

Diagnóstico e monitoramento por imunofenotipagem da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e correlação com a eficácia do tratamento com eculizumab

Diagnostics and immunophenotyping monitoring of night paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and correlation with the efficacy of eculizumab treatment

Diagnóstico y monitoreo inmunofenótico de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y correlación con la eficacia del tratamiento eculizumab

Alexsander Augusto da Silveira^{1*}, Fernanda Reis de Menezes Silva^{1,2}, Eliete Pedroso Pereira¹, Fernanda da Cunha Severo Souza¹, Adeliane Castro da Costa¹, Álvaro Paulo Silva Souza¹, Adibe Georges Khouri¹, Yuri Vasconcelos Pinheiro², Valéria Bernadete Leite Quixabeira².

RESUMO

Objetivo: Ressaltar o monitoramento da HPN por imunofenotipagem por citometria de fluxo (CMF) e avaliar a eficácia do tratamento com o anticorpo monoclonal eculizumab. **Métodos:** O trabalho é uma análise retrospectiva de dados de prontuários dos pacientes encaminhados a um Instituto de referência em doenças hematológicas no Estado de Goiás para diagnóstico e monitoramento da HPN no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2017. **Resultados:** Dos 31 pacientes diagnosticados com HPN, 5 foram selecionados devido a sequência de dados nos prontuários. Os pacientes selecionados foram monitorados frente a expressão de marcadores de regulação para o sistema complemento (SC) em tratamento com o eculizumab, com um aumento do número relativa ou estabilização para os marcadores de superfície de eritrócitos (CD55 e CD59), monócitos e granulócitos (FLAER). O eculizumab reduziu o quadro hemolítico, melhorando os sintomas e estabilizando os resultados dos testes de hemólise. **Conclusão:** A imunofenotipagem por CMF é padrão ouro na investigação de HPN por avaliar a expressão de proteínas ancoradas pela Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI) com alta sensibilidade e especificidade. Este estudo é o primeiro a demonstrar a eficácia do eculizumab, comprovando a estabilidade da doença.

Palavras-chave: Hemoglobinúria Paroxística Noturna, Citometria de Fluxo, Anticorpo Monoclonal Eculizumab.

ABSTRACT

Objective: To emphasize the monitoring of PNH by flow cytometry immunophenotyping (CMF) and to evaluate the effectiveness of treatment with the eculizumab monoclonal antibody. **Methods:** The study is a retrospective analysis of patient records data sent to a reference institute for hematological diseases in the state of Goiás for diagnosis and monitoring of PNH from January 2010 to December 2017. **Results:** Of the 31 patients diagnosed with PNH, 5 were selected due to data sequence in the medical records. The selected patients were monitored for expression of complement system (SC) regulatory markers under treatment with eculizumab, with an increase in relative number or stabilization for erythrocyte (CD55 and CD59), monocyte and granulocyte surface markers (FLAER). Eculizumab reduced hemolytic status, improving symptoms and stabilizing hemolysis test results. **Conclusion:** CMF immunophenotyping is the gold standard in the

¹Faculdade Estácio de Sá de Goiás, Goiânia-Go. *E-mail: alekfarm2000@yahoo.com.br

²Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia-INGOH, Goiânia-Go.

investigation of PNH for evaluating the expression of proteins anchored by Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) with high sensitivity and specificity. This study is the first to demonstrate the effectiveness of eculizumab by proving the stability of the disease.

Keywords: Paroxysmal Night Hemoglobinuria, Flow Cytometry, Monoclonal Antibody Eculizumab.

RESUMEN

Objetivo: enfatizar el monitoreo de la HPN mediante inmunofenotipaje de citometría de flujo (CMF) y evaluar la efectividad del tratamiento con el anticuerpo monoclonal eculizumab. **Métodos:** El estudio es un análisis retrospectivo de datos de registros de pacientes enviados a un instituto de referencia para enfermedades hematológicas en el estado de Goiás para el diagnóstico y monitoreo de la HPN desde enero de 2010 hasta diciembre de 2017. **Resultados:** de los 31 pacientes diagnosticados con PNH, se seleccionaron 5 debido a la secuencia de datos en los registros médicos. Los pacientes seleccionados fueron monitorizados para determinar la expresión de marcadores reguladores del sistema del complemento (SC) bajo tratamiento con eculizumab, con un aumento en el número relativo o estabilización de los marcadores de superficie de eritrocitos (CD55 y CD59), monocitos y granulocitos (FLAER). Eculizumab redujo el estado hemolítico, mejoró los síntomas y estabilizó los resultados de las pruebas de hemólisis. **Conclusión:** el inmunofenotipo CMF es el estándar de oro en la investigación de la PNH para evaluar la expresión de proteínas ancladas por el glicosilfosfatidil inositol (GPI) con alta sensibilidad y especificidad. Este estudio es el primero en demostrar la efectividad de eculizumab al demostrar la estabilidad de la enfermedad.

Palabras-clave: Hemoglobinuria paroxística nocturna, citometría de flujo, anticuerpo monoclonal Eculizumab.

INTRODUÇÃO

O sistema complemento (SC) é um conjunto de proteínas solúveis, integrado ao sistema imunológico humano, com a formação de um complexo para o ataque de membranas bicamada fosfolipídicas (MAC) de patógenos, no qual existe uma série de proteínas reguladoras que impedem a formação do MAC as próprias membranas das células constituintes do organismo humano. A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença rara adquirida, que resulta de uma alteração genética do tipo clonal, devido a uma mutação somática do gene fosfatidilinositol glicano classe A (*PIG-A*), o qual se localiza no cromossomo X de uma célula pluripotente. O gene *PIG-A* é responsável pela codificação de uma enzima crítica na formação da proteína âncora glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), a qual realiza a fixação de múltiplas proteínas na membrana citoplasmática. A deficiência de GPI conduz a uma carência de proteínas reguladoras do SC ligada à superfície dos eritrócitos, tornando-os susceptíveis a hemólise intravascular mediada pelo sistema complemento (ARAUJO CJ, et al., 2002; PARKER C, et al., 2005; ALENCAR RCB et al., 2016).

