) NO GRUPO HPN CLÁSSICA (2C).

5.4 TROMBOSE

Dezessete pacientes apresentaram eventos trombóticos, sendo seis (60%) do grupo HPN clássica, nove (23,1%) do grupo HPN+SFM e dois pacientes (3,7%) do grupo HPN subclínica ($p < 0,001$). Destes, seis foram a óbito por causa direta ou indireta da trombose.

Foram observadas cinco casos de tromboes venosas profundas (TVP), sendo quatro com tromboembolismo pulmonar (TEP) associado, cinco tromboes abdominais (4 veia porta e 1 mesentérica), 5 tromboes arteriais com acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), uma trombose de seio venoso e uma trombose de veias renais. As características e status de sobrevivência deste subgrupo de pacientes estão resumidos na TABELA 7.

TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DOS 17 PACIENTES COM TROMBOSE

| Grupo | Sítio | Gravidade hemograma | % MO | % [N] | % [E] | DHL | Status |
|----------------|-----------------------------|---------------------|------|--------|-------|------|--------|
| HPN subclínica | TVP e TEP | AAS | 1 | 3,40 | 0,60 | 157 | Óbito |
| HPN subclínica | TVP e TEP | AAS | 10 | 61,90 | 0,00 | 215 | Óbito |
| HPN+SFM | Trombose mesentérica | AANS | 10 | 92,70 | 24,00 | 348 | Óbito |
| HPN+SFM | AVC isquêmico | AANS | 10 | 24,30 | 0,00 | 308 | Óbito |
| HPN+SFM | Trombose seios venosos | AANS | 1 | 99,80 | 42,20 | 4550 | Óbito |
| HPN+SFM | AVC isquêmico | AANS | 45 | 94,50 | 74,50 | 1880 | Óbito |
| HPN+SFM | AVC isquêmico | AAS | 2 | 39,70 | 0,00 | 332 | Vivo |
| HPN+SFM | TVP e TEP | AANS | 1 | 30,00 | 44,00 | 1682 | Vivo |
| HPN+SFM | Trombose veia porta /SBC | AANS | 5 | 81,20 | 31,80 | 1248 | Vivo |
| HPN+SFM | Trombose olho esquerdo | AANS | 20 | 98,90 | 25,00 | 569 | Vivo |
| HPN+SFM | TVP e TEP | AAS | 1 | 92,00 | 0,00 | 335 | Vivo |
| Clássica | Trombose veia porta /SBC | AANS | 70 | 99,20 | 100,0 | 328 | Vivo |
| Clássica | AVC e trombose veias renais | | 70 | 98,00 | 75,00 | 3570 | Vivo |
| Clássica | TVP | AANS | 70 | 100,00 | 18,00 | 7690 | Vivo |
| Clássica | Trombose veia porta /SBC | | 50 | 94,60 | 97,10 | 607 | Vivo |
| Clássica | AVC isquêmico | | 70 | 86,30 | 61,90 | 1505 | Vivo |
| Clássica | Trombose veia porta /SBC | | 100 | 98,05 | 95,58 | 3437 | Vivo |

Siglas: TVP=Trombose venosa profunda, TEP= Tromboembolismo pulmonar; AVC= Acidente vascular encefálico; SBC= síndrome Budd Chiari AAS=anemia aplástica severa; AANS=anemia aplástica não severa; % MO= celularidade da medula óssea; % [N]= percentagem de clone em neutrófilos; % [E]= percentagem de clone em eritrócitos; DHL=desidrogenase láctica.

A celularidade da medula óssea nos pacientes com trombose foi menor que 5% em 10 pacientes (mediana 10%, variando de 1% a 100%). Seis pacientes preenchem critérios para AAS pelo hemograma, e sete para AANS. A mediana de hemoglobina neste grupo foi de 6,5 g/dL (4-11,2 g/dL), de leucócitos $2600 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($1200-6800 \times 10^3/\mu\text{L}$), plaquetas $31 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($6-312 \times 10^6/\mu\text{L}$), reticulócitos 2,8% (0,1-11,6%) e DHL 607 UI/L (157-7690 UI/L). Houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que apresentaram evento trombótico ou não em relação às variáveis plaquetas ($p=0,001$) e DHL ($p=0,002$). Estes dados estão mostrados na TABELA 8.

TABELA 8 – DIFERENÇAS ENTRE PACIENTES COM E SEM TROMBOSE

| Trombose | SIM | NÃO | p* |
|-------------------------------------------|------------|------------|-----------|
| Celularidade MO | 10% | 5% | $p=0,166$ |
| Hb g/dl | 8,8 | 6,5 | $p=0,682$ |
| Leucócitos ($\times 10^3/\text{ul}$) | 3500 | 2600 | $p=0,663$ |
| Reticulócitos ($\times 10^6/\text{ul}$) | 78,2 | 48,6 | $p=0,046$ |
| Plaquetas($\times 10^6/\text{ul}$) | 67,0 | 31,5 | $p=0,001$ |
| DHL (U/L) | 607 | 299 | $p=0,002$ |
| Clone HPN Neutrófilos | 92,7% | 21,5% | $p<0,001$ |
| Clone HPN Hemácias | 31,8% | 1,2% | $p=0,008$ |

* Teste do Qui-quadrado; Hb= hemoglobina; MO= Medula óssea; DHL=desidrogenase láctica.

Os clones foram maiores que 50% em neutrófilos em 13 pacientes com eventos trombóticos, e clone menor que 10% foram observados em apenas um paciente, $p<0,001$. Cinco dos 17 pacientes que apresentaram eventos trombóticos tinham clone HPN no momento do diagnóstico (HPN clássicas) e 12 casos evoluíram com clone numa mediana de 40,2 meses após o diagnóstico inicial.

As percentagens medianas de clone HPN em neutrófilos e eritrócitos neste grupo foram significativamente maiores que as percentagens

encontradas entre os pacientes que nunca apresentaram trombose, respectivamente [N] = 92,7% (3,4%-100%) versus 21,5% (0,25%-99,88%), $p < 0,001$, e [E] = 31,8% (0-100%), versus 1,2% (0-100%), $p = 0,008$ (dados mostrados na FIGURA 7).

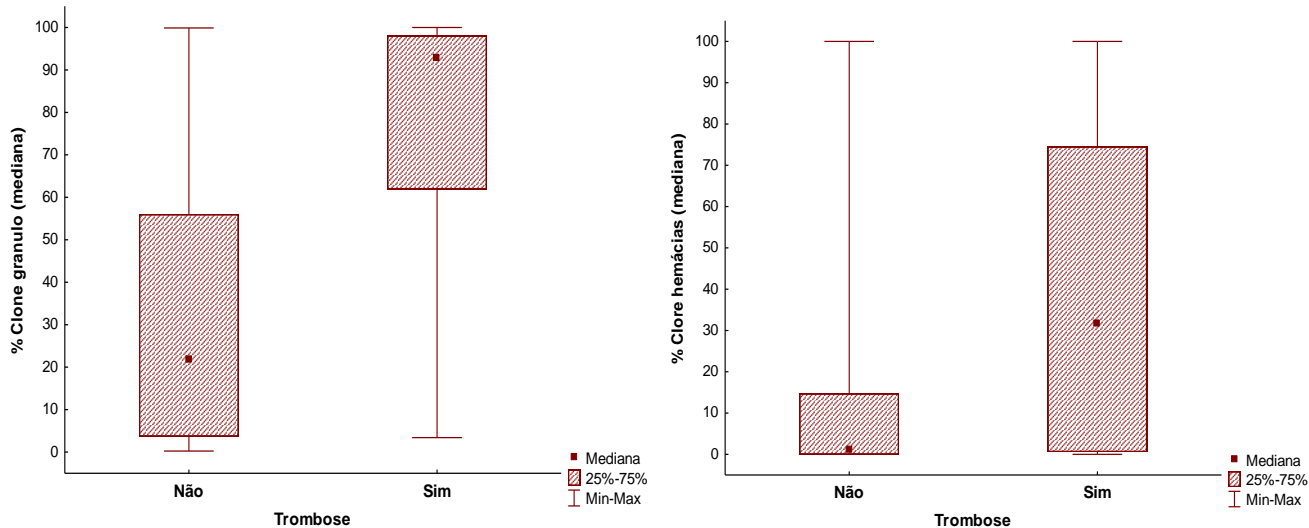


FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MEDIANA DOS CLONES HPN EM NEUTRÓFILOS ($P < 0,001$) E HEMÁCIAS ($P = 0,008$) EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE TROMBOSE.

