

**RODRIGO PAVANI**

**EXPRESSÃO DE FAS E FAS-LIGANTE EM PACIENTES COM  
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina para obtenção  
do título de Doutor em Ciências**

São Paulo  
**2009**

**RODRIGO PAVANI**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# **EXPRESSÃO DE FAS E FAS-LIGANTE EM PACIENTES COM HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Stella Figueiredo

**Coordenadora do Curso de Pós-  
graduação:** Profa. Dra. Gisele Wally Braga

Colleoni

**Disciplina de Hematologia e Hemoterapia**

**UNIFESP-EPM**

São Paulo

**2009**

Pavani, Rodrigo

**Expressão de Fas e Fas-Ligante em Pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna / Rodrigo Pavani.-- São Paulo, 2009.**

ix, 92f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Hematologia.

Título em inglês:

Fas and Fas ligant expression on Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

Descritores:

- |                                       |                        |        |
|---------------------------------------|------------------------|--------|
| 1. Hemoglobinúria Paroxística Noturna | 2. Apoptose            | 3. Fas |
| 4. Fas ligante                        | 5. Citometria de Fluxo |        |

## **DEDICATÓRIAS**

Aos meus pais com a mais profunda gratidão, pelo exemplo de vida e amor, imprescindíveis à minha formação ética.

A Anali, companheira querida de todos os momentos, pela compreensão, apoio e participação fundamental neste trabalho.

**À Profª Drª Maria Stella Figueiredo, com quem tive o privilégio de conviver durante todos estes anos, pelo exemplo profissional, pela amizade e pelo apoio em todos os instantes, transmitindo-me a segurança necessária para a realização deste trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Profª Sandra Guallandro pela disponibilização de seu tempo e de seus pacientes.

Ao Guilherme e à Marisa pela atenção e cuidado durante todo o projeto.

À Profª Draª Mihoko Yamamoto pelas sugestões, orientação e apoio em todos os instantes.

À Eliza, pelos ensinamentos e pela inestimável ajuda ao longo de todos estes anos.

Às amigas Andréa Timóteo, Marily e Martha Mariana, pela amizade, apoio e grande ajuda.

A todos os funcionários e amigos da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia de Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP-EPM, pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

Este projeto foi desenvolvido com suporte financeiro da FAPESP  
(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através  
de:

Auxílio Pesquisa: 04/12342-4

Doutorado Direto: 04/16019-3



## ***SUMÁRIO***

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. CASUÍTICA	32
4. MÉTODOS	34
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXOS	93

## **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** A deficiência e a exacerbação do sistema Fas/FasL está associada ao aparecimento de diversas doenças hematológicas ou não. Na HPN, existem evidências de que o sistema Fas/FasL possa atuar na seleção e proliferação do clone mutante através do aumento da apoptose das células normais. Nosso objetivo foi determinar a expressão dos marcadores de apoptose Fas e FasL em neutrófilos e monócitos de pacientes com HPN e tentar estabelecer relação entre estes marcadores de apoptose e os subtipos clínicos da doença.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Foram estudados 16 pacientes em acompanhamento nos Serviços de Hematologia da Universidade de São Paulo (USP) e da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Os pacientes foram divididos clinicamente em HPN clássica (HPN: 9 indivíduos) e HPN associada a quadro de falência medular (HPN/FM: 7 indivíduos). Foi avaliada a expressão de Fas (CD95) e de FasL em neutrófilos (CD59) e monócitos (CD14) de portadores de HPN, através de citometria de fluxo (FACScalibur, programa Cell Quest - BDB). Nos indivíduos HPN, as populações de neutrófilos foram divididas segundo sua positividade para o antígeno CD59 (59+/PC ou 59-/PC), e nos monócitos para o CD14 (14+/PC ou 14-/PC). Também foi analisada a expressão de Fas/FasL em neutrófilos (59+/GC) e monócitos (14+/GC) de 10 indivíduos normais (grupo controle).

**RESULTADOS:** Quando analisado o grupo total de pacientes, não foi vista diferença estatística na expressão do Fas quando comparados granulócitos (59+/PC, 59-/PC, 59+/GC) e monócitos (14+/PC, 14-/PC, 14+/GC). A expressão de FasL nos granulócitos 59-/PC foi significativamente menor do que nos 59+/PC ( $p=0,008$ ). Não foi observada diferença estatística na expressão de FasL em monócitos. Quando analisados os subtipos clínicos, pacientes com HPN/FM apresentaram menor expressão de Fas nos granulócitos 59-/PC ( $p=0,041$ ) e nos monócitos 14-/PC ( $p=0,014$ ) do que os indivíduos com HPN. A expressão de FasL não mostrou alterações em granulócitos e monócitos entre os grupos HPN e HPN/FM. Nos indivíduos com HPN/FM, entretanto, as células 59-/PC apresentaram expressão de FasL significativamente diminuídas em relação às 59+/PC ( $p=0,031$ ).

**DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:** Relatos anteriores sugerem que ocorra maior expressão de Fas em células-tronco CD59+ em comparação às células-tronco CD59-. Neste estudo, pacientes com falência medular associada apresentaram menor expressão de Fas em neutrófilos 59-/PC e monócitos 14-/PC do que os pacientes com HPN clássica, sugerindo que nestes pacientes as células 59+/PC e 14+/PC estariam mais sujeitas à apoptose, concordando com a hipótese de vantagem da sobrevivência do

clone HPN. A expressão de FasL foi maior em neutrófilos 59+/PC em comparação com 59-/PC, fato que se confirmou especialmente no grupo com falência medular associada. Este dado poderia sugerir um excesso de FasL na medula óssea levando à apoptose das células-tronco, o que explicaria as alterações medulares características da HPN. Apesar da importância do FasL na apoptose, este é o primeiro estudo a analisar a expressão de FasL em fagócitos de pacientes com HPN.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The Fas/FasL system dysfunction has been associated with hematological and non hematological diseases. In PNH, there are evidences that this system could select and maintain the proliferation of the mutational clone through the promotion of normal cells apoptosis. The aim of this study was to analyze the expression of Fas and FasL in neutrophils and monocytes from PNH patients. We tried also to detect a possible relation between these expressions and clinical subtypes of this disease.

**METHODS:** We analyzed 16 patients followed in 2 institutions: Sao Paulo State University (USP) and Federal University of Sao Paulo (UNIFESP). The patients were clinically classified as classic PNH (PNH/CL: 9 patients) and PNH in the setting of another bone marrow failure syndrome (PNH/BF: 7 patients). The expression of Fas (CD95) e Fas ligant (FasL) in neutrophils (CD59) and monocytes (CD14) was analyzed by flow citometry (FACScalibur, Cell Quest software - BDB). In PNH individuals, the neutrophils were divided according CD59 positivity (59+/Pt or 59-/Pt), and in monocytes according CD14 positivity (14+/Pt or 14-/Pt). There was analyzed the Fas/FasL expression in neutrophils (59+/CG) and monocytes (14+/CG) in 10 normal individuals (control group).

**RESULTS:** When we analyzed all patients, no statistical difference was found in Fas expression among the neutrophils 59+/Pt, 59-/Pt and 59+/CG. The same result was observed among monocytes 14+/Pt, 14-/Pt and 14+/CG. FasL expression on 59-/Pt neutrophils was significantly less than on 59+/Pt ( $p=0.008$ ). FasL expression on monocytes showed no statistical difference. When we analyzed the data according with clinical subtypes, PNH/BF patients had less Fas expression on 59-/Pt neutrophils ( $p=0.041$ ) and on 14-/Pt monocytes ( $p=0.014$ ) than PNH/CL. FasL expression did not showed difference on neutrophils and monocytes between PNH/CL and PNH/BF patients. The group of PNH/BF individuals, however, had 59-/Pt with less FasL expression than 59+/Pt cells ( $p=0.031$ ).

**DISCUSSION:** Previous studies had been show higher expression of Fas in CD59+/stem cells than CD59-/stem cells. In this study, PNH/BF patients had less Fas expression on 59-/Pt and on 14-/Pt cells than PNH/CL patients. This data suggest that 59+/Pt and 14+/PT cells could be more susceptible to apoptosis, with is in agreement with the PNH clone survival advantage hypothesis. FasL expression was higher on 59+/Pt than on 59-/Pt, especially in the PNH/BF group. We could speculate, with this data, that FasL in excess could act in bone marrow, initiating the stem cells apoptosis process, what explain the characteristics bone marrow

alterations found in PNH. Although of the importance of FasL in apoptosis, this is the first study to analyze its expression on PNH.