O SC pode ser ativado por três vias, a via clássica com a participação dos anticorpos IgG e IgM agrupados pelo componente C1, a via das lectinas com o reconhecimento de açúcares e manose de microrganismos e consequente ativação da proteína ligadora de manose (MBL) e das moléculas serino proteases 1 e 2 associadas ao MBL (MASP-1 e MASP-2) e a via alternativa com a hidrólise espontânea do componente C3 em membranas dos patógenos. Todas as vias do SC levam a via terminal comum com a formação do complexo de ataque e despolimerização das membranas (MAC). As células com clone HPN são vulneráveis à ativação da cascata em qualquer uma das vias. A hemólise acontece pela redução ou ausência completa das proteínas regulatórias na superfície celular das células eritrocíticas, dentre elas estão o CD55 (DAF- *Decay Accelerating Factor*) e CD59 (MIRL-*Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*) que controlam a ativação da cascata do SC para não haver o ataque às membranas celulares. Na anamnese e exame físico observam-se os sinais e sintomas de hemólise intravascular como hemoglobinúria, icterícia, urina escura, anemia com sinais de fadiga, disfunção da musculatura lisa, letargia, dor abdominal, impotência, trombozes prévias e cefaleia crônica (DACIE JV e LEWIS SM 1972; PARKER C, et al., 2005, RICHARDS SJ, et al., 2007, ARRUDA MMAS, et al., 2010; MALVEZZI M, et al., 2013; DAL MS et al., 2016).

O diagnóstico da HPN pode estar relacionado a outras doenças como falência medular, síndrome mielodisplásica (SMD) e anemia aplásica (AA). Geralmente é conduzido por testes laboratoriais que detectam as proteínas de membrana ligadas a GPI ou que demonstrem a presença de eritrócitos sensíveis à ação hemolítica do SC. Existem ainda exames básicos que auxiliam no diagnóstico da HPN, pois os mesmos avaliam a hemólise intravascular, como a desidrogenase láctica (DHL), bilirrubinas, haptoglobina, coombs direto e ainda hemograma completo e contagem de reticulócitos. Porém a imunofenotipagem por citometria de fluxo é considerado padrão ouro para diagnóstico, a qual permite identificar as populações de células deficientes da proteína âncora GPI, bem como determinar a porcentagem de populações discretas de células anormais e o grau de deficiência, que são informações úteis para o manejo da doença (PASQUINI R, 2001; MOROMIZATO DT, et al., 2003; ROSSE WF, et al., 2004; PARKER C, et al., 2005).

As indicações clínicas mais relevantes para se estudar a presença de HPN por citometria de fluxo são hemoglobinúria; hemólise intravascular com coombs negativo, especialmente se associada à deficiência de ferro; trombose em sítios não usuais como veias hepáticas (Síndrome de Budd-Chiari caracterizada pela interrupção ou redução do fluxo normal de sangue para fora do fígado), mesentéricas, cerebrais ou dérmicas ou por tromboses inexplicadas; anemia aplásica; síndrome mielodisplásica tipo anemia refratária ou síndrome mielodisplásica hipoplásica; citopenias inexplicadas; disfagia ou dor abdominal com evidência de hemólise intravascular (PARKER C, et al., 2005).

O medicamento indicado para o tratamento da HPN é o eculizumab, um anticorpo monoclonal humanizado, o qual bloqueia a ativação do complemento terminal no nível complemento C5 e previne a formação de C5a e o complexo MAC, corrigindo a deficiência da proteína CD59. Porém, eculizumab não corrige a falta de CD55, proteína importante na promoção da fagocitose dos eritrócitos por macrófagos, ocasionando assim a opsonização do C3, que leva a uma hemólise extra vascular, positivando o teste Coombs direto numa porcentagem superior a 50% dos doentes. O eculizumab foi o primeiro fármaco bioativo que comprovou a eficácia no tratamento de pacientes com HPN (BRODSKY RA, 2008; RISITANO AM, et al., 2009; HOCHSMANN B, et al. 2012).

O objetivo desse estudo é elencar o diagnóstico e monitoramento da HPN por imunofenotipagem por citometria de fluxo (CMF), avaliando a especificidade/sensibilidade da técnica na detecção do clone HPN, quanto ao seu tamanho e classificação. Além disso, realizar uma correlação com a eficácia do tratamento com eculizumab, verificando como esse anticorpo monoclonal humano traz resultados satisfatórios aos portadores da doença. O estudo se justifica pela raridade da doença, o que torna o acesso ao diagnóstico difícil, além de existir poucas alternativas de tratamento e a necessidade de um maior aprofundamento no conhecimento do curso natural da história da doença.

MÉTODOS

Este estudo trata-se de uma análise retrospectiva de dados, por meio do qual foram avaliados os prontuários dos pacientes encaminhados a um Instituto de referência em doenças hematológicas no Estado de Goiás para diagnóstico e monitoramento da HPN. A avaliação foi realizada no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2017. O critério de inclusão direcionado para investigação foram os relatos clínicos dos sintomas como anemia hemolítica, hemoglobinúria, hemossiderinúria, anemia aplásica, síndrome mielodisplásica, aplasia de medula óssea e trombose inexplicada.

O estudo foi aprovado pela diretoria da instituição por carta de anuência e foi aprovado pelo Comitê Ético de Pesquisa (CEP) número 3.170.850. Dos pacientes avaliados no período citado, foram selecionados cinco para acompanhar o monitoramento do tratamento com eculizumab. O critério de escolha utilizado foi o número de exames nos prontuários desses pacientes que servem de parâmetro para tal avaliação. Os resultados foram obtidos correlacionando os dados de idade, gênero, indicação clínica, resultados de exames laboratoriais de controle e monitoramento do clone.