5.4 TRATAMENTO

As medidas terapêuticas foram instituídas a critério do médico assistente e da época em que os pacientes foram atendidos. Assim, 94 (91,26%) pacientes receberam algum tipo de tratamento no HC-UFPR, como descrito na Tabela 9:

TABELA 9 – TRATAMENTOS INSTITUÍDOS

| TRATAMENTO | n/N (%) |
|-----------------------------------------|-----------------|
| Nenhum | 9/103 (8,7%) |
| Corticoide | 90/94 (95,7%) |
| Ciclosporina | 77/94 (81,9%) |
| Imunossupressão (CSA+CTC) | 57/94 (60,6%) |
| ATG | 12/94 (12,7%) |
| TCTH | 27/94 (28,7%) |
| Outros (Oximetolona) | 10/94 (10,6%) |
| Eculizumab® | 5/94 (5,3%) |
| Transfusões hemácias ou plaquetas (Sim) | 100/103 (97,1%) |
| >15 bolsas | 67/100 (67,0%) |

Setenta e sete pacientes (74,8%) receberam o protocolo de imunossupressão do HC (corticoide + CSA) e 11 pacientes (11,6%) receberam timoglobulina. 90 pacientes (87,4%) receberam corticosteroides e 10 (9,7%) pacientes foram tratados com oximetolona em algum momento do tratamento.

Três pacientes (2,9%) evoluíram para SMD e dois destes tiveram transformação leucêmica e necessidade de tratamento com quimioterapia seguida de TCTH.

Ao todo 27 pacientes (28,4%) foram submetidos à TCTH, sendo 17 do grupo *HPN subclínica* e oito do grupo *HPN+SFM*, todos com indicação de transplante por citopenias de risco. Apenas dois pacientes do grupo HPN clássica foram transplantados. Observou-se 70,4% de resposta completa (19

pacientes) e 22,2% de respostas parciais (6 pacientes); 2 pacientes foram a óbito com menos de 100 dias do transplante (MRT).

A partir de 2008 iniciou-se o uso de Eculizumab® para tratamento dos sintomas hemolíticos. No final desta análise cinco pacientes estavam recebendo a droga (4,9%).

Em relação às transfusões de concentrados de hemácias ou plaquetas, foi visto que 100 pacientes (97,1%) receberam transfusão pelo menos uma vez durante o acompanhamento, sendo que 56 pacientes receberam mais de 15 unidades de hemácias ou plaquetas.

5.5 ANÁLISES DE SOBREVIDA

Durante o período de acompanhamento deste estudo, 14 pacientes foram a óbito, sendo nove (16,7%) do grupo *HPN subclínica* e cinco (12,8%) do grupo *HPN+SFM*. Nenhum óbito foi registrado no subgrupo *HPN clássica*. As causas de óbito foram sepsis em seis (42,9%) pacientes, tromboembolismo pulmonar (TEP) em 4 pacientes, trombose mesentérica em 2, DECH grave pós TCTH em um paciente e uma morte súbita.

A sobrevida global foi 81,7% em 10 anos no grupo total (FIGURA 8), e 87,9% nos grupos de *HPN clássica e HPN+SFM*, versus 76,5% no grupo com aplasia (*HPN subclínica*). A diferença não apresentou significância estatística, $p=0,112$ (FIGURA 9).

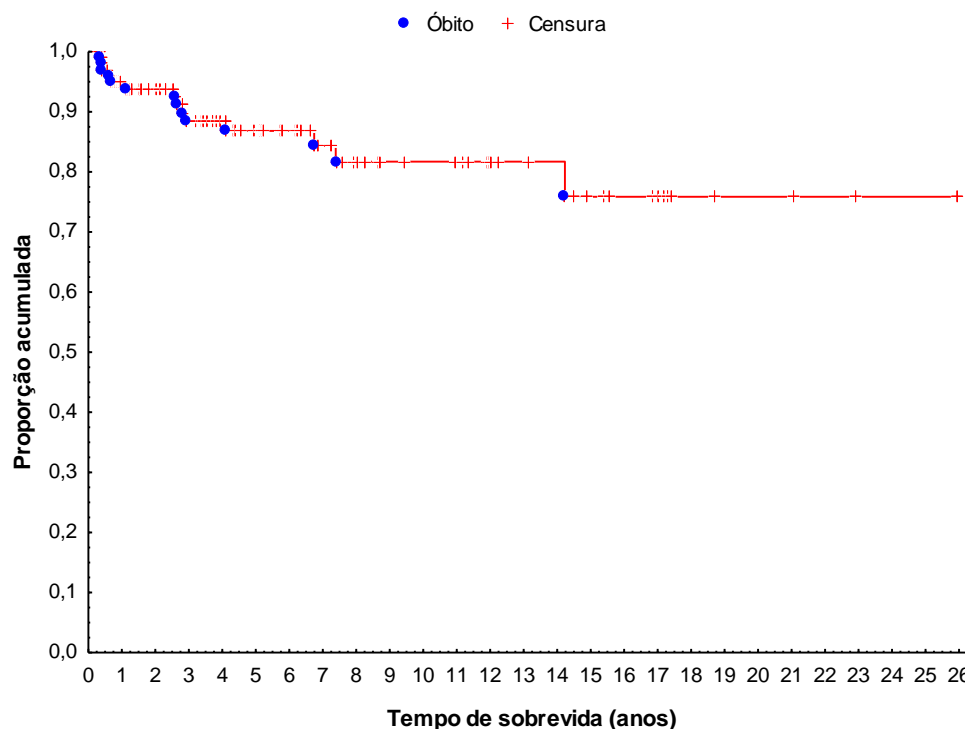


FIGURA 8: CURVA DE KAPLAN-MEIER CONSIDERANDO-SE TODOS OS CASOS (MEDIANA DE 81,7% EM 10 ANOS).