## INTRODUÇÃO

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma patologia de caráter adquirido das células sangüíneas. A manifestação clínica bem como a gravidade dos sintomas é variável, mas, em geral, os pacientes apresentam hemólise intravascular e conseqüente hemoglobinúria, tendência à trombose e falência medular. (Parker, Omine et al. 2005)

As células HPN apresentam deficiência de proteínas de superfície celular que utilizam a molécula de Glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) como âncora e, atualmente, são conhecidas cerca de 27 diferentes proteínas ligadas ao GPI. O bloqueio na biossíntese da GPI ocorre pela falta da enzima  $\alpha$ -1,6N-acetil-glicosaminil-transferase e o gene relacionado a esta deficiência é o fosfatidil-inositol-glicano de classe A (PIG-A), localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1). (Hill, Richards et al. 2007)

Em todos os casos de HPN em que houve a análise desse gene, foi demonstrada a presença de pelo menos um tipo de alteração molecular. Entretanto, estas alterações são heterogêneas, sua distribuição parece ser aleatória e mutações deste gene foram descritas em indivíduos normais. Além disso, estudos mostraram que as células-tronco PIG-A mutantes não apresentam vantagem de crescimento em relação às células-tronco normais. Entretanto, para que a HPN se torne clinicamente evidente, as células mutantes necessitam dominar a hematopoese e este fato é observado nos pacientes. (Rosti, Tremml et al. 1997; Parker 2007; Hu, Mukhina et al. 2005)

Apesar dos avanços na compreensão da base molecular e das mutações envolvidas na doença, o aspecto central da fisiopatologia da doença permanece desconhecido,(Chen, Nagarajan et al. 2000) já que os achados sugerem que a presença da mutação no gene PIG-A não é suficiente para explicar a expansão do clone de célula HPN na medula óssea dos pacientes.

Está claro que, diferentemente das células leucêmicas, as células mutantes PIG-A não apresentam vantagem absoluta de crescimento. Estas células além de não apresentarem expansão rápida, são incapazes de repor completamente a hematopoese. (Ismail, Tooze et al. 2003; Marsh and Elebute 2003; Hill, Richards et al. 2007) Diferentes teorias foram propostas para explicar a seleção e aparente vantagem de sobrevivência do clone HPN diante das células hematopoéticas normais, dentre as quais podemos citar:

- ✓ Vantagem no crescimento – presença de várias alterações intrínsecas poderia conferir uma vantagem proliferativa ao clone de células PHN em relação ao clone de células normais, ou, alternativamente, a mutação no gene PIG-A poderia conferir uma vantagem relativa de sobrevivência; (Nakakuma and Kawaguchi 2003)
- ✓ Vantagem na resistência – células PIG-A mutantes seriam relativamente mais resistentes ao ataque citotóxico pelas células *natural-killer* (NK) e linfócitos-T citotóxicos.(Bessler, Mason et al. 1994)

Dados experimentais recentes têm mostrado que, aparentemente, estas duas teorias seriam complementares e não exclusivas, sugerindo a presença de outros genes envolvidos na fisiopatologia da doença, o que vem sendo pesquisado

em trabalhos experimentais. (Lyakusheva, Felda et al. 2002; Heeney, Ormsbee et al. 2003; Nakakuma and Kawaguchi 2003; Chen, Zeng et al. 2005; Parker 2007)

## **OBJETIVOS**

Dados recentes sugerem que a apoptose tem papel fundamental na fisiopatogenia da HPN, entretanto, o papel do sistema Fas/FasL nesta doença não está claramente definido. (Ismail, Tooze et al. 2003)

Considerando que o sistema Fas e FasL é sabidamente importante na apoptose de fagócitos (Liles, Kiener et al. 1996; Husain, Almeciga et al. 2006) e que sua análise pode ser realizada por citometria de fluxo simultaneamente à identificação das células HPN, tivemos como objetivos:

1. Avaliar a expressão de Fas e de FasL em granulócitos clonais e não clonais de pacientes com HPN, comparando com granulócitos de indivíduos normais;
2. Avaliar a expressão de Fas e de FasL em monócitos clonais e não clonais de pacientes com HPN, comparando com monócitos de indivíduos normais;
3. Tentar estabelecer relação entre marcadores de apoptose e manifestações clínicas da doença.

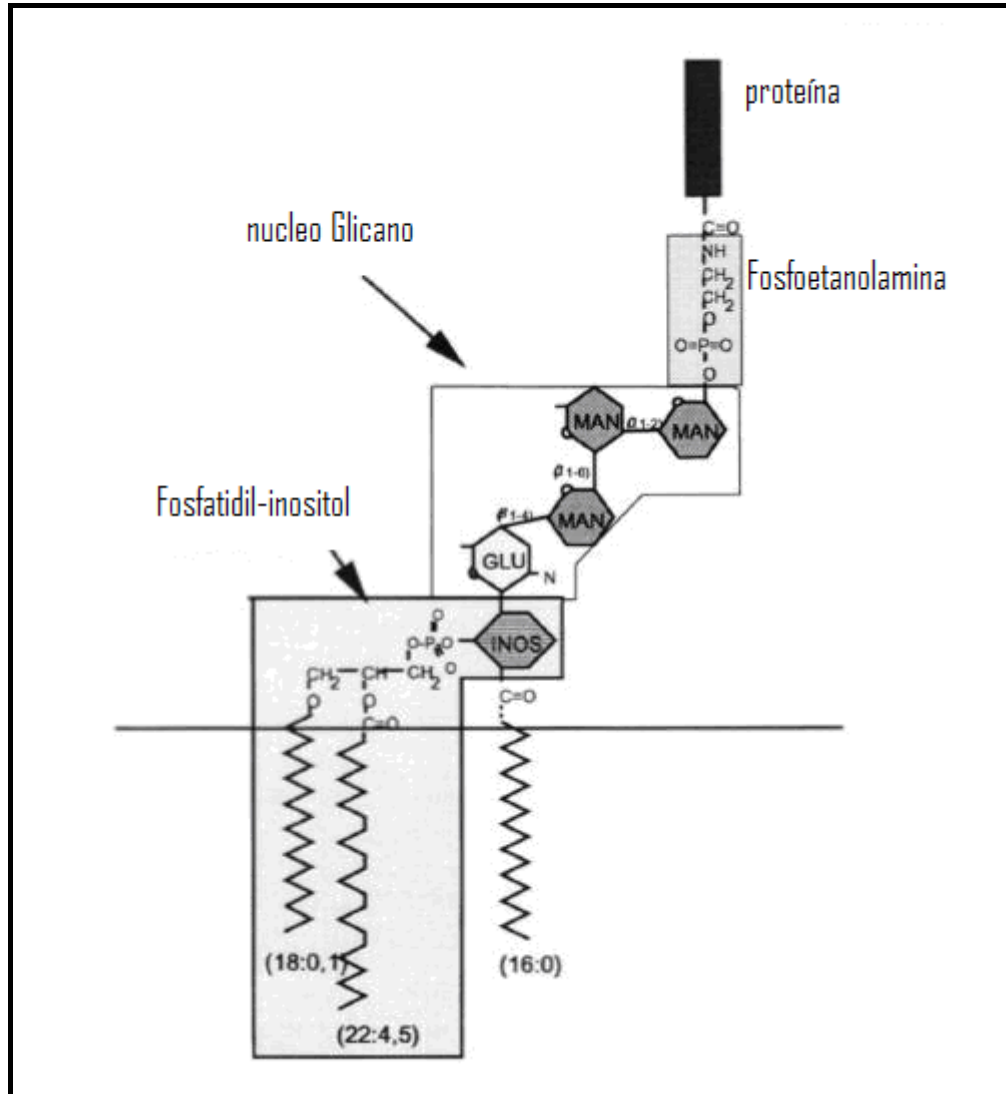


## REVISÃO DE LITERATURA

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma patologia adquirida das células sangüíneas, mais comum em adultos jovens, porém diagnosticada também em crianças e idosos. É uma desordem de stem cell caracterizada pela deficiência de proteína âncora do fosfatidilinositol (GPI-AP) na superfície das células hematopoéticas. Isso permite a hemólise intravascular mediada por complemento (Brodsky, Vala et al. 1997; Brodsky 2008). Nenhuma forma hereditária foi relatada até o momento. Os pacientes com manifestação clássica de HPN apresentam curso clínico caracterizado por hemoglobinúria devido à hemólise intravascular, tendência à trombose e complicações como a falência medular.