Para obtenção dos resultados da citometria de fluxo foi utilizada a marcação com anticorpos monoclonais, utilizando o citômetro de fluxo *FACSCalibur*® (BD Biosciences), San Jose, EUA, para aquisição das amostras por meio do programa *CellQuest Pro* (BD Biosciences). Foi realizada a aquisição de 50.000

eventos em região de neutrófilos, monócitos e hemácias em escala logarítmica pelo programa *CellQuest Pro*, foi realizada a análise multiparamétrica. O controle de qualidade foi realizado a calibração diária utilizando o reagente *CalIBRITE™* BD, e a estabilidade dos fluorocromos se deu de acordo com as normas do fabricante.

Para a marcação dos monócitos e granulócitos, foi pipetado 100µL da amostra por tubo, sendo marcado conforme o painel citado na **Tabela 1**. Os tubos foram incubados no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, foi realizada a lise das hemácias por meio da adição de *FACS-Lysing*, por um período de incubação de 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por dois minutos e lavados com suspensão tamponada de fosfato (PBS), sendo repetido e por fim o sedimento (*pellet*) foi ressuspenso com 500 µL de PBS. As hemácias foram marcadas sem a lise celular, utilizando apenas 5 µL da amostra marcada com CD55 e CD59, e incubada por 15 minutos, depois ressuspenso com 500 µL de PBS. A seguir foi realizada a aquisição utilizando o citômetro de fluxo *FACSCalibur®* (BD Biosciences), e análise foi procedida por meio da verificação da distribuição pontual de tamanho (FSC) x granulocidade (SSC) e pelas particularidades do imunofenótipo (CD45 para granulócitos e monócitos e SSC X FSC para hemácias). Após seleção e delimitação na população celular de interesse, foi observada a expressão, ausência ou deficiência das moléculas ancoradas ao GPI (CD24, CD64, CD14, CD16, CD33 CD55 e CD59) e marcando somente granulócitos e monócitos com FLAER, assim foram obtidos gráficos de pontos (*dotplot*). O painel de anticorpos monoclonais utilizado foi preparado com três tubos, realizando a pesquisa de granulócitos, monócitos e hemácias (**Tabela 1**).

Para as análises estatísticas, construção das tabelas e gráficos foi utilizado o programa de bioinformática *Graphpad Prism* versão 6.0, com aplicação do teste *Mann Whitney*, no qual considera significante *p* menor que 0,05.

Tabela 1 - Marcação com anticorpos monoclonais para Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI).

Miradores	Fluorocromo	População Hematopoiética
CD24	PE	G
CD64	FITC	M
CD45	PCy5	G, M
CD14	PE	M
CD16	FITC	G
CD33	APC	G, M
CD55	PE	G, M, E
CD59	FITC	G, M, E
FLAER	FITC	G, M
CD45	PCy5	G, M
CD66	PE	G, M

Legenda: Abreviações: G – Granulócitos; M – Monócitos; E – Eritrócitos; FITC – Isotiocianato de Fluoresceína; PE – Ficoeritrina; PCy5 – Ficocianina 5; APC – Alociocianina; PerCP – Peridinin Chlorophyl Protein.

Fonte: Silveira AA, et al., 2019

RESULTADOS

Durante o período da coleta de dados foram encaminhados 1.369 pacientes para diagnóstico, dos quais 31 foram confirmados com HPN. Desses indivíduos, 19 eram do sexo masculino e 12 do sexo feminino. Os pacientes apresentaram uma faixa etária entre 4 e 72 anos, sendo que houve uma maior incidência entre os 25 e 46 anos (17 casos positivos), 4 e 22 anos (8 casos positivos) e 53 e 72 anos (6 casos positivos). Dos 31 pacientes diagnosticados com HPN, 5 pacientes foram selecionados devido ao período monitorado pela diagnóstico de imunofenotipagem e a maior quantidade de resultados contidas em seus prontuários, o que permitiu uma análise mais detalhada dos parâmetros disponibilizados. A **Tabela 2** apresenta dos dados sócio demográficos dos 5 pacientes com clones definidos para HPN. Complementares ao exame de imunofenotipagem são realizados os testes de hemólise como a dosagem de haptoglobina,

contagem de reticulócitos, bilirrubina indireta, hemoglobina, hematócrito e desidrogenase láctica (LDH). A **Figura 1** apresenta os exames de hemólise desde o início do tratamento com o anticorpo monoclonal comparado com o último exame realizado pelos pacientes.