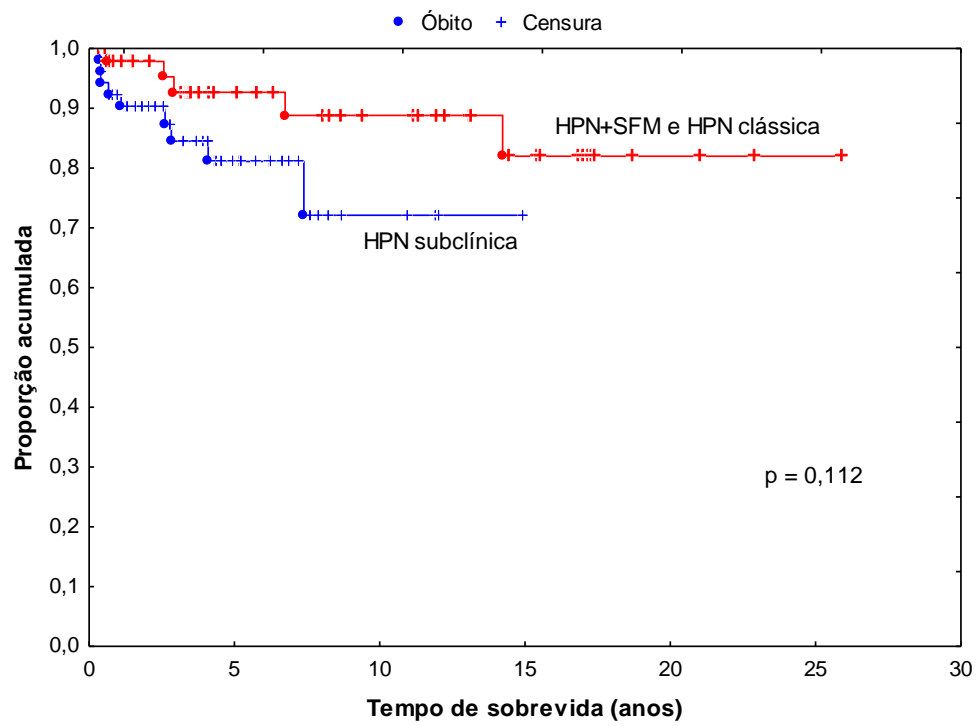


FIGURA 9: CURVA DE KAPLAN-MEIER CONSIDERANDO-SE OS GRUPOS HPN CLÁSSICA E HPN+SFM, VERSUS GRUPO COM APLASIA (HPN SUBCLÍNICA).

6 DISCUSSÃO

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna é uma desordem clonal e rara da hematopoese, que se caracteriza por um curso clínico altamente variável, o qual engloba hemólise intravascular, síndromes de falência medular e tendência a trombozes^{1, 2, 3, 25}. Nos últimos anos o número de pacientes com diagnóstico da síndrome HPN tem aumentado provavelmente devido à facilidade na detecção de clones deficientes em GPI ou *Clone HPN*, através do uso de técnicas sensíveis como a citometria de fluxo^{5,10}. Observa-se, entretanto, que a heterogeneidade da doença torna imprescindível a correlação dos resultados da CF com as informações clínicas e laboratoriais para o correto diagnóstico e classificação destes pacientes. Além disso, a presença tanto da hemólise quanto da falência medular deve ser bem definida para um manejo terapêutico ótimo^{1, 3, 5, 21, 25, 27, 29, 39}.

Para uniformizar a nomenclatura e melhorar o diagnóstico e entendimento da doença, o grupo internacional para o estudo da HPN - IPIG (International PNH Interest Group) propôs critérios clínicos para classificação da doença em três categorias: HPN clássica, HPN com falência medular e HPN subclínica^{1, 25, 29}.

Apesar de amplamente utilizada^{1, 3, 18, 21, 25, 27, 32, 33, 34}, a classificação sugerida acima pode ser alvo de críticas, uma vez que não foi desenvolvida através de estudos clínicos e laboratoriais prospectivos que pudessem avaliar prognóstico, e sim de um consenso de especialistas. Os próprios autores sugerem que investigações posteriores podem sugerir modificações nas três

subcategorias propostas¹. Do ponto de vista prático, observa-se que a presença de hemólise clínica é um dado difícil de determinar, pois tanto a reticulocitose quanto o aumento da DHL são parâmetros que podem estar alterados como resposta medular à anemia ou por situações clínicas diversas²⁵, e a mensuração de haptoglobina não é universal. Além disso, para alguns autores “HPN subclínica” é considerada como a presença de pequenos clones GPI deficientes, menores que 1%, detectados por métodos muito sensíveis^{1,5}. Outros consideram a ausência de sintomas clínicos (hemólise ou trombose), com qualquer tamanho de clone, mas geralmente menor que 10%^{3, 25, 32, 33, 34}. Mesmo com essas fragilidades, o uso desta classificação possibilitou uma uniformização na linguagem utilizada nos estudos de HPN²⁵.

O ambulatório de Falência Medular do HC-UFPR atende pacientes com diagnóstico de aplasia e hipoplasia medular, os quais podem apresentar evolução clonal com HPN. A frequência deste diagnóstico aumentou a partir de 2006 devido à implantação da triagem com citometria de fluxo para todos os pacientes com pancitopenia (FIGURA 10).

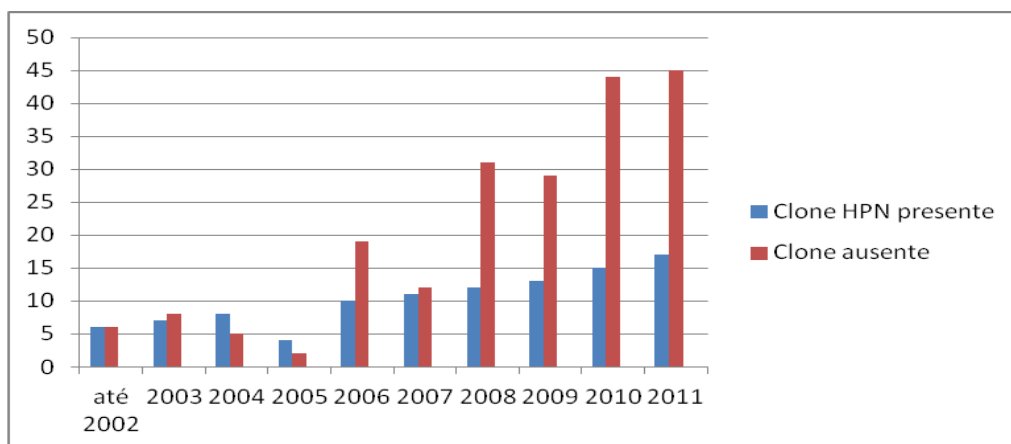


FIGURA 10 – CLONE HPN NOS PACIENTES ATENDIDOS NO HC-UFPR DE 1999 A 2011.

A história natural da HPN vem sendo amplamente discutida na literatura desde os anos 70 a partir de várias séries retrospectivas^{2, 3, 4, 6, 16, 32}, as quais confirmam a associação entre HPN e SFM. A proporção de pacientes com hipoplasia medular que desenvolvem HPN clínica ou subclínica varia amplamente entre os estudos (de 22%¹⁵ a 40%²¹). A associação da HPN com hipoplasia de medula óssea foi observada numa série de 220 pacientes franceses descrita por Socié e cols², que identificaram 65 (30%) pacientes nos quais o diagnóstico de anemia aplástica precedia o diagnóstico de HPN. Hillmen e cols⁴ reportaram 23 de 80 pacientes com HPN (29%) com história prévia de anemia aplástica. Ambos consideravam os testes de Ham e sacarose para o diagnóstico de HPN. Estes estudos mostraram ainda que entre 5 a 10% dos pacientes com HPN clássica desenvolvem posteriormente pancitopenia^{2, 4}. Com uso de CF em pacientes com anemia aplástica, Dunn e cols¹⁵ reportaram 22 de 115 (22%) pacientes com clone HPN, e mais recentemente o grupo do National Institutes of Health (NIH) encontrou 40% de clone HPN em 207 pacientes consecutivos com AAS²¹.