As células HPN apresentam deficiência de todas as proteínas de superfície que utilizam a molécula de Glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) como âncora (Figura 1). Estas proteínas ligadas ao GPI apresentam múltiplas funções: servem como ectoenzimas, moléculas acessórias para receptores de fator de crescimento, inibidores do Complemento e moléculas de adesão, entre outras. As mais importantes, e associadas com manifestações clínicas de hemólise, são o CD55 e CD59, que protegem a célula da ação do complemento (Nishimura, Murakami et al. 1999). Outras como o CD157 estão implicadas na adesão e migração de neutrófilos.(Funaro, Ortolan et al. 2004) A tabela 1 mostra as principais proteínas ancoradas ao GPI.

**Figura 1** - Esquema da estrutura da âncora glicosilfosfatidilinositol que mantém aderidas à membrana plasmática dezenas de proteínas com funções específicas. (Rosse, Ware, 1995)



**Tabela 1** – Principais antígenos/proteínas de membrana ligados à âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol), linhagem hematopoética onde estão presentes e sua função.

<b>Antígenos / Proteínas</b>	<b>Linhagem hematopoética</b>	<b>Função</b>
CD55	Todas as células sanguíneas	Reguladores do complemento
CD59		
CD58	Todas as células sanguíneas	Moléculas de adesão
CD48		
CD66b	Granulócitos	Enzimas
CD48	Leucócitos	
Acetilcolinesterase	Eritrócitos	
CD73	Linfócitos B e T	
CD16	Granulócitos e células NK	Receptores
CD87	Monócitos e granulócitos	
Receptor do folato	Células mielóides e eritroides	
CD14	Granulócitos, monócitos e macrófagos	
CD24	Granulócitos e linfócitos B	Diferenciação B
Proteína de Dombrock-Holley	Eritrócitos	Antígenos grupos sanguíneos
CDw52	Linfócitos e monócitos	desconhecida
CD157	Células mielóides	Adesão e migração neutrófilos

A incidência da HPN não é totalmente conhecida, não só pela sua raridade como pela dificuldade diagnóstica que ela impõe. Nos Estados Unidos estima-se 1 a 5 casos a cada milhão de habitantes, acreditando-se que sua incidência seja 5 a 10 vezes menor que a de anemia aplástica. É provavelmente mais freqüente no sul da Ásia e dentre os orientais. Pode ocorrer em qualquer idade, mas a maioria dos pacientes abre o diagnóstico na idade adulta.(Socie, Mary et al. 1996) Crianças e adolescentes perfazem 10% dos casos e se apresentam mais freqüentemente com bi ou pancitopenias, enquanto a trombose ocorre com igual freqüência em todos os grupos etários. Afeta homens e mulheres na mesma proporção, e não foi observada predisposição familiar.(Socie, Mary et al. 1996) Sua história natural parece ser diferente entre Americanos e Europeus quando comparados com Asiáticos, Hispânicos e Oceânicos. No geral, as manifestações de falência medular são mais comuns em Asiáticos e Oceânicos, enquanto a trombose e infecção ocorrem mais comumente em pacientes europeus e americanos. As bases destas diferenças fenotípicas não são conhecidas, mas é importante levá-las em consideração quando se tenta estabelecer um plano terapêutico.(Parker, Omine et al. 2005)

## **Etiologia e Patogênese**

Surge como distúrbio oligo ou monoclonal da *stem cell*. A anormalidade clássica é a sensibilidade aumentada à lise de eritrócitos mediada por complemento, detectada por diferentes testes, como o teste de hemólise ácida e o teste da sacarose. A desordem é resultado de mutações somáticas do gene que produz a ancora protéica glicosilfosfatidilinositol (GPI). Além disso, está associada com a anemia aplástica e síndromes mielodisplásicas. (Brodsky, Vala et al. 1997)

A HPN é causada pela expansão clonal não-maligna de uma ou mais células tronco hematopoéticas que adquiriram mutação(ões) somática(s) no gene da fosfaditilinositolglicana classe A (phosphatidyl inositol glycan class A, PIGA), localizado no cromossomo X. (Hillmen, Young et al. 2006; Nguyen, Marinopoulos et al. 2006) Estas mutações resultam no bloqueio precoce da síntese da âncora glicosilfosfaditilinositol (GPI), responsável por manter aderida à membrana plasmática dezenas de proteínas com funções específicas. (Mathieu, Rahmouni et al. 1995)

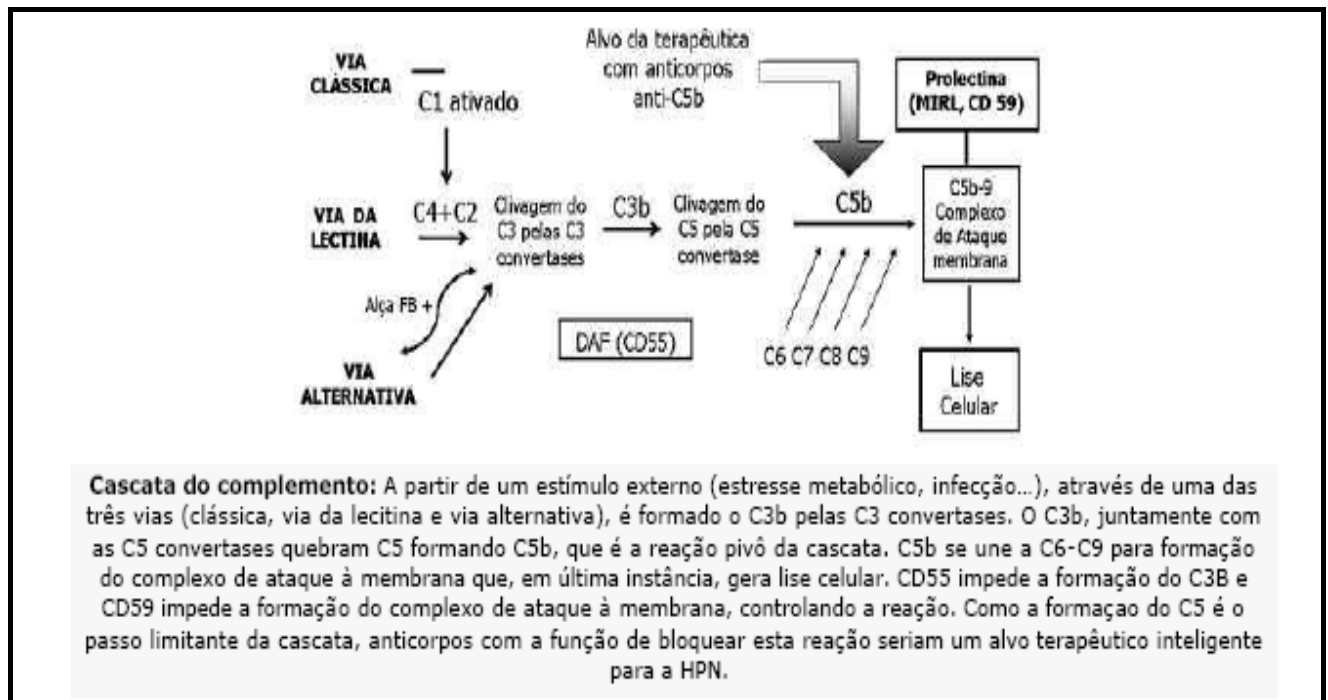
A falência em sintetizar a molécula de GPI gera ausência de todas as proteínas de superfície normalmente ancoradas por ela (Brodsky 2008). Conseqüentemente, as células sanguíneas advindas do clone HPN têm algum grau de deficiência destas proteínas, que pode ser parcial (células PNH tipo II, com cerca de 10% da expressão normal) ou total (células HPN tipo III, com ausência completa da proteína).(Hillmen, Young et al. 2006) Dentre as proteínas ancoradas pela GPI estão os CD55 e CD59, que têm o importante papel de controlar a ativação da cascata do complemento. Assim, a hemólise da HPN resulta do aumento da susceptibilidade de eritrócitos HPN ao complemento, pela redução ou ausência completa destas proteínas regulatórias na superfície celular.