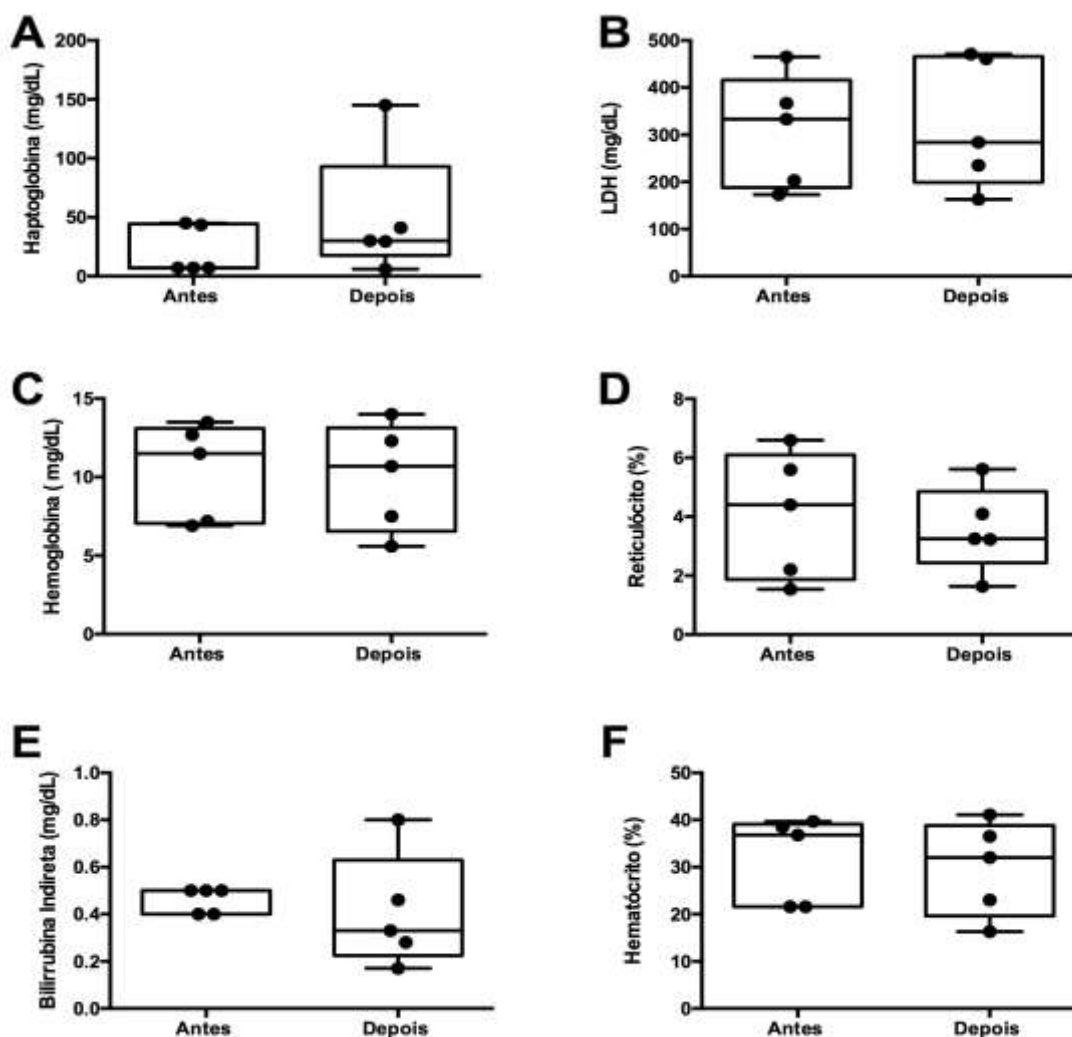
Tabela 2 - Dados sócio - demográficos dos 5 pacientes com clones definidos para HPN.

Paciente	Gênero	Início do Tratamento/ Eculizumab	Período Monitorado/ Imunofenotipagem	Sintomas Clínicos/ Período Avaliado
1	Feminino	4 anos	2011 a 2017	NC
2	Feminino	40 anos	2010 a 2016	Anemia Hemolítica
3	Masculino	25 anos	2015 a 2017	Anemia Aplásica
4	Masculino	38 anos	2013 a 2017	Anemia Hemolítica
5	Masculino	27 anos	2013 a 2016	Aplasia Medular/ Anemia Hemolítica

Legenda: NC= dados não informados.

Fonte: Silveira AA, et al., 2019.

Figura 1 - Parâmetros de hemólise avaliados durante o tratamento com Eculizumab dos 5 pacientes com clones HPN definidos.



Fonte: Silveira AA, et al., 2019.

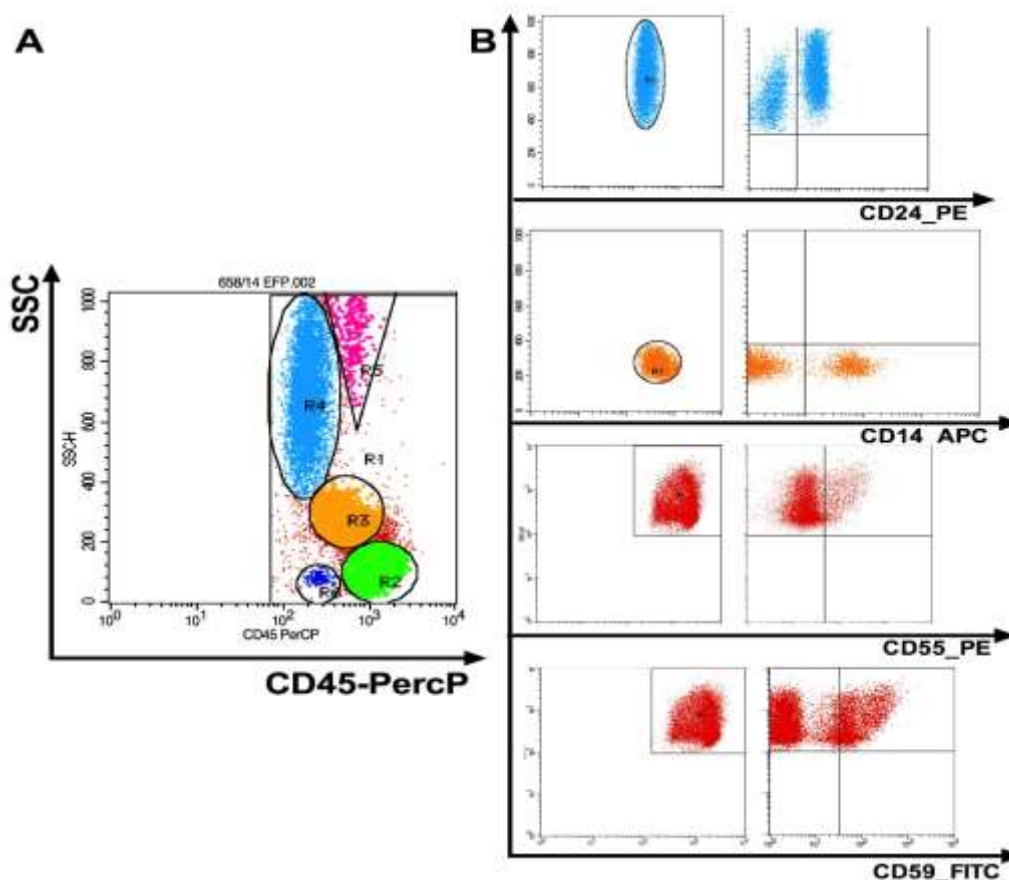
Em relação ao monitoramento pela imunofenotipagem desde o início do tratamento com o eculizumab, as populações de G, M e foram monitoradas frente as expressões das moléculas reguladoras do SC, CD55, CD59 e FLAER. A **Figura 1** demonstra a definição do clone HPN do paciente 1 monitorado pela técnica de CMF, nas populações de G, M e.