Na casuística aqui estudada identificamos clone HPN em 31,4% (125 de 398 pacientes), dos quais 103 foram estudados. Destes, 86,4% tinham hipoplasia de medula ao diagnóstico, sendo que 54 permaneceram sem manifestações clínicas de hemólise no período de acompanhamento (HPN subclínica) e 39 apresentaram hemólise clínica documentada (HPN+SFM). A alta prevalência de hipoplasia medular pode ser explicada pela característica deste centro de receber casos de aplasia vindos de todo o país. Por outro lado, não foi possível estimar a incidência de clone HPN na população total de pacientes com AAS acompanhados no serviço, por uma fragilidade dos dados,

já que a porcentagem de pacientes testados era pequena até o início de 2006. Uma revisão recente do nosso serviço mostrou clone HPN maior que 1% ao diagnóstico em apenas 12 pacientes (9,7%) de 124 avaliáveis, tendo sido testados menos que 1/3 da amostra total (384 pacientes)³⁷.

A idade mediana encontrada nesta serie de casos foi mais baixa que na literatura (24,1 anos x 30 a 34,2 anos)^{3, 21 34}. Entretanto, quando observamos os subgrupos clínicos, a idade mediana na HPN clássica é semelhante (34,7 anos), enquanto os subgrupos HPN+SFM e HPN subclínica tem mediana menor (21,5 e 25,0 anos). Isto ocorreu por considerarmos o diagnóstico de aplasia como início da doença, incluindo 23 (22,3%) pacientes pediátricos com aplasia que evoluíram com clone HPN num seguimento longo. No estudo do NIH foram observados 6,8% de pacientes com menos de 18 anos, sendo que nenhum deles apresentou complicações trombóticas ou hemolíticas graves²¹.

Astenia, infecções e sangramentos foram mais frequentes que o encontrado na literatura^{1, 3, 4}, provavelmente pela maior inclusão de pacientes com aplasia. Por outro lado, mesmo com medula óssea hipocelular, 17 pacientes (16,5%) evoluíram com trombose e 50 pacientes (48,5%) apresentaram sinais de hemólise.

Várias tentativas de classificar os pacientes com HPN foram descritas na literatura^{1,3}. De Latour e cols.³ estudaram retrospectivamente uma série grande de pacientes franceses, através de um questionário enviado aos médicos assistentes, onde foram identificados 460 pacientes com testes de Ham ou CF positivos, os quais foram classificados conforme o hemograma ao diagnóstico. Os pacientes que apresentavam apenas anemia eram alocados no grupo HPN clássica; aqueles com pelo menos duas citopenias eram alocados no grupo HPN-AA, e os restantes permaneciam em um grupo intermediário. Foi observado que o grupo com HPN clássica teve sobrevida menor, maior incidência de trombose e maiores níveis de clones GPI deficientes. Por outro lado a evolução clínica não foi diferente entre os grupos. Esta classificação baseada no hemograma não avaliava a presença de hipoplasia de medula óssea nem os parâmetros clínicos de hemólise²⁴.

O presente relato aplicou a classificação do grupo IPIG em uma amostra retrospectiva, sendo provável que haja superposições de pacientes entre os grupos devido à heterogeneidade da casuística avaliada e do viés da análise retrospectiva. No grupo HPN+SFM (39 pacientes), por exemplo, existem oito (20,5%) pacientes com clones entre 50 e 100% em hemácias. Todos estes pacientes se comportaram como HPN clássica apresentando crises hemolíticas documentadas, um deles com trombose e dois deles com hemólise já no diagnóstico de aplasia. Entretanto, pela presença de medula óssea hipocelular foram classificados como HPN+SFM.

Mesmo com essa dificuldade na discriminação dos três grupos clínicos, pode-se concluir que houve diferença com significância estatística nos sintomas clínicos, nos níveis de leucócitos, neutrófilos, plaquetas, reticulócitos,

DHL e na percentagem de clone HPN entre os três grupos, e principalmente entre HPN subclínica e HPN clássica. É provável que os níveis de hemoglobina e VCM tenham sido semelhantes devido à interferência de transfusões no momento da avaliação. Estes dados foram semelhantes aos encontrados por um estudo recente com 280 pacientes chineses com HPN³⁴, que também mostrou que o grupo HPN clássica apresentava maior relato de hemoglobinúria, e menos infecções ou sangramentos que o grupo HPN subclínica.

Em relação ao tamanho do clone HPN, observamos que este foi capaz de discriminar os subgrupos clínicos propostos, fato também sugerido por outros estudos que investigaram a história natural da HPN no cenário das falências medulares, como as análises americana³³, europeia²¹, coreana³² e chinesa³⁴. O clone HPN foi menor que 20% em todos os pacientes na HPN subclínica, variou entre 10 e 60% no grupo HPN+SFM, e foi maior que 50% na HPN clássica. Estes dados confirmam que as três categorias clínicas podem ser diferenciadas não só pela biópsia de medula óssea e presença de hemólise documentada, mas também pela percentagem de clone HPN.

A literatura sugere ainda que as manifestações clínicas decorrentes da hemólise crônica na HPN parecem ser mais comuns nos pacientes com grandes populações de células deficientes nos grupos GPI^{1,25, 32-34}. Estudos recentes³³ tem mostrado uma relação linear entre o tamanho do clone HPN e o desenvolvimento de hemólise intravascular em pacientes com aplasia³³. Na série americana, somente 15% dos pacientes com clone menor que 15% em granulócitos desenvolveu DHL maior que 1,5 vezes o normal em cinco anos,

em contraste com a maioria dos pacientes com clones maiores que evoluem com aumento do DHL e hemólise franca³³.

Na HPN clássica a presença de clone HPN em neutrófilos maior que 50% tem sido associada a maior risco de trombose^{25, 32, 34, 37}. Na avaliação de 163 pacientes com HPN clássica o risco de desenvolver trombose em 10 anos foi 44% para os pacientes com clones maiores 50%, e de 5,8% para os pacientes com clones menores que 50%³⁷. Este fato foi confirmado pelo presente relato, no qual o tamanho do clone HPN foi significativamente maior nos pacientes com trombose tanto em neutrófilos (92,7% x 21,5%) quanto em hemácias (31,8% x 1,2%). Já entre os pacientes com SFM o estudo do NIH sugere que o tratamento de complicações hemolíticas ou trombóticas parece ser necessário em apenas 50% dos casos²¹, fato também confirmado no nosso estudo. A literatura sugere ainda que os pacientes com clones grandes deveriam fazer uso de medicamentos anticoagulantes ou até mesmo ser tratados antes da ocorrência de alguma complicação trombótica³⁷.

Existem poucos estudos que investigaram a evolução do clone HPN em pacientes com aplasia, mas todos mostram que pacientes com clones muito pequenos raramente apresentam evidências de hemólise ao longo do tempo^{19, 21, 32, 33}. Entre os 40% de pacientes com aplasia e clone HPN pré-tratamento avaliados pelo NIH, a mediana do clone era 9,7% (3,5-29%), valores que se mantiveram estáveis ao longo do tempo na maioria dos pacientes²¹. Naquele trabalho apenas 8,6% (18 pacientes) apresentaram clone maior que 50% em qualquer momento do acompanhamento, sendo que a maioria dos pacientes com AAS se manteve no grupo HPN subclínica, e raramente necessitou de tratamento específico para a hemólise²¹. O mesmo

ocorreu na série aqui analisada, onde a maioria dos pacientes com clone HPN identificado pela CF e hipoplasia de medula permaneceu sem hemólise clinicamente identificada (52%). Semelhante à literatura, onde 25 a 30% dos pacientes evoluem com HPN clínica^{2, 3, 4, 21, 34}, apenas 26 (25,4%) dos nossos casos desenvolveram hemólise clinicamente identificável. O tamanho do clone foi maior no grupo que apresentava sintomas hemolíticos, assim como reportado na literatura^{3, 21, 34, 37}.