O sistema complemento consiste em mais de 20 proteínas séricas que interagem em seqüências precisas de ativação enzimática e ligação à membrana celular, gerando produtos com propriedades imunoprotetoras, imunorregulatórias, próinflamatórias e citolíticas. Ele pode ser ativado por três vias: via clássica, via da lecitina e via alternativa, sendo que as três resultam na geração de complexos C3convertase, que medeiam a quebra de C3 em C3a e C3b. (Figura 2) Células HPN

são vulneráveis à ativação do complemento por qualquer das três vias; como a via alternativa mantém um estado de ativação baixa, porém contínua, isto explica porque os pacientes com HPN têm hemólise crônica.(Reeves 2005)

O CD55 (*decay accelerating factor*) inibe o complemento ao nível de C3, acelerando a taxa de destruição da C3convertase ligada à membrana e reduzindo a quantidade de C3 quebrada a C3a e C3b. Já o CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis*) é uma glicoproteína que interage diretamente com o complexo de ataque à membrana (também chamado de complexo de complemento terminal C5b9) para impedir a formação do poro lítico na superfície celular a partir da agregação de C9. (Brodsky 2008) A ausência desta proteína gera hemólise intravascular crônica mediada pelo complemento. A ausência de CD59 na superfície de células sanguíneas afetadas as torna susceptíveis à lise mediada pelo complexo de complemento terminal, o que explica a característica de hemólise crônica com exacerbações de hemólise intravascular aguda, manifestação clínica primária da doença.(Parker, Omine et al. 2005) Das duas proteínas, CD59 é a mais importante na proteção contra lise celular mediada por complemento.

**Figura 2** – Representação esquemática da cascata do complemento. (Arruda, Rodrigues et al. 2009)

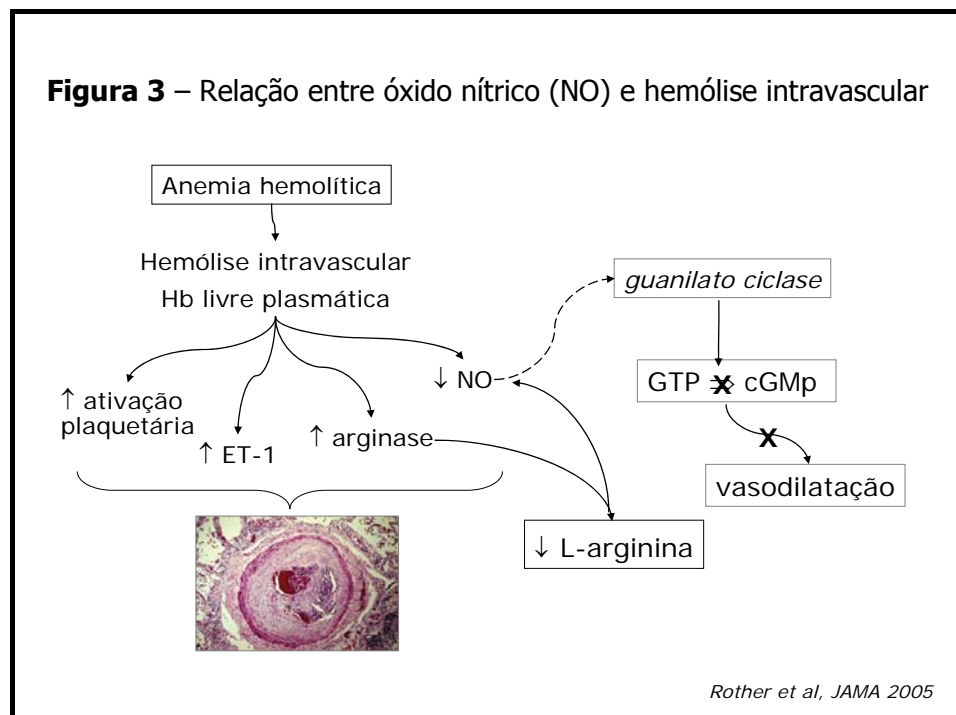


Existem 3 fenótipos HPN que se baseiam na sensibilidade do eritrócito HPN ao complemento, resultado do nível de expressão das proteínas ligadas ao GPI. Essa classificação tem grande importância, pois o fenótipo está correlacionado com a gravidade das manifestações clínicas, especialmente a hemólise. (Hillmen, Young et al. 2006)

- HPN I: eritrócitos mostram sensibilidade normal, ou relativamente normal, ao complemento;
- HPN II: eritrócitos moderadamente sensíveis ao complemento, sensibilidade aumentada 3 a 4 vezes em relação aos eritrócitos normais;
- HPN III: eritrócitos se apresentam muito sensíveis ao complemento, 15 a 25 vezes em comparação às células normais. (Rosse, Hillmen et al. 2004)

Descobertas recentes na fisiopatologia da HPN tem atribuído importância crescente nas manifestações da doença e na sua evolução, a dois mecanismos: a depleção de Óxido Nítrico (Rother, Bell et al. 2005) e a desregulação da apoptose (sistema Fas /FasL). (Brodsky, Vala et al. 1997)

O óxido nítrico (NO) é o maior regulador da fisiologia vascular, e muitas das manifestações clínicas da HPN são facilmente explicadas pela depleção tecidual de NO. Normalmente, a óxido nítrico sintetase do endotélio utiliza oxigênio e arginina para produzir NO. Este age na parede vascular para manter tônus e limitar ativação plaquetária. Como a hemoglobina livre tem alta afinidade pelo NO, ela o retira de circulação.(Rother, Bell et al. 2005) (Figura 3)





Na HPN, a falência em regular o complemento na superfície eritrocítica leva a importante hemólise intravascular, com liberação de grandes quantidades de hemoglobina livre e arginase eritrocitária no plasma, que depletam o NO e também a arginina, substrato para a sua síntese. A haptoglobina normalmente capta hemoglobina livre, sendo um mecanismo compensatório para o *clearance* desta, mas suas altas concentrações acabam por exceder a capacidade de captação.(Brodsky 2008) A depleção tecidual de NO se manifesta clinicamente como astenia, dor abdominal, espasmo esofágico, disfagia, impotência sexual masculina e possivelmente trombose. Todas estas manifestações clínicas são mais comuns no paciente com grandes populações celulares HPN.(Rosse, Hillmen et al. 2004)

A apoptose, processo fisiológico de morte celular programada, desempenha papel relevante na homeostase de diferentes tecidos, inclusive, do sistema hematopoético. Esse processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores. (Akgul and Edwards 2003)

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular (via extrínseca ou via receptor de morte celular), chamados receptores da morte, ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial). Essas vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases executoras.(Bergantini, Castro et al. 2005)

Os fagócitos humanos – neutrófilos, monócitos e eosinófilos – morrem via apoptose quando mantidos *in vitro*. Neutrófilos humanos maduros entram em

apoptose espontânea mais rapidamente, resultando em redução de mais de 50% da população em 48h.(Liles, Kiener et al. 1996)

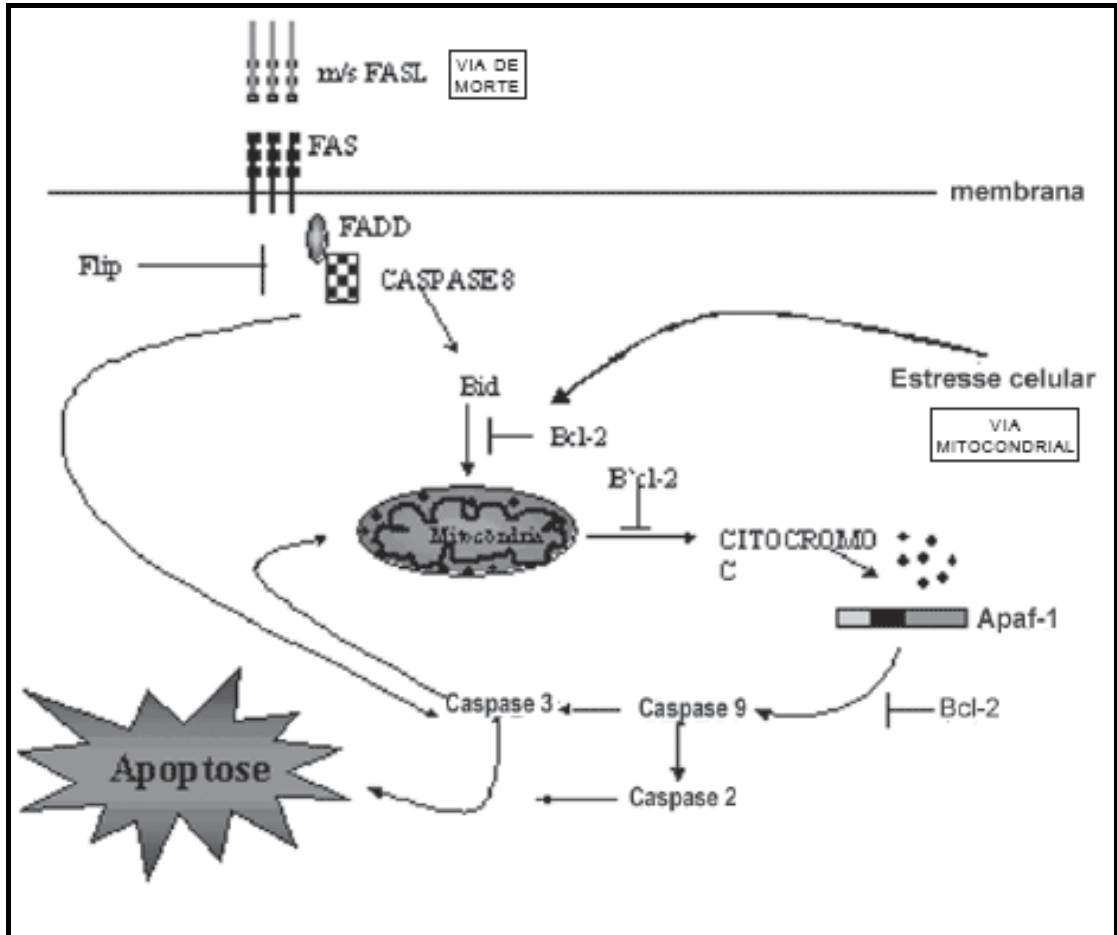
Os receptores da morte podem ativar a cascata da caspase pela ativação da caspase 8. Os receptores da apoptose incluem TNFR (receptor do fator de necrose tumoral), Fas (Apo-1/CD95), DR3 (Apo-3/TRAMP), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) e DR6. Destes, os mais bem caracterizados são o TNFR1 e o Fas, ambos proteínas transmembrana. Estão envolvidos, principalmente, na interação célula-célula e conectam os receptores com componentes da maquinaria apoptótica intracelular. (Cao, Shao et al. 2005)