Em relação ao paciente 1 houve uma melhora significativa nos primeiros anos do tratamento com um aumento do número relativo para os marcadores dos E (CD55 e CD59) de 22,7% para 71,7%. Nos anos subsequentes os valores se estabilizaram entre 63% a 73%, respectivamente. No paciente 2 os valores de expressão para CD55 apresentaram se ausentes, com um discreto aumento dos valores de CD59 para 25%.

No paciente 3 a variação média do número relativo para o marcador CD59, que foi de 0,5% no primeiro ano de tratamento para 5,2%, mantendo se constante nos anos subsequentes. Em relação ao paciente 4, os níveis de expressão das moléculas CD55 e CD59 nos primeiros anos de tratamentos chega a próximo de 80%, com um decaimento destes valores para 20% no último ano avaliado. No paciente 5 a variação média do número relativo de marcadores reguladores de E nos primeiros anos a variação foi mais significativa, no qual saltou de 12,6% para 73,1%, em seguida esse valor manteve-se entre 33% e 36% para CD55 e CD59, respectivamente.

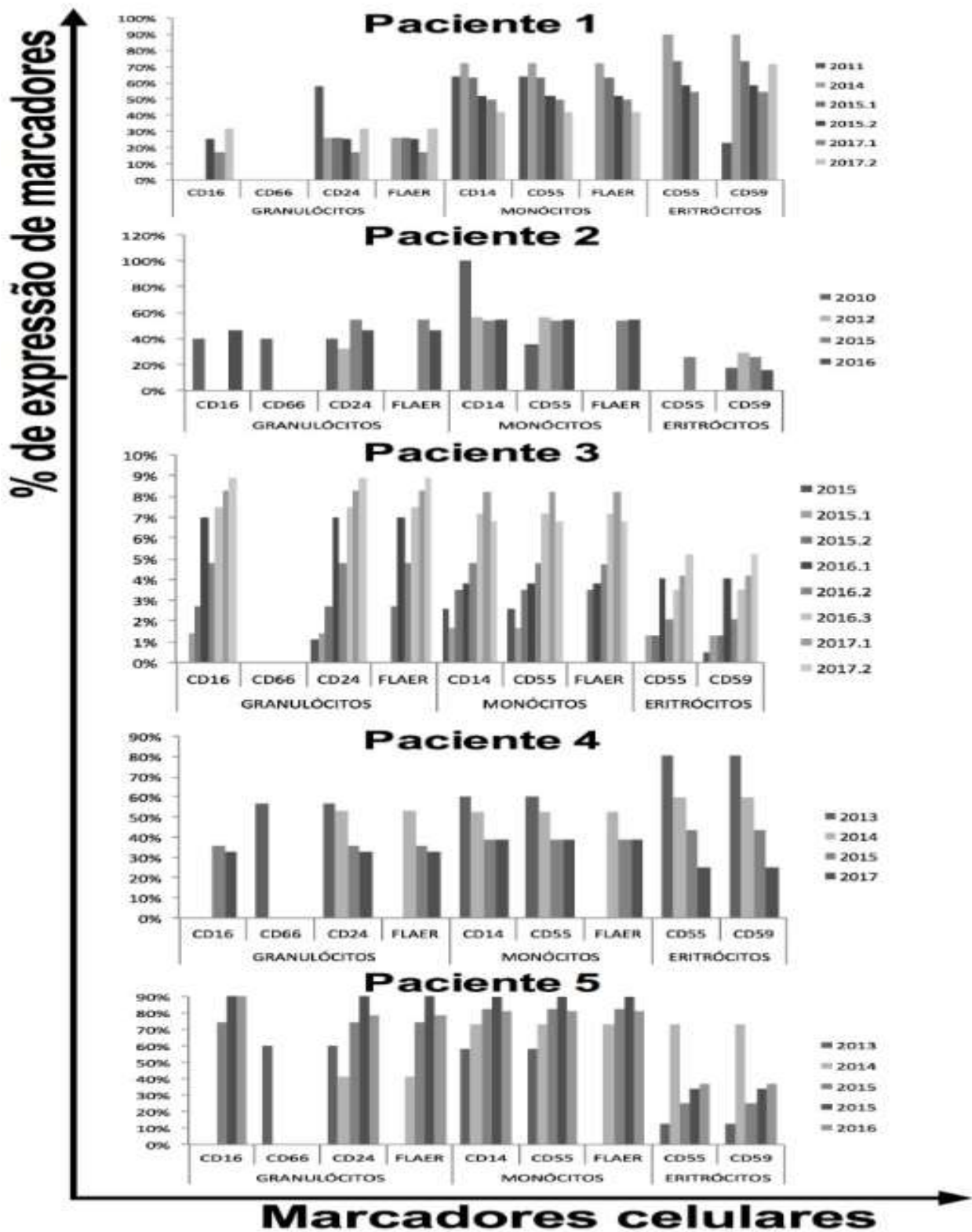
Em relação ao marcador de regulação do SC FLAER expresso nos G e M, as porcentagens relativas aumentaram (pacientes 3 e 5) ou mantiveram se nos pacientes (pacientes 1, 2 e 4). A **Figura 3** apresenta um painel de expressão dos marcadores para as populações avaliadas nos 5 pacientes.

Figura 2 - Análise pela técnica de imunofenotipagem para definição do clone HPN para os marcadores CD55 e CD59 de regulação do SC no paciente 1.



Legenda: A) Marcações celulares para as populações distintas na coleta de sangue, delimitação com CD45– PercP para as populações de granulócitos (G), monócitos (M). B) Avaliação da expressão dos marcadores nas populações de G (CD45-PercP, CD24-FITC), M (CD45-PercP, CD24) e eritrócitos (CD55-PE, CD59-FITC). FITC – Isotiocianato de Fluoresceína; PE – Ficoeritrina; PCy5 – Ficocianina 5; APC – Alociocianina; PerCP – Peridinin Chlorophyl Protein. **Fonte:** Silveira AA, et al., 2019.