A análise de pacientes com clone HPN em qualquer fase do acompanhamento clínico, tanto os que apresentavam clone no momento do diagnóstico da aplasia quanto os que evoluíram posteriormente mostrou que metade dos pacientes desenvolveu o clone HPN após o diagnóstico de aplasia, em 5 a 7 anos. O principal viés deste estudo consiste no fato de que não há dados claros que possam indicar se houve ou não influência de algum tratamento imunossupressor ocasionando a evolução dos casos de aplasia para hemólise ou se havia correlação positiva com resposta, uma vez que condutas e tratamentos utilizados não foram padronizados e nem todos os pacientes atendidos no HC foram testados para presença de clone HPN³⁶. Estudos prévios mostraram que a presença de um clone GPI deficiente poderia prever melhor resposta aos tratamentos imunossupressores^{15,19}, fato que não pode ser avaliado no presente estudo pelos motivos expostos acima. Observa-se, entretanto, uma sobrevida global semelhante aos estudos com HPN^{2, 3, 34}, mas acima da média encontrada nos estudos com AAS²¹, incluindo o nosso serviço³⁷.

A evolução para SMD e leucemias agudas é um evento raro em pacientes com HPN³. Neste estudo encontramos apenas três pacientes com

SMD, sendo que dois evoluíram com leucemia aguda e necessitaram de terapias específicas e TCTH.

A mortalidade foi baixa em todo o grupo, e ligeiramente maior no subgrupo de HPN subclínica, provavelmente pelo maior risco de complicações devido às consequências da aplasia, já que seis (42%) óbitos foram por sepses grave e dois (14,3%) por complicações relacionadas ao transplante. Por outro lado, a mortalidade do subgrupo que apresentou trombose foi muito alta (35,0%) e esses óbitos tiveram como principal causa direta ou indireta a própria trombose. Não foi possível confirmar os estudos que sugerem um pior prognóstico nos pacientes que apresentam a forma clássica da doença pelo pequeno número de pacientes incluídos neste subgrupo.

Embora as manifestações clínicas da HPN dependam em grande parte ao tamanho do clone, a extensão da associação com SFM também contribui significativamente para as manifestações da doença. Os achados da citometria de fluxo em pacientes com clone HPN devem ser correlacionados com as informações clínicas e laboratoriais para o correto diagnóstico, classificação e tratamento.

7 CONCLUSÕES

- 7.1. No período entre dezembro de 1999 e dezembro de 2011 foram identificados 103 pacientes com **clone HPN** maior que 0,1% atendidos no ambulatório de SFM do HC-UFPR.
- 7.2. Os pacientes foram estratificados nas seguintes categorias: 10 (9,7%) pacientes HPN clássica, 39 (37,8%) HPN + SFM e 54 (52,5%) HPN subclínica. O predomínio das formas com falência medular clínicas ou subclínicas ocorre provavelmente por se tratar de um centro de referência para tratamento de aplasias.
- 7.3. Há diferença com significância estatística nos níveis de leucócitos, neutrófilos, plaquetas, reticulócitos, DHL, bilirrubinas e na percentagem de clone HPN entre os grupos, principalmente entre HPN subclínica e HPN clássica. Não houve diferença na sobrevida global.
- 7.4. O Clone HPN detectado por CF em neutrófilos pode discriminar os subgrupos clínicos, pois foi significativamente maior no subgrupo HPN clássica (98,0%), intermediário na HPN-SFM (63,0%), e menor no subgrupo HPN subclínica (7,3%). Clones maiores que 50% em neutrófilos estão associados a maior incidência de eventos trombóticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parker C, Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2005; 106:3699-3709.
2. Socié G; Mary JY; de Gramont A *et al.* Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet*, 1996, 348: 573-577.
3. De Latour RP; Mary JY; Salanoubat, C *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Natural history of diseases subcategories. *Blood* 2008, 112:3099-3106.
4. Hillmen P; Lewis, SM; Bessler, M *et al.* Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New Engl. J. Med.*, 1995, 333: 1253-1258.
5. Borowitz, MJ; Craig, FE; DiGiuseppe, JA. *et al.* Guidelines for the diagnosis and monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010.
6. Dacie, JV & Lewis, SM. Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: Clinical Manifestations, Haematology and Nature of the Disease. *Sem. Hematol.* 1972; 3: 3-23.
7. Rosse, WF & Ware, RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 1995;86 (9): 3277-3286.
8. Mortozavi, Y; Merk, B; Mcintosh, J *et al.* The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): a high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood*, 2003, 101 (7): 2833-2841.

9. Hall SE; Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 1996, 87 (12): 5332-5340.
10. Hernández-Campo, PM; Almeida, J; Acevedo, MJ *et al.* Detailed Immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 2008; 48: 1403-1414.
11. Piedras J; López-Karpovitch X. Flow cytometry analysis of glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry*, 2000, 42:234-238.
12. Dacie, JV & Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Variation in clinical severity and association with bone-marrow hypoplasia. *Br. J Haematol.*, 1961, 7:442-457.
13. Schechter AN & Gladwin MT. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med.* 2003; 348:1483-1485.
14. Helley D; De Latour, RP; Porcher R *et al.* Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica.* 2010; 95(4): 574-581.
15. Dunn DE. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Cells in Patients with Bone Marrow Failure Syndromes. *Annals of Internal Medicine*, 1999, 131:401-408.

16. Nakamura, H; Nagakura S; Iwamoto N *et al.* Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clone in Bone Marrow of Patients with Pancytopenia. *Blood*, 1995; 85:1371-1376.
17. Griscelli-Bennaceur A; Gluckman E; Scrobohaci ML *et al.* Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link. *Blood*, 1995, 85(5): 1354-1363, 1995.
18. Hill A.; Richards, S.J. & Hillmen, P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology* 2010; 149(3):414-25.
19. Sugimori, C, Chuhjo, T, Feng, X *et al.* Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*, 2006;107:1308-1314.
20. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL *et al.* Detection of Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic Syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica* 2009; 94(1):29-37.
21. Scheinberg, P; Marte, M; Nunez,O & Young, NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica*, 2010;95(7):1075-1080.
22. Rosse, WF. Dr. Ham's test revisited. *Blood* 1991;78:547-550.

23. Hernández-Campo, PM; Almeida, J; Sanchez, ML; Malvezzi, M & Orfao, A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70:71-81.
24. Sutherland, DR, Kuek N; Davidson J *et al.* Diagnosing PNH with FLAER and Multiparameter Flow Cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 2007; 72B:167–177.
25. Parker, CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol.* 2012; 19(3):141-8.
26. Santarone, S; Bacigalupo, A; Risitano, AM *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long term results of a retrospective study on behalf of Grupo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica* 2010;95:983-988.
27. De Latour, RP; Schezenmeier, H; Bacigalupo, A *et al.* Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2012; 97(11):1666-1673.
28. Hillmen, P; Young, NS; Schubert, J *et al.* The complement inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006;355:1233-43.
29. Hill A.; Richards, S.J. & Hillmen, P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology* 2010; 149(3):414-25.