A via de apoptose intrínseca envolve mitocôndria e os membros da família Bcl-2 e resulta na ativação da cascata da caspase através da ativação da caspase 9. O controle desta ativação ocorre pela liberação de citocromo C mitocondrial e pelo níveis e atividades pró- e anti-apoptose da família Bcl-2 (Akgul and Edwards 2003). (Figura 4)

O sistema Fas-FasL é constituído pelo receptor Fas (APO-1 ou CD95) e seu ligante, FasL, membros da família do fator de necrose tumoral (TNF). (Watson, Rotstein et al. 1997; Bergantini, Castro et al. 2005)

Fas é uma proteína de membrana tipo I, responsável pela tradução do sinal apoptótico.(Hohlbaum, Moe et al. 2000) Enquanto Fas é expresso na maioria das células do organismo, seu ligante FasL é observado nas membranas das células citotóxicas da resposta imune, hepatócitos, em linfócitos T ativados e em células oculares.(Dotti, Savoldo et al. 2005)

**Figura 4** – Esquema do processo de ativação da apoptose pela via dos receptores de morte celular (Fas-FasL) e pela via mitocondrial.(Bergantini, Castro et al. 2005)



A apoptose via Fas-FasL é desencadeada pela interação entre eles. Quando esta ocorre, os receptores formam agregados que, na forma de trímeros, ligam-se à proteína adaptadora FADD (Fas-associated death domain) presente no citoplasma. Ocorre, então, a ligação dessas moléculas à pró-caspase-8, resultando na formação de um complexo denominado DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), que culmina na auto-clivagem e ativação da caspase-8. A caspase-8 pode, assim, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 efetora, o que resulta na apoptose celular. O recrutamento e ativação da pró-caspase-8 são regulados por proteínas anti-apoptóticas, como o v-FLIP (FADD-like ICE inhibitory proteins) and c-

FLIP. Essas proteínas competem com a caspase-8 pelo sítio de ligação do complexo Fas-FADD e inibem a apoptose celular. (Simon 2001; Cao, Shao et al. 2005)

A deficiência e a exacerbação do sistema Fas-FasL já foi associada a aparecimento de tumores, doenças auto-imunes e destruição tecidual. O descontrole do processo de apoptose devido à exacerbação parece estar relacionado com a etiopatogênese de doenças hematológicas, como a síndrome mielodisplásica, a anemia aplástica grave. A deficiência já foi associada com a LMC e com leucemias linfóides. (Chauffaille 2005)

Na HPN, apesar dos poucos estudos disponíveis, existe evidência de que o sistema Fas/FasL atue na seleção e proliferação do clone HPN, por aumento de apoptose das células normais, em detrimento dos clones negativos nos pacientes. (Chen, Nagarajan et al. 2000)

HEENEY *et al.* (Heeney, Ormsbee et al. 2003) analisaram, por microarray, a expressão diferencial de 205 genes à apoptose em pacientes HPN e encontraram quatro com níveis aumentados de expressão (2-6 vezes) nos pacientes HPN, quais sejam: Human A1, Mcl-1, hHR23B e Rho-A.

ISMAIL *et al.* (Ismail, Tooze et al. 2003), por sua vez, estudaram a expressão do antígeno Fas nas células CD34+ de pacientes HPN e compararam a expressão do mesmo antígeno em células controle normais. Observaram expressão aumentada do antígeno Fas nas células CD34+ do paciente HPN. Além disso, observaram que as células CD34+/CD59+ mostram expressão elevada do antígeno Fas em relação às células CD34+/CD59- do mesmo paciente. Concluíram, portanto, que as células CD34+/CD59- apresentam proteção parcial à apoptose.

Sendo a HPN uma doença de fisiopatogenia não totalmente esclarecida, o estudo dos marcadores de apoptose poderá auxiliar na compreensão dos fatores relacionados ao desencadeamento do episódio inicial, à evolução e ao prognóstico da doença.

## **Manifestações Clínicas**

As manifestações clínicas da HPN variam enormemente, desde quadros oligosintomáticos até quadros fatais.

Podemos didaticamente dividir as manifestações clínicas em 4 grupos principais:

### **1. Hemolíticas**

As manifestações de hemólise intravascular variam enormemente, desde quadros leves, praticamente assintomáticos, até casos graves que se manifestam com dor subesternal, lombar, abdominal, juntamente com tontura, mal-estar geral febre e cefaléia, podendo ser fatais.

Esta manifestação, típica da doença, entretanto ocorre como manifestação inicial em 20 a 25% dos casos, habitualmente pela manhã. Seu mecanismo parece estar relacionado ao aumento da atividade de complemento que acontece no período noturno, durante o sono. Durante a evolução da doença, porém, 80% dos pacientes irão desenvolver hemoglobinúria, de intensidade variável, que pode ser precipitada por infecções, cirurgia, transfusões de glóbulos vermelhos, suplementação por ferro,

vacinações,(Rosse and Nishimura 2003) menstruação ou injeção de contraste endovenoso. (Nishimura, Murakami et al. 1999)

## **2. Citopenias**

As citopenias são comuns e estão relacionadas à hipoplasia da medula óssea. Anemia aplástica é o diagnóstico inicial de aproximadamente 30% dos pacientes com HPN, além disso, o clone HPN pode aparecer durante ou após o tratamento imunossupressor da anemia aplástica.(Bacigalupo 2007; Bacigalupo and Passweg 2009) Os sintomas são os relacionados com a série sanguínea deficiente, como fraqueza, palidez, dispnéia (série vermelha), infecções (série branca), sangramentos, petéquias e equimoses (série plaquetária). (Mathieu, Rahmouni et al. 1995; Bacigalupo and Passweg 2009)

Uma das manifestações da HPN são os episódios freqüentes de infecção,(Horikawa, Nakakuma et al. 1997) e ainda não está esclarecido que o aumento de infecções bacterianas nesses pacientes são relacionadas somente à neutropenia ou também à função deficiente dessas células.(Young, Abkowitz et al. 2000) Existem dados recentes que demonstram que neutrófilos não ativados respondem à ligação Fas com taxas aceleradas de apoptose, enquanto os neutrófilos ativados seriam refratários aos sinais do Fas.(Watson, Rotstein et al. 1997)

## **3. Tromboses**

Ocorrem especialmente na circulação venosa, provavelmente de origem multifatorial, ativação do complemento e lesão endotelial. Há evidência de que a

hemólise contribua para os episódios tromboembólicos na HPN, especialmente porque pacientes com clones HPN maiores têm maior incidência de trombose, e estes eventos se correlacionam temporalmente com o aumento da hemólise.(Parker, Omine et al. 2005; Hillmen, Young et al. 2006)

Apesar de o mecanismo da trombose não estar completamente esclarecido, a hemólise foi implicada na iniciação da ativação e agregação plaquetária. Estudos adicionais *in vitro* sugerem que o complemento terminal pode ativar diretamente as plaquetas de pacientes com HPN. Além disto, ativação do complemento induz alteração das membranas de eritrócitos com formação de microvesículas, o que potencialmente contribui para a trombogênese. (Meletis and Terpos 2003)

A ausência de proteínas normalmente ancoradas pela GPI também podem contribuir para o aumento de incidência de trombose, como o receptor do ativador de plasminogênio uroquinase, cuja ausência gera redução da fibrinólise local, e o inibidor da via do fator tecidual que, se ausente, permitiria o aumento da atividade pró-coagulante deste fator.(Rosse 2008)

Veias intra-abdominais são os sítios de trombose mais comuns nos pacientes com HPN. Síndrome de Budd-Chiari é uma complicação séria e potencialmente fatal dessa doença. Em algumas séries a incidência dessa manifestação varia de 15 a 30%. As manifestações clínicas incluem náuseas, dor abdominal, ascite de grau variado, sangramento por varizes, e sinais de insuficiência hepática. Frequentemente o fígado aumenta rapidamente de tamanho, porém a hepatomegalia não é sempre notada.