Figura 3 - Acompanhamento da expressão de marcadores para granulócitos, monócitos e eritrócitos para avaliação de clone HPN em pacientes com tratamento com o anticorpo monoclonal eculizumab entre os anos de 2011 a 2017.



Legenda: Expressão dos marcadores nas populações de granulócitos (CD16-FITC, CD24-PE, CD66-PE, FLAER-FITC), monócitos (CD14-PE, CD55-PE, FLAER-FITC) e eritrócitos (CD55-PE, CD59-FITC). FITC – Isotiocianato de Fluoresceína; PE – Ficoeritrina; PCy5 – Ficocianina 5; APC – Alofocianina; PerCP – Peridinin Clorophyl Protein. **Fonte:** Silveira AA, et. al., 2019.

DISCUSSÃO

A HPN é uma desordem clonal rara das células constituintes do sistema hematopoiético. O defeito molecular na HPN decorre de uma mutação no gene *PIG-A* que codifica a glicoproteína de membrana fosfatidilinositol glicano que permite a sustentação e o recrutamento de outras proteínas de superfície membranar. A deficiência desta glicoproteína, prejudica a estruturação das proteínas reguladoras do SC, CD55, CD59 e FLAER, nas membranas das células humanas, o que protegeria e desativaria a formação do MAC nas próprias membranas (BOROWITZ MJ, et al. 2010).

A doença pode ser classificada em HPN clássica ou tipo I, que apresenta sinais de hemólise, mas sem outras alterações de medula óssea e reage com o complemento de forma normal; a HPN associada com algumas alterações de medula óssea ou tipo II, sendo anemia aplásica, síndrome mielodisplásica ou mielofibrose, possui leve sensibilidade a lise do SC, deficiência parcial de GPI e a HPN subclínica ou tipo III sem evidências de hemólise, mais suscetível à lise pelo SC, com deficiência total de GPI. Pacientes com síndrome mielodisplásica podem apresentar anormalidades na expressão o que dificulta a detecção do clone HPN no diagnóstico pela imunofenotipagem (PARKER C, et al. 2005; RICHARD'S SJ, et al., 2007; WANG AS, et al., 2009; BOROWITZ MJ, et al. 2010; URBANO-ISPIZUA A, et al., 2011). Esse seria um fator que explicaria as baixas porcentagens de expressões de C55 e CD59 observadas nos pacientes (Tabela 2 e Figura 3).

Na anemia aplásica, o clone HPN é mais bem detectado pela imunofenotipagem de G e M, pois os pacientes são constantemente submetidos a regimes transfusionais. Foi observado que os E com clone do tipo III são extremamente susceptíveis à lise pelo SC, sendo assim seu tempo de vida circulante fica muito diminuído. Com o uso do eculizumab, que exerce um efeito protetor sobre os eritrócitos evitando sua lise, ao prevenir a clivagem de C5, necessária para a formação do MAC, além do aumento do tempo de vida dos eritrócitos na HPN, com o aumentando do número dos mesmos de maneira absoluta e relativa. A intensidade das manifestações clínicas está ligada de acordo com a quantidade de células HPN III. Essa característica já descrita por Hillmen P, et al. (2004), foram observadas com uma maior evidência nos pacientes 1,3 e 5.

O diagnóstico e o monitoramento da HPN têm melhorado consideravelmente pela técnica citometria de fluxo baseado em um amplo painel de marcação por anticorpos monoclonais para a proteínas reguladoras do SC nas membranas celulares. A técnica é o padrão ouro em diagnóstico para determinadas doenças, com uma alta sensibilidade e precisão, o que permite a detecção de pequenas populações de células com o fenótipo HPN. Além disso, a técnica possibilita diferenciar células normais de células deficientes em GPI (MADKAIKAR M, et al., 2009; CORREIA RP, et al., 2016).

Estudos têm demonstrado o emprego de imunofenotipagem por CMF é a técnica mais indicada e mais específica na investigação de HPN por ser apta a avaliar a expressão de proteínas ancoradas pela GPI com alta sensibilidade e especificidade (HALL SE e ROSSE WF, 1996; MADKAIKAR M, et al., 2009; TEVA A, et al., 2009; O'DONNELI EA, et al. 2013). Estudo retrospectivo envolveu 745 pacientes com hipótese diagnóstica para HPN por citometria de fluxo em uma análise comparativa de diferentes protocolos e respectivos custos, a pesquisa em questão ressalta o melhoramento da técnica na definição do clone para HPN. O estudo também ressalta o emprego do FLAER na definição de pequenos clones (CORREIA RP, et al., 2016). Nossos resultados diagnósticos demonstram estar de acordo, com uma correta definição dos clones determinados nas populações de granulócitos, monócitos e eritrócitos, incluindo a distinção pelos anticorpos monoclonais para o FLAER na identificação do clone HPN nas populações de G e M.

O anticorpo monoclonal humanizado anti – C5, eculizumab, foi o primeiro inibidor do SC com eficácia na inibição da formação da cascata terminal MAC para o tratamento de anemias hemolíticas mediadas pelo ativação da cascata do SC. O fármaco bioativo mostra se eficaz na redução dos episódios hemolíticos, aumentando os níveis de hemoglobina e diminuindo a ocorrência de eventos tromboembólicos, associado a melhora clínica, na qualidade de vida e sobrevida prolongada dos pacientes. O tratamento tem o objetivo parar o ataque as próprias células, o que estabiliza e para a progressão dos sintomas na HPN com uma diminuição da hemólise e aumento de sobrevida dessas hemácias. É um fármaco novo empregado em protocolos recentes para o tratamento de anemias hemolíticas, cujo o tratamento depende do correto diagnóstico pela identificação dos clones de HPN pela imunofenotipagem, o que também justifica os poucos

estudos relacionados ao tratamento com o eculizumab (HILL A, et al., 2005; KELLY RJ, et al., 2011; BERESTEN S, et al., 2019; MASTELLOS DC, et al., 2018; MASTELLOS DC, et al., 2019).