30. Camitta BM, Rapeport JM, Parkamn R *et al.* Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood*. 1975;45:355-363.
31. Swerdlow, SH; Campo, E; Harris, NL; Jaffe, ES; Pileri, AS; Stein, H; Thiele, J; Vardiman, JW. (Eds.): WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
32. Kim, JS; Lee, JW; Yoon, S-S *et al.* Association between elevated hemolysis at diagnosis and early mortality and risk of thrombosis in Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients with cytopenia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2010; 116:Abstract 4241.
33. Pu, JJ; Mukhina, G; Wang,H; Savage, WJ; Brodsky, RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *British Journal of hematology*, 2011; 87(1):37–45.
34. Ge, M; Li, X; Shi, J & Shao, Y. Clinical features and prognostic factors of Asian patients with nocturnal hemoglobinuria: results from a single center in China. *Ann Hematol* 2012; 91:1121-1128.
35. Brodski R. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Stem Cells and Clonality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:111-115.
36. Santos Arruda, MMA; Rodrigues, CA; Yamamoto, M & Figueiredo, MS. Hemoglobinúria Paroxística Noturna: da Fisiopatologia ao tratamento. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(2):214-221.
37. Medeiros, LA. Tratamento imunossupressor com Ciclosporina e Prednisona na anemia aplástica: seguimento de 20 anos e estudo

dos fatores preditores de resposta num centro de referencia brasileiro. Dissertação de mestrado, Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná. 2011.

38. Hall C; Richards S & Hillmen P. Primaty prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in PNH. *Blood* 2003; 102:3587-3591.
39. Parker, CJ. Management of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology*, 2011:21-29.
40. Richards, SJ, Rawstron, AC & Hillmen, P. Application of Flow Cytometry to the Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry*, 2000:42:223–233.

9 ANEXOS

ANEXO 1 – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

DADOS DEMOGRÁFICOS

| | | |
|-----------------|----------------------|------|
| Nome | Procedência | |
| Data nascimento | Idade ao diagnóstico | Sexo |

HISTÓRIA CLÍNICA

| | | |
|--------------------------------------|------------|------------|
| Presença de: | SIM | NÃO |
| Fraqueza | Sim | Não |
| Infecções de repetição | Sim | Não |
| Sangramentos | Sim | Não |
| Anemia | Sim | Não |
| Plaquetopenia | Sim | Não |
| Leucopenia | Sim | Não |
| Urina escura (hemoglobinúria) | Sim | Não |

| | | | | | |
|---------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|
| Dores | Sim | Não | | | |
| Disfagia | Sim | Não | Impotência sexual | Sim | Não |
| Dor abdominal | Sim | Não | Icterícia | Sim | Não |
| Odinofagia | Sim | Não | Insuf renal | Sim | Não |
| Cefaléia | Sim | Não | | | |
| Dor lombar | Sim | Não | | | |

| | | | |
|--------------------|-----|-----|-----------------|
| Tromboses | Sim | Não | Localização |
| Transfusões | Sim | Não | Número: <15 >15 |

MEDULA OSSEA

| | | |
|--------------------------------------------------------|-----|-----|
| Aplasia / hipoplasia MO | Sim | Não |
| Celularidade na biópsia de Medula óssea: _____% | | |
| Hiperplasia eritróide | Sim | Não |
| Displasia | Sim | Não |

Citogenética:**Testes de Ham-Sacarose (pos/neg)**

| HEMOGRAMA | Data: | IMUNOFENOTIPAGEM | | % clone HPN | | |
|------------------------------------|-------|----------------------------------------|--------------|-------------|----|-----|
| | | Data: | | I | II | III |
| Eritrócitos (x10 ⁶ /ul) | | Hemácias | CD55 | | | |
| VG (%) | | | CD59 | | | |
| Hb (g/dl) | | Plaquetas | CD55 | | | |
| VCM (fl) | | Neutrófilos | CD55 | | | |
| Leucócitos (/μl) | | | CD59 | | | |
| Neutrófilos % | | | CD16 | | | |
| Neutrófilos (abs) | | | CD24 | | | |
| Linfócitos (/μl) | | Monócitos | CD66b | | | |
| Plaquetas (/μl) | | | CD55 | | | |
| Reticulócitos %/abs | | | CD59 | | | |
| DHL | | | CD14 | | | |
| BT/BI | | _____ % maior clone em Neutrófilos [N] | | | | |
| EXAMES EVOLUÇÃO | | _____ % maior clone em Eritrócitos [E] | | | | |

| DATA | DATA | DATA | DATA |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| DHL | DHL | DHL | DHL |
| Reticulócitos | Reticulócitos | Reticulócitos | Reticulócitos |

TRATAMENTO

| | | | |
|-----------------|-----|-----|------|
| Imunossupressão | Sim | Não | Data |
| Corticóide | Sim | Não | Data |
| Ciclosporina | Sim | Não | Data |
| Eculizumab | Sim | Não | Data |
| TCTH | Sim | Não | Data |

ANEXO 2 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

| Variável | Total (n=103) | (Min-máx) | HPN subc (n=54) | HPN+SFM (n=39) | Clássica (n=10) | Valor de p* |
|----------------|---------------|-----------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| CLÍNICA | | | | | | |
| Hemólise | 49 (47,6%) | - | 0 (0) | 39 (100) | 10 (100) | <0,001 |
| Trombose | 17 (16,5%) | - | 2 (3,7) | 9 (23,1) | 6 (60) | <0,001 |
| Astenia | 98 (95,1%) | - | 51 (94,4) | 37 (94,9) | 10 (100) | --- |
| Infecção | 48 (46,6%) | - | 23 (42,6) | 25 (64,1) | 0 (0) | 0,001 |
| Sangramento | 68 (66%) | - | 34 (63) | 30 (76,9) | 4 (40) | 0,070 |
| Hemoglobinúria | 43 (41,7%) | - | 4 (7,4) | 30 (76,9) | 9 (90) | <0,001 |

* valor de p entre as três variáveis. Teste exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$.