Outras localizações observadas de trombozes são: cérebro, vasos da derme superficial, pulmões e rins. A doença trombótica, ameaçadora à vida ocorre em mais de 40% dos pacientes, principalmente quando envolvem o sistema portal ou o cérebro. (Socie, Mary et al. 1996) Alguns pacientes podem desenvolver quadro de dor abdominal de repetição por pequenas trombozes, que pode inclusive simular quadro de abdome agudo. (Mathieu, Rahmouni et al. 1995) O embolismo pulmonar, pode se manifestar como dispnéia e dor torácica. Hipertensão pulmonar pode estar presente como consequência das trombozes de repetição.

#### **4. Outras Manifestações:**

Outro sítio afetado pela HPN é o rim, sendo o mecanismo de lesão multifatorial, principalmente lesão glomerular induzida pela hemoglobinúria e pelas trombozes da microcirculação renal. Hipertensão arterial pode ser a primeira manifestação clínica da lesão renal. (Hill, Hillmen et al. 2005)

As manifestações neurológicas incluem cefaléia que pode ser intensa e refratária e é preditora de trombose cerebrovascular, porém o tromboembolismo do sistema nervoso central é incomum, mas com alta mortalidade. (Beutler 2005)

Disfagia, dor abdominal, espasmos esofágicos, hipertensão arterial, disfunção erétil, trombose e ativação plaquetária, hemoglobinúria e insuficiência renal parecem estar relacionados à redução de óxido nítrico causada pela hemoglobinemia e conseqüente lesão endotelial e vasoconstricção da microvasculatura. (Rother, Bell et al. 2005; Brodsky 2008)



Síndrome mielodisplásica é patologia associada à HPN e sua incidência fica em torno de 5%. (Parker 2009) A associação de HPN com leucemia aguda, em geral devido à evolução clonal nos casos com anemia aplástica associada à HPN, pode ser observada em 1 a 3% dos pacientes, (Socie, Mary et al. 1996) embora, em série de casos japonesa, esta incidência tenha sido relatada como de 7,5%. (Fujioka and Asai 1989)

Outras complicações possíveis são hemocromatose nos pacientes politransfundidos que não espoliam ferro pela urina, hepatite por hemotransfusões e tumores sólidos, com incidência maior que a esperada para a população geral corrigida para idade e sexo. (Socie, Mary et al. 1996)

As maiores causas de morte dos pacientes com HPN são trombose, infecção e doenças malignas, podendo também ocorrer morte por hemorragia nos pacientes plaquetopênicos. As estimativas de sobrevida em 10 anos foram de 66% na série de casos francesa, (Socie, Mary et al. 1996) 50% na série de casos inglesa (Hillmen, Lewis et al. 1995) e 71% na série de casos japonesa. (Fujioka and Asai 1989)

A partir de análise multivariada, foram definidos sete fatores capazes de influenciar independentemente sobrevida em pacientes com HPN. Foram eles:

- a) complicações trombóticas, independentemente da localização (RR=10,2; 6-17);
- b) desenvolvimento de pancitopenia (RR=5,5; 2,8-11);
- c) evolução para síndrome mielodisplásica ou leucemia aguda (RR=19,1; 7,3-50);

- d) idade maior que 55 anos (RR=4,0; 2,4-6,9);
- e) mais de uma forma tratamento, incluindo imunossupressão, corticóide em dose baixa, andrógenos, danazol, entre outros (RR=2,1; 1,3-3,6);
- f) trombocitopenia ao diagnóstico (RR=2,2; 1,3-3,8) e
- g) anemia aplástica precedendo a HPN (RR=0,32; 0,14-0,72). (Socie, Mary et al. 1996)

Por outro lado, autores ingleses observaram que até 15% de seus pacientes apresentaram remissão clínica espontânea, sem conseguirem definir claramente quem são estes pacientes antes de eles alcançarem remissão. (Dacie and Lewis 1972)

## **Alterações laboratoriais**

### ***Hematológicas***

A anemia pode ser grave com níveis de hemoglobina menores que 5 g/dL, secundária à hemólise e/ou citopenia. Pode ser macrocítica, normocítica ou microcítica (por perda renal de ferro). A macrocitose pode ser relativa ou absoluta. Neste caso ela pode ser devida a deficiência de ácido fólico, associação com doenças medulares que cursam com macrocitose ou aumento de reticulócitos. O teste de Coombs é negativo.(Beutler 2005)

Leucopenia é um achado comum, com diminuição da atividade da fosfatase alcalina dos leucócitos. Defeitos funcionais dos leucócitos foram demonstrados, porém seu significado é incerto. Plaquetopenia é uma manifestação

comum, porém 20% dos pacientes apresentam contagem normal. Plaquetopenia inferior a  $50 \times 10^9/L$  é incomum. (Beutler 2005)

### ***Bioquímicas***

Os depósitos de ferro são variáveis, refletindo o equilíbrio entre a perda de ferro pela hemoglobinúria, a necessidade transfusional e o grau de aplasia medular. (Rosse, Hillmen et al. 2004)

A hemólise pode ser monitorizada pelos níveis séricos da enzima desidrogenase láctica (DHL), liberada em situações de destruição de hemácias. Esta enzima está tipicamente aumentada em pacientes com HPN, podendo chegar a até 20 vezes o limite superior da normalidade durante surtos graves. Haptoglobina está usualmente diminuída pela hemólise e pode haver aumento dos níveis de bilirrubinas, relacionados aos episódios de hemólise intravascular. (Rosse, Hillmen et al. 2004; Hill, Hillmen et al. 2005)

### ***Mielograma***

O mielograma apresenta hiperplasia normoblástica (manifestação mais freqüente) com sinais de diseritropoese discreta na maioria dos casos. Quando pancitopenia é evidente, medula óssea hipoplásica pode ser observada, o que pode levar ao diagnóstico de anemia aplástica. Entretanto, mesmo nestes casos, pode haver aumento relativo da série vermelha. (Parker, Omine et al. 2005)

### ***Achados renais***

Análise de urina pode mostrar a presença de hemoglobina, urobilinogênio aumentado, albuminúria e hemossiderinúria. Isostenúria, função tubular anormal,

hipertensão arterial, insuficiência renal aguda e crônica são outros achados referidos. (Beutler 2005)

## **Diagnóstico**

Classicamente, os testes de diagnóstico utilizados eram o teste da sacarose e da hemólise ácida (Ham). O teste de Ham consiste em uma prova de lise ácida realizada em soro acidificado a 37°C, na qual as hemácias comprometidas, diferentemente das normais, sofrem lise na presença de complemento. É um teste pouco sensível, mas com alta especificidade. O teste da sacarose é análogo, porém utiliza meio de baixa força iônica sendo menos específico. Ambos são de fácil execução, porém operador-dependentes. (Lewis and Dacie 1967).