Desta forma, o presente estudo demonstra a definição do clone para HPN e o monitoramento dos pacientes frente ao tratamento com o eculizumab, com contribuição para literatura científica, principalmente para a saúde pública no Brasil no qual apresenta uma dificuldade de acesso ao diagnóstico do HPN, uma vez que envolve uma técnica extremamente laboriosa e onerosa, e muitos pacientes se quer apresentam um diagnóstico correto para a HPN ou tem acesso ao diagnóstico, associado ao alto custo do anticorpo monoclonal e a disponibilização do mesmo pelo sistema público de saúde.

Na avaliação de exames relacionados à hemólise foi observado que o uso do eculizumab mantém os valores numa variável pequena na maioria dos casos, com uma melhora dos parâmetros para hemólise (**Figura 2**). Quando a hemoglobina do paciente está baixa, mesmo com uso do medicamento, será solicitada a transfusão para normalizar o número de eritrócitos e manter o paciente sem os incômodos gerados pela anemia. Dmytrijuk A, et al (2008), demonstra que há uma estabilização nos valores da LDH, hemoglobina, haptoglobina e hematócrito em pacientes com tratamento com o anticorpo humanizado. A era pós eculizumab demonstra a ausência de transfusões sanguíneas na HPN (HILL A, et al., 2005; KELLY RJ, et al., 2011; BERENTSEN S, et al., 2019).

Nossos resultados mostram o acompanhamento sequencial dos pacientes pelos testes laboratoriais de hemograma, testes lise eritrocítica e de imunofenotipagem. Para obter uma resposta sustentada na não projeção da HPN é necessário o uso contínuo do eculizumab, que é um medicamento caro, portanto, o paciente com sintomas leves ou sem sintomas devem esperar em vigilância. Este medicamento é indicado nos casos de anemia severa, trombozes, dores paroxísticas frequentes, cansaço debilitante, piora da insuficiência renal ou dispneia. Pacientes em uso de eculizumab devem ser monitorados a cada seis meses, estabilizando os resultados passam a ser avaliados anualmente (PARKER C, et al., 2005; BRODSKY RA, 2009; BOROWITZ MJ, et al., 2010; URBANO-ISPIZUA A, et al., 2011). O eculizumab é administrado por via parenteral, com infusões intravenosas de 600 mg por 30 minutos por 4 semanas, seguido de uma dose de reforço de 900 mg na semana subsequente e o tratamento necessita ser contínuo, pois quando o tratamento é suspenso o quadro de hemólise inicia se novamente (HILL A, et al., 2005; KELLY RJ, et al., 2011; BRODSKY RA, 2014; BERENTSEN S, et al., 2019). A forma de administração deste fármaco interfere na adesão ao paciente, o que justificaria as baixas nos números relativos de expressão de marcadores CD55, CD59 e FLAER nos pacientes 1, 2, 4 e 5 (**Figura 3**).

O nível de resposta ao eculizumab apresenta diversas variáveis e depende das condições inflamatórias, do tamanho dos clones de acordo com a sua associação com desordens da medula óssea e com a presença de anticorpos contra o eculizumab. Sendo a hemólise intravascular a que apresentou um maior nível de melhora com o uso do medicamento; a DHL teve uma diminuição substancial, ainda se mostrando levemente acima do limite. Gerando o questionamento de outras fontes de hemólise, como a hemólise extra vascular. A principal causa de mortes de pacientes com HPN é o tromboembolismo, diante ao tratamento com o medicamento eculizumab houve uma grande redução desses eventos trombóticos que ainda são desconhecidos, podendo ser relacionado a vários fatores como hemólise (DMYTRIJUK A, et al. 2008; HILLMEN P, et al., 2013; DEZERN AE, et al., 2013; RONDELLI T, et al., 2014; NISHIMURA J, et al., 2014).

Pacientes já diagnosticados com HPN devem ser mantidos em monitoramento para o tamanho do clone regularmente. Se o clone estiver estabilizado, esse monitoramento pode ser realizado anualmente, mas se houver uma mudança no quadro clínico, com aumento da frequência de hemólise ou evento trombótico deverá ser realizada uma nova avaliação. O critério de diagnóstico é realizado através da população de células GPI deficientes com no mínimo dois marcadores diferentes, e ao menos duas linhagens hematopoiéticas diferentes (O'DONNELI EA, et al., 2013).

Os pacientes foram monitorados frente a expressão de proteínas reguladoras do SC ancoradas nas membranas dos neutrófilos (marcação CD24_FITC), monócitos (CD14_APC), eritrócitos (CD59_FITC) e pela marcação do FLAER. No caso do paciente 3 houve o acompanhamento do mesmo desde o ano de 2015 a 2017, todavia a expressão do clone foi baixa, dessa forma os dados foram não mostrados. Os marcadores monoclonais CD55 e CD59 são classicamente usados em eritrócitos que são clinicamente ligados à hemólise, pois estão presentes em todas as linhagens das células. As populações mais estudadas para

avaliar a presença de clone HPN são os granulócitos que tem como marcadores principais o CD16, CD24, CD55 e os monócitos com marcadores CD14, CD55, CD64, essas células maduras por terem vida mais curta apresentam maior alteração e não sofrem influência das transfusões de sangue (PARKER C, et al., 2005; RICHARDS SJ, et al., 2007; WANG AS, et al. 2009; BOROWITZ MJ, et al., 2010; URBANO-ISPIZUA A, et al., 2011).