ANEXO 3 – EXAMES LABORATORIAIS AO DIAGNÓSTICO

| | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p (1x2x3) | Valor de p | | | |
|----------------------|----------|-----|--------|---------|--------|--------|---------------|---------------------|------------------|----------------|-----------------|-------|
| | | | | | | | | | HPN+SFM x HPN Sc | HPN Sc x class | HPN+SFM x class | |
| Eritrócitos | HPN Sc | 53 | 2,59 | 2,47 | 0,96 | 4,40 | 0,62 | 0,261 ^a | | | | |
| | HPN+SFM | 39 | 2,82 | 2,87 | 1,28 | 4,35 | 0,76 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 2,75 | 2,83 | 1,31 | 3,44 | 0,70 | | | | | |
| | Geral | 102 | 2,7 | 2,6 | 0,960 | 4,4 | 0,69 | | | | | |
| Hb | HPN Sc | 54 | 8,38 | 8,05 | 3,80 | 13,20 | 1,78 | 0,062 ^a | | | | |
| | HPN+SFM | 39 | 9,42 | 9,40 | 4,50 | 14,50 | 2,43 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 9,02 | 8,95 | 5,10 | 11,70 | 2,10 | | | | | |
| | Geral | 103 | 8,8 | 8,8 | 3,800 | 14,5 | 2,12 | | | | | |
| VG | HPN Sc | 53 | 24,6 | 22,8 | 12,0 | 37,9 | 5,2 | 0,015 ^a | 0,007 | 0,076 | 0,912 | |
| | HPN+SFM | 39 | 28,2 | 27,7 | 14,5 | 42,9 | 7,4 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 28,4 | 28,4 | 17,2 | 36,2 | 6,0 | | | | | |
| | Geral | 102 | 26,3 | 26,4 | 12,000 | 42,9 | 6,40 | | | | | |
| VCM | HPN Sc | 52 | 95,8 | 97,5 | 12,8 | 125,0 | 15,1 | 0,062 ^a | | | | |
| | HPN+SFM | 38 | 101,4 | 99,7 | 84,4 | 139,0 | 12,5 | | | | | |
| | Clássica | 9 | 105,2 | 101,5 | 87,5 | 131,0 | 13,3 | | | | | |
| | Geral | 99 | 98,8 | 98,7 | 12,800 | 139,0 | 14,25 | | | | | |
| Leucócitos | HPN Sc | 54 | 2958 | 2675 | 1140 | 8800 | 1320 | 0,008 ^a | 0,050 | 0,005 | 0,106 | |
| | HPN+SFM | 39 | 3558 | 3110 | 1470 | 7780 | 1512 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 4390 | 4490 | 1600 | 6680 | 1746 | | | | | |
| | Geral | 103 | 3324 | 2970 | 1140 | 8800 | 1493 | | | | | |
| Neutrófilos | HPN Sc | 54 | 29,5 | 28,5 | 1,0 | 67,0 | 15,7 | 0,009 ^b | 0,266 | 0,002 | 0,017 | |
| | HPN+SFM | 39 | 33,9 | 31,0 | 4,0 | 77,0 | 18,5 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 51,8 | 60,5 | 10,0 | 75,0 | 23,1 | | | | | |
| | Geral | 103 | 33,3 | 31,0 | 1,000 | 77,0 | 18,56 | | | | | |
| NEUTRO ABS | HPN Sc | 54 | 928 | 825 | 26 | 4664 | 813 | 0,000 ^a | 20000 | 0,084 | 0,000 | 0,001 |
| | HPN+SFM | 39 | 1279 | 1064 | 59 | 4951 | 1017 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 2456 | 2724 | 160 | 3904 | 1397 | | | | | |
| | Geral | 103 | 1209,5 | 944,7 | 26,000 | 4951,1 | 1047,48 | | | | | |
| Plaquetas | HPN Sc | 54 | 23952 | 20000 | 2000 | 99000 | 19475 | 0,000 ^a | 0,041 | 0,000 | 0,000 | |
| | HPN+SFM | 39 | 39462 | 27000 | 3000 | 137000 | 31151 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 159000 | 181500 | 6000 | 294000 | 88359 | | | | | |
| | Geral | 103 | 42936 | 25000 | 2000 | 294000 | 52569 | | | | | |
| Reticulócitos | HPN Sc | 54 | 0,017 | 0,015 | 0,001 | 0,053 | 0,013 | 0,000 ^a | 0,019 | 0,000 | 0,000 | |
| | HPN+SFM | 39 | 0,031 | 0,023 | 0,001 | 0,116 | 0,028 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 0,099 | 0,084 | 0,023 | 0,227 | 0,065 | | | | | |
| | Geral | 103 | 0,0 | 0,0 | 0,001 | 0,2 | 0,04 | | | | | |
| RET ABS | HPN Sc | 53 | 42,0 | 35,4 | 2,4 | 153,2 | 32,8 | 0,000 ^a | 0,002 | 0,000 | 0,000 | |
| | HPN+SFM | 39 | 77,6 | 70,8 | 3,2 | 214,3 | 57,3 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 235 | 240 | 78 | 437 | 98 | | | | | |
| | Geral | 102 | 74,5 | 53,8 | 2,350 | 437,4 | 75,85 | | | | | |
| LDH | HPN Sc | 54 | 278 | 234 | 30 | 783 | 136 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,004 | |
| | HPN+SFM | 38 | 720 | 517 | 187 | 4550 | 765 | | | | | |
| | Clássica | 10 | 2336 | 1608 | 328 | 7690 | 2177 | | | | | |
| | Geral | 102 | 644,0 | 328,5 | 30,000 | 7690,0 | 1001,77 | | | | | |
| BT | HPN Sc | 54 | 0,88 | 0,70 | 0,17 | 4,93 | 0,72 | 0,000 ^a | 0,039 | 0,000 | 0,000 | |
| | HPN+SFM | 39 | 1,30 | 1,06 | 0,39 | 3,32 | 0,73 | | | | | |
| | Clássica | 9 | 3,46 | 2,54 | 0,39 | 7,06 | 2,34 | | | | | |
| | Geral | 102 | 1,3 | 0,9 | 0,170 | 7,1 | 1,19 | | | | | |

(a) ANOVA com um fator, p<0,05

(b) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05

ANEXO 4 – CLONE HPN AVALIADO POR MARCADOR DE CITOMERIA DE FLUXO

| Variável | Grupo | n | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p (1x2x3) | Valor de p | | |
|-------------------|----------|-----|-------|---------|--------|--------|---------------|---------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| | | | | | | | | | HPN+SFM x HPN Sc | HPN Sc x classica | HPN+SFM x classica |
| HEMACIAS CD55 | HPN Sc | 53 | 2,13 | 0,00 | 0,00 | 18,00 | 4,27 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,026 |
| | HPN+SFM | 38 | 26,7 | 14,6 | 0,0 | 100,0 | 33,1 | | | | |
| | Clássica | 8 | 72,4 | 89,7 | 0,0 | 100,0 | 36,0 | | | | |
| | Geral | 99 | 17,2 | 1,0 | 0,000 | 100,0 | 30,37 | | | | |
| HEMACIAS CD59 | HPN Sc | 52 | 7,27 | 0,75 | 0,00 | 100,0 | 20,54 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,080 |
| | HPN+SFM | 38 | 30,4 | 10,2 | 0,0 | 100,0 | 31,0 | | | | |
| | Clássica | 9 | 69,5 | 84,9 | 0,0 | 100,0 | 36,6 | | | | |
| | Geral | 99 | 21,8 | 4,0 | 0,000 | 100,0 | 32,28 | | | | |
| PLAQUETAS CD55 | HPN Sc | 51 | 10,6 | 0,6 | 0,0 | 95,3 | 17,6 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,282 |
| | HPN+SFM | 38 | 53,0 | 52,8 | 0,0 | 100,0 | 34,4 | | | | |
| | Clássica | 9 | 71,6 | 92,2 | 0,0 | 100,0 | 35,6 | | | | |
| | Geral | 98 | 32,7 | 20,9 | 0,000 | 100,0 | 35,71 | | | | |
| NEUTRÓFILOS CD55 | HPN Sc | 54 | 14,3 | 6,4 | 0,0 | 68,7 | 17,2 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,002 |
| | HPN+SFM | 39 | 56,7 | 56,0 | 1,7 | 100,0 | 32,7 | | | | |
| | Clássica | 10 | 93,0 | 96,1 | 79,0 | 100,0 | 7,1 | | | | |
| | Geral | 103 | 38,0 | 24,3 | 0,000 | 100,0 | 35,83 | | | | |
| NEUTRÓFILOS CD59 | HPN Sc | 35 | 19,4 | 10,7 | 0,0 | 100,0 | 22,8 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,077 |
| | HPN+SFM | 32 | 54,2 | 53,0 | 0,0 | 98,9 | 34,5 | | | | |
| | Clássica | 7 | 83,0 | 98,4 | 0,0 | 100,0 | 37,0 | | | | |
| | Geral | 74 | 40,5 | 30,4 | 0,000 | 100,0 | 36,49 | | | | |
| NEUTRÓFILOS CD66b | HPN Sc | 48 | 15,4 | 7,1 | 0,2 | 68,7 | 18,3 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,011 |
| | HPN+SFM | 34 | 60,3 | 64,8 | 1,7 | 100,0 | 32,2 | | | | |
| | Clássica | 7 | 95,6 | 97,8 | 86,3 | 99,9 | 5,1 | | | | |
| | Geral | 89 | 38,8 | 27,0 | 0,170 | 100,0 | 36,07 | | | | |
| NEUTRÓFILOS CD24 | HPN Sc | 51 | 16,3 | 7,4 | 0,0 | 67,8 | 19,5 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,003 |
| | HPN+SFM | 37 | 59,8 | 63,0 | 1,9 | 100,0 | 32,7 | | | | |
| | Clássica | 10 | 94,9 | 97,9 | 81,3 | 100,0 | 6,5 | | | | |
| | Geral | 98 | 40,7 | 27,8 | 0,000 | 100,0 | 36,78 | | | | |
| NEUTRÓFILOS CD16 | HPN Sc | 53 | 16,2 | 8,6 | 0,0 | 69,4 | 18,3 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,008 |
| | HPN+SFM | 38 | 62,0 | 71,9 | 1,6 | 100,0 | 33,4 | | | | |
| | Clássica | 9 | 94,7 | 97,9 | 81,8 | 99,9 | 6,4 | | | | |
| | Geral | 100 | 40,7 | 27,7 | 0,000 | 100,0 | 36,82 | | | | |
| MONÓCITOS CD55 | HPN Sc | 54 | 17,7 | 9,7 | 0,0 | 65,7 | 19,0 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,000 | 0,005 |
| | HPN+SFM | 38 | 57,7 | 65,4 | 0,0 | 100,0 | 32,7 | | | | |
| | Clássica | 9 | 88,3 | 86,3 | 80,2 | 97,3 | 7,2 | | | | |
| | Geral | 101 | 39,0 | 30,0 | 0,000 | 100,0 | 34,43 | | | | |
| MONÓCITOS CD59 | HPN Sc | 24 | 21,7 | 13,7 | 0,0 | 100,0 | 27,6 | <0,001 ^b | 0,006 | 0,000 | 0,006 |
| | HPN+SFM | 23 | 50,7 | 58,0 | 0,0 | 95,4 | 35,8 | | | | |
| | Clássica | 5 | 92,7 | 95,5 | 83,1 | 100,0 | 6,9 | | | | |
| | Geral | 52 | 41,3 | 33,7 | 0,000 | 100,0 | 37,16 | | | | |
| MONÓCITOS CD14 | HPN Sc | 47 | 21,9 | 19,0 | 0,0 | 96,8 | 22,6 | <0,001 ^b | 0,000 | 0,005 | 0,000 |
| | HPN+SFM | 39 | 67,1 | 78,9 | 0,0 | 100,0 | 32,1 | | | | |
| | Clássica | 10 | 95,5 | 97,7 | 84,0 | 100,0 | 5,4 | | | | |
| | Geral | 96 | 47,9 | 44,4 | 0,000 | 100,0 | 37,21 | | | | |