Atualmente, a citometria de fluxo é o exame padrão ouro. Nela é analisada a ausência de proteínas de superfície ancoradas às células sanguíneas (hemácias, granulócitos, monócitos, linfócitos e/ou plaquetas) e, para isso, são utilizados anticorpos monoclonais específicos para essas proteínas. Normalmente é analisada a expressão do CD59 em eritrócitos e/ou granulócitos, o que permite a separação das 3 subpopulações possíveis na doença. O CD55 também é informativo nestas células, porém sua densidade é menor. Podem ser usados outros marcadores, como CD66 e CD14 em granulócitos e monócitos respectivamente. (Hernandez-Campo, Almeida et al. 2008; Brodsky 2009)

## Classificação da HPN

Trabalhos recentes sugerem classificar a HPN em 3 categorias, levando-se em consideração as manifestações clínicas (hemólise ou hipoplasia medular) e a porcentagem de células HPN detectadas pela citometria de fluxo (Tabela 2). (Parker, Omine et al. 2005; Parker 2009) Esta classificação parece implicada no prognóstico dos pacientes, segundo dados de estudo do grupo Francês. (de Latour, Mary et al. 2008)

**Tabela 2** – Proposta de classificação da HPN, segundo Parker, Omine et al. 2005 .

<b>Categoria</b>	<b>Taxa de hemólise</b>	<b>Medula óssea</b>	<b>Expressão das proteínas GPI por FACS</b>
Clássica	Grande (hemoglobinúria macroscópica freqüente)	Celular com Hiperplasia eritróide e morfologia praticamente normal	População grande (> 50%) de células negativas
HPN no contexto de outra doença de medula óssea	Leve a moderada (hemoglobinúria macroscópica ausente ou intermitente)	Evidência de falência medular concomitante	Variável, em geral relativamente pequena (< 30%) de células negativas
Subclínica	Ausência de evidência clínica ou laboratorial de hemólise	Evidência de falência medular concomitante	Pequena (<1%) de células negativas

*Legenda:*

*GPI: glicosil fosfatidil inositol*

*FACS: citometria de fluxo*

## **Diagnóstico Diferencial**

O diagnóstico inicial pode ser difícil pelas manifestações heteromorfas da doença, que podem simular outras doenças hematológicas como descrito na Tabela 3. É importante ressaltar que mais de 20% dos indivíduos portadores de SMD e de Anemia Aplástica podem evoluir com clone HPN. (Socie, Mary et al. 1996; Parker 2009)

O diagnóstico de HPN é sugestivo quando os pacientes se apresentarem com pancitopenia, particularmente se acompanhada de reticulocitose, nos casos de anemia hemolítica com teste de Coombs negativo e nos de trombozes venosas.(Conrad and Barton 1979; Beutler 2005)

## **Tratamento**

O tratamento, na maioria das vezes, é de suporte. A transfusão de glóbulos vermelhos, quando indicada, deve ser com hemácias lavadas para evitar a transfusão de complemento do plasma.(Beutler 2005)

Pacientes com HPN podem ser ferropênicos, pela perda constante de ferro na urina (hemossiderinúria e hemoglobinúria). Assim, em muitos pacientes é necessária a reposição deste elemento, já que a deficiência de ferro limita a eritropoese. Além disso, recomenda-se também a reposição de folatos, que são espoliados pela eritropoese aumentada secundária à hemólise crônica. (Parker, Omine et al. 2005)

A associação entre hemólise contínua e hematopoese ineficaz pode levar à dependência transfusional. Além de aumentar a concentração de hemoglobina,

transfusões podem reduzir a hemólise a partir da supressão da eritropoese. (Brodsky 2009)

**Tabela 3 – Diagnósticos Diferenciais da HPN**

<b>Diagnóstico</b>	<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Evolução</b>
Hemoglobinúria paroxística noturna	Variáveis	Hemoglobinúria + Teste de Ham + Teste da Sacarose + Imunofenotipagem: alterada BMO: normocelular DHL ↑ Teste de Coombs –	Insidiosa, hemólise + tromboses +
Anemia aplástica	Secundárias às citopenias	BMO: hipocelular Teste de Ham – Teste da sacarose – Imunofenotipagem: normal	Grave se não instituído tratamento
Síndromes mielodisplásicas	Variáveis	Medula óssea: alterações displásicas Citogenética alterada	Insidiosa, pode evoluir para LMA
Anemia hemolítica auto-imune	Hemólise extravascular	Teste de Coombs + DHL ↑ Hemoglobinúria –	Nas manifestações agudas pode ocorrer episódio fatal se não instituído tratamento

*Legenda:*

*BM = biópsia de medula óssea*

*LMA = leucemia mielóide aguda*

*– = ausente*

*DHL = desidrogenase láctica*

*+ = presente*

*↑ = aumentado*

Apesar de toda a tecnologia envolvida nos processos de hemoterapia da atualidade, com a crescente preocupação em evitar as principais complicações transfusionais, incluídas aí as infecções crônicas passíveis de transmissão pelo sangue, hemotransfusão ainda é um procedimento de risco. Assim, o ideal é restringir as transfusões ao mínimo necessário. (Parker, Omine et al. 2005)

Anticoagulação pode ser indicada profilaticamente para pacientes com grandes clones HPN e outros fatores de risco para complicações trombóticas. Por outro lado, pacientes que já apresentaram um evento tromboembólico deverão ser anticoagulados por toda a vida, ou enquanto apresentarem evidência da persistência do clone HPN, (Parker, Omine et al. 2005)

O único tratamento curativo para HPN é o transplante de células tronco hematopoéticas alogênico (TCTHa) que pode ser mieloablativo ou não mieloablativo. (Brodsky 2008) As recomendações de transplante alogênico em razão da nova terapia disponível (Eculizumab), seriam para pacientes com citopenias que ameacem a vida e possivelmente, os raros pacientes com hemólise importante ou trombose que não é controlada pelo Eculizumab.(Brodsky 2009) Infelizmente a maior parte dos pacientes não são candidatos à TCTHa, ou por não terem condições clínicas de serem submetidos ao procedimento, ou pela ausência de um doador. Pacientes mais jovens, geralmente com menos de 55 anos e com doador HLA idêntico são os melhores candidatos. (Brodsky 2008)

Como este é um procedimento de risco, indica-se transplante apenas para os pacientes sujeitos aos fatores de risco de pior evolução de doença, especialmente aqueles sob risco aumentado de morrer pela HPN. No entanto, pelo fato da doença não ter um curso definido de progressão, inclusive com possibilidade de remissão



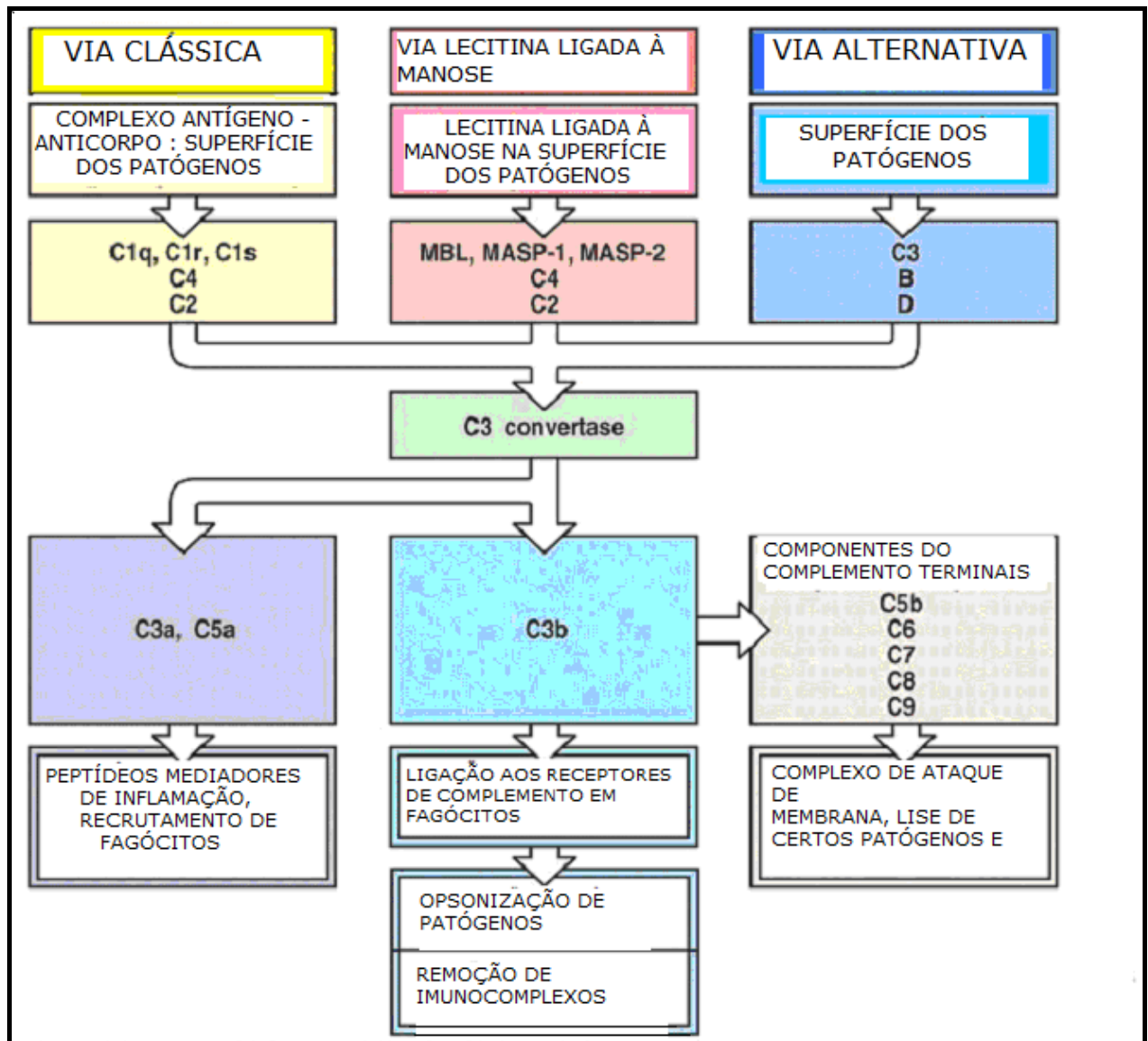
espontânea, (Hillmen, Lewis et al. 1995; Socie, Mary et al. 1996) sempre há dúvidas em relação às indicações e ao melhor momento para realizá-lo. (Parker, Omine et al. 2005)