Um dos monoclonais também empregado, o *Fluorescent Labeled aerolysin* (FLAER), que é um resultante fluorescente de uma toxina bacteriana, a aerolisina, que liga se seletivamente ao GPI em subpopulações de leucócitos e plaquetas. É também muito sensível e específico para detectar clones HPN em granulócitos e monócitos mesmo com expressão menor que 1%. Não há ligação dos eritrócitos ao FLAER, pois os mesmos expressam a glicoforina que promove fraca ligação com essa toxina. O FLAER sempre é usado como complementar em um painel com os demais marcadores (SUTHERLAND DR, et al. 2007; BOROWITZ MJ, et al., 2010; URBANO-ISPIZUA A, et al., 2011; DAHMANI A, et al., 2016). Nossos resultados mostraram uma constância de expressão deste marcador nos pacientes avaliados, demonstrando uma maior susceptibilidade da população de E frente à doença HPN.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram pela primeira vez a avaliação e monitoramento de pacientes com HPN e em tratamento com o eculizumab pelo período de 2011 a 2017, pela aplicação da técnica de imunofenotipagem para os clones de HPN para marcadores de superfície dos perfis celulares granulócitos, monócitos e eritrócitos. Estudos relacionados ao diagnóstico HPN e o tratamento em nosso país ainda são escassos, sendo assim nosso estudo contribui enormemente sobre esta rara doença em nosso país. Dentre as limitações do nosso estudo, destacamos o longo período de avaliação dos pacientes, ressaltando a falta de assiduidade na realização dos diagnósticos, assim como possíveis faltas de reagentes laboratoriais, o que impossibilita a sequencial análise de alguns parâmetros dos pacientes com HPN. Outro fator a ser considerado é a obtenção dos prontuários dos pacientes e a dificuldade de um correto preenchimento dos formulários e prontuários, para obtenção dos dados a serem analisados.

REFERÊNCIAS

1. ALENCAR RCB, et al. Report of a case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with complex evolution and liver transplant. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 2016; 52 (5): 307-311.
2. ARAÚJO CJ, et al. Hemoglobinúria paroxística noturna: relato de dois casos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter. São José do Rio Preto*. 2002; 24 (4): 286-290.
3. ARRUDA MMAS, et al. Hemoglobinúria Paroxística Noturna: da fisiopatologia ao tratamento. Unifesp, São Paulo, SP. *Ver Assoc. Med. Bras.* 2010; 56 (2): 214-21.
4. BERENTSEN S, et al. Novel insights into the treatment of complement-mediated hemolytic anemias. *Ther Adv Hematol.* 2019, Vol. 10: 1–20.
5. BOROWITZ MJ, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 78 B: 211-30 (2010).
6. BRODSKY RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinúria: Stem cells and clonality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008; 111-115.
7. BRODSKY RA. How treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2009; 113 (26): 6522-6527.
8. BRODSKY RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2014. 124 (18): 2804-2811.
9. CORREIA RP, et al. Avanços técnicos no diagnóstico e no monitoramento de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo. *Einstein.* 2016;14(3):366-73.
10. DACIE JV, LEWIS SM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical manifestations, hematology and nature of the disease. *Ser. Haematol.* 1972; 3:3-23.
11. DAL MS, et al. Presentation and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinúria: a single-center experience. Department of Hematology, Dicle University, Diyarbakir, Turkey. *Hematology Reports.* 2016; 8:6409.
12. DAHMANI A, et al. Evaluation of Fluorescently Labeled Aerolysin as a New Kind of Reagent for Flow Cytometry Tests. *American Journal of Clinical Pathology*, 2016 145, 407–17.
13. DeZern AE, et al. Predictors of hemoglobin response to eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Haematol.* 2013 Jan;90(1):16-24.

14. DMYTRIJUK A, et al. FDA Report: Eculizumab (Soliris®) for the treatment of patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *The Oncologist* 2008; 13:993-1000.
15. 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.
16. HILL A, et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2559-65. Epub 2005 Jun 28.
17. HILLMEN P, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England Journal of Medicine*, 2004.350;6.
18. HILLMEN P, et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2013 Jul;162(1):62-73.
19. HÖCHSMANN B, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria treatment with eculizumab is associated with a positive direct antiglobulin test. 2012, *Vox Sanguinis*, 102, 159–166.
20. KELLY RJ, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6786-92.
21. MADKAIKAR M, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *European Journal of Haematology* 2009, 83 (503–511).
22. MALVEZZI M, et al. Hemoglobinuria paroxísitca noturna. In: Duarte A, Sales MM, Vasconcelos D, editores. *Citometria de fluxo aplicações no laboratório clínico e de pesquisa*. São Paulo: Atheneu; 2013.
23. MASTELLOS DC, et al. Expanding Complement Therapeutics for the Treatment of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Semin Hematol*. 2018 Jul;55(3):167-175.
24. MASTELLOS DC, et al. Clinical promise of next generation complement therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Sep;18(9):707-729
25. MOROMIZATO DT, et al. Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN): diagnóstico laboratorial. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25(2): 14.
26. NISHIMURA J, et al. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med*. 2014 Feb 13;370(7):632-9.
27. O'DONNELL EA; et al. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Network Research*. 2013; 13(2):.43-54.
28. PARKER C, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106 (12):3699-709.
29. PASQUINI R. Hemoglobinúria Paroxística Noturna. In: Zago MA, Falcão, Passetto R, Pasquini R(org). *Hematologia Fundamentos e Práticas*. Edição, Editora Atheneu, 2001; 163-168.
30. RICHARDS SJ, et al. Recent advances in the diagnosis, monitoring and management of patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinúria. *Citometry B ClinCytom*. 2007;72B:291-8.
31. RISITANO AM, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinúria patients treated by eculizumab. *Blood* 2009; 113:4094-4100
32. RONDELLI T, et al. Polymorphism of the complement receptor 1 gene correlates with the hematologic response to eculizumab in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2014 Feb;99(2):262-6.
33. ROSSE WF, et al. Immune-mediated Hemolytic Anemia. *American Society of Hematology*. 2004; 48-54.
34. SUTHERLAND DR, et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part B – Clinical Cytometry*, 2007,72, 167–77.
35. TEVA A.; et al. Imunologia. In: Molinaro EM; Caputo LFG; Amendoeira, MRR (Eds.) *Conceitos e Métodos para Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p. 2013:19 6 Formação de profissionais em laboratórios de saúde. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, p.1-124, 2009.
36. URBANO-ISPIZUA A, et al. Diagnóstico y tratamiento de la hemoglobinúria paroxística nocturna. *Medicina Clínica (Barcelona)*. 2011; 136:121-7.
37. WANG AS, et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinúria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Hematologica*.2009; 94: 29-37.