(a) ANOVA com um fator, p<0,05

(b) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05

ANEXO 5 – HISTOGRAMAS DE FREQUENCIA DE CLONE HPN EM ERITRÓCITOS E GRANULÓCITOS NEUTRÓFILOS NOS DIFERENTES GRUPOS

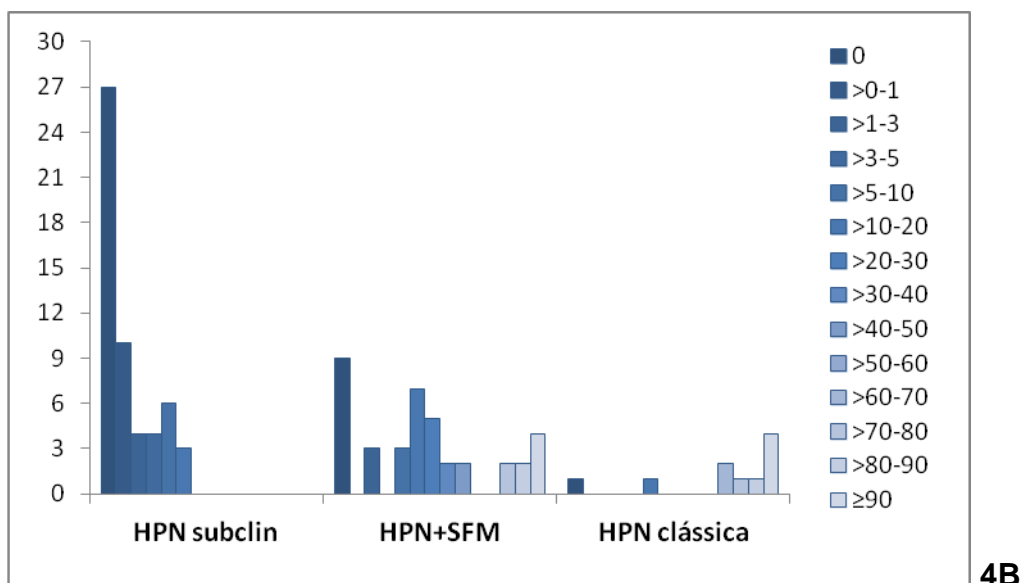
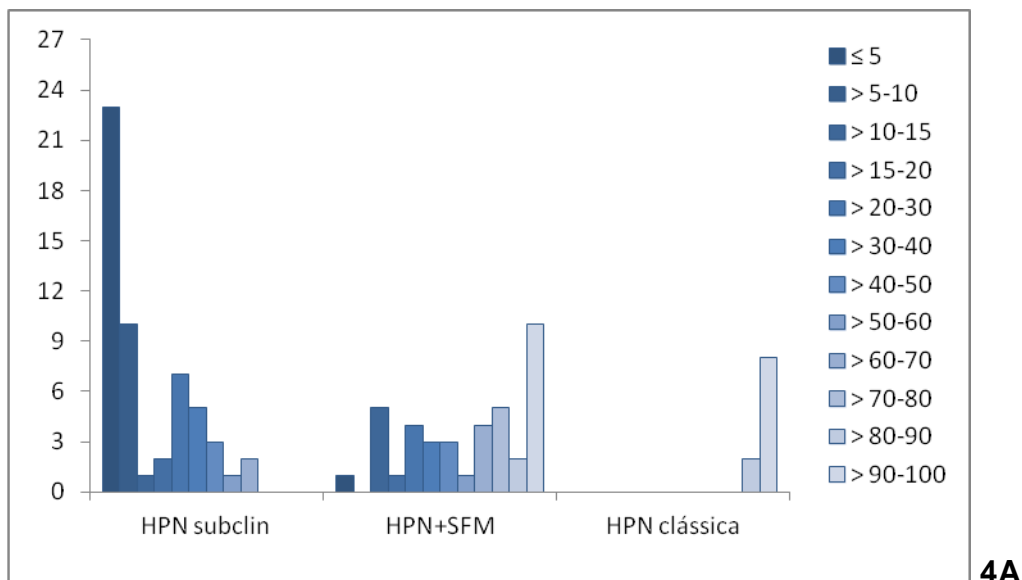


FIGURA 4: HISTOGRAMAS MOSTRANDO A PERCENTAGEM DE CLONE HPN EM GRANULÓCITOS (7A) E ERITRÓCITOS (7B), PREDOMÍNIO DE PERCENTAGENS BAIXAS (<10%) NA HPN SUBCLÍNICA, PERCENTAGENS VARIÁVEIS NO GRUPO HPN+SFM, E PERCENTAGENS ALTAS (>60%) NO GRUPO HPN CLÁSSICA.