Até recentemente não se conhecia tratamento eficaz que bloqueasse a hemólise crônica ou reduzisse os sintomas em pacientes com HPN. Os tratamentos disponíveis eram primariamente de suporte. As demais opções eram limitadas, com índice terapêutico desfavorável e resultados insatisfatórios, além de taxas de respostas ruins ou altos perfis de toxicidade. (Brodsky, Young et al. 2008)

Os corticosteróides e os andrógenos, ainda utilizados no tratamento da HPN, não têm comprovação de eficácia clínica que contrabalance os riscos associados a estas terapêuticas. (Parker, Omine et al. 2005) Os hormônios esteróides (androgênios) tem algum benefício em aumentar os níveis de hemoglobina. A prednisona parece ser útil na redução das necessidades transfusionais, porém seu uso é controverso pelos efeitos colaterais.(Beutler 2005)

Existem estudos recentes indicando que o uso de anticorpos monoclonais para inibir a cascata do complemento, reduz a hemoglobinúria, hemólise e necessidades transfusionais. Eculizumab é um anticorpo quimérico humanizado contra C5 do complemento, e concluiu estudo fase 3 com resultados promissores. (Brodsky, Young et al. 2008) A cascata do Complemento e suas vias estão mostradas na figura 5.

**Figura 5** – Cascata do Complemento, traduzido de Reeves 2005 .



O Eculizumab já foi avaliado em dois estudos fase III, o estudo TRIUMPH (Hillmen, Young et al. 2006), multicêntrico, internacional, duplo-cego, randomizado e no ensaio SHEPHERD, (Brodsky, Young et al. 2008) *open label*, não controlado. TRIUMPH demonstrou que o eculizumab é capaz de estabilizar os níveis de hemoglobina e reduzir as necessidades transfusionais em pacientes com HPN clássica. Foram incluídos 87 pacientes, com necessidade transfusional de no mínimo

4 unidades de concentrados de hemácias no ano anterior ao do estudo, com DHL de pelo menos 1,5 o limite superior do normal e contagem plaquetária maior que  $100 \times 10^9/L$ . Eles foram randomizados para receber placebo (N = 44) ou eculizumab (N = 43) na dose de 600 mg/semana por 4 semanas, 900 mg/semana por uma semana e 900 mg a cada duas semanas por 6 meses. A estabilização da hemoglobina ocorreu em 48,8% dos pacientes no grupo eculizumab e 0% no grupo placebo ( $p < 0,001$ ). A mediana de unidades de concentrados de hemácias foi de 0 no grupo eculizumab e 10 no grupo placebo ( $p = 0,001$ ). O grupo eculizumab também apresentou melhora significativa em índices que medem qualidade de vida e redução dos níveis de DHL. Os efeitos adversos mais comuns observados no grupo eculizumab foram cefaléia, nasofaringite, dor lombar e infecções do trato respiratório superior. Esses resultados encorajadores podem indicar em um futuro próximo, o uso de Eculizumab para terapia de escolha para os pacientes com manifestações predominantemente hemolíticas, com grandes clones HPN ou com trombooses de repetição. Deve-se proceder à vacinação para Meningococo, já que alguns casos de infecções graves foram relatados durante o uso do medicamento. (Brodsky, Young et al. 2008)

### **Curso e Prognóstico**

Segundo estudo do grupo francês revisando 460 pacientes diagnosticados de 1950 a 2005, a média de sobrevida após o diagnóstico é de  $22 \pm 2,5$  anos. A HPN está diretamente implicada como causa de morte em aproximadamente metade dos pacientes, sendo a trombose venosa a causa mais comum de morte e as citopenias a segunda. (de Latour, Mary et al. 2008)

Durante a evolução da doença, os pacientes têm 10 a 20% de chance de desenvolver anemia aplástica. As complicações da falência medular, principalmente sangramentos e infecções recorrentes, também são freqüentes causas de morbidade e mortalidade nestes pacientes. Cerca de 10 a 15% podem apresentar remissão espontânea. (Dacie and Lewis 1972)

## **CASUÍSTICA**

Foram estudados 16 pacientes em acompanhamento nos seguintes Serviços (Tabela 4):

- Ambulatório de Anemias Adquiridas da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP/ EPM/ Hospital São Paulo: 6 pacientes;
- Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Sandra Guallandro: 10 pacientes;

Todos os pacientes tiveram seu diagnóstico firmado por Citometria de Fluxo para CD55 e CD59.

Foram também realizadas citometrias de 10 indivíduos saudáveis, sem doença hematológica, considerados como grupo controle.

Pacientes e controles concordaram em participar deste estudo e assinaram o termo de consentimento aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa das respectivas instituições.

**Tabela 4** – Relação dos pacientes estudados, seu serviço de origem, idade e gênero.

	<b>PACIENTE</b>	<b>SERVIÇO DE ORIGEM</b>	<b>IDADE ATUAL (anos)</b>	<b>SEXO</b>
1	AJGB	UNIFESP	43	M
2	AMS	SHHC	37	F
3	APL	SHHC	27	F
4	CAL	UNIFESP	43	F
5	CGA	SHHC	37	M
6	CFF	UNIFESP	55	F
7	FJFL	SHHC	71	F
8	JMV	SHHC	67	M
9	KS	SHHC	69	F
10	KY	SHHC	62	M
11	MCFLB	UNIFESP	43	F
12	NRS	SHHC	54	M
13	OSP	UNIFESP	24	M
14	RAF	SHHC	22	F
15	RSG	SHHC	22	F
16	RA	UNIFESP	30	F

*Legenda:*

*UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo*

*SHHC: Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da USP*

## **MÉTODOS**

### **Coleta de Amostras**

Após expressa concordância dos pacientes, foi colhido amostra de sangue por punção venosa periférica, em tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) a 10% como anticoagulante para realização da citometria de fluxo.

### **Citometria de Fluxo para Diagnóstico de HPN**

A citometria de fluxo foi realizada com o objetivo de identificar a deficiência de proteínas de membrana ligadas ao GPI em hemácias, granulócitos e monócitos. O diagnóstico de HPN foi considerado positivo quando o paciente apresentou expressão diminuída de pelo menos dois antígenos em uma mesma célula (hemácia, granulócito ou monócito). (Richards, Rawstron et al. 2000)

As amostras de sangue periférico foram colhidas com EDTA como anticoagulante. Para a análise em hemácias, utilizou-se diluição de  $10 \times 10^6$  hemácias/mL em PBS azida e para os leucócitos, foi utilizado 100  $\mu$ l de sangue total.

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados com os seguintes fluorocromos: Ficoeritrina (PE), Isotiocianato de Fluoreceína (FITC), Peridina clorofila (Per CP). Analisou-se as expressões dos seguintes AcMo: CD55 (PharMingen) em eritrócitos e granulócitos, CD59 (PharMingen) em eritrócitos e granulócitos, CD66b (Immunotech) em granulócitos e CD14 (B-D) em monócitos.

O material foi inicialmente incubado com os anticorpos conjugados por 15 minutos ao abrigo de luz e, a seguir, nos tubos para a análise em granulócitos, procedeu-se à lise das hemácias com 2 ml de solução de FACS Lysing por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a lavagem em PBS azida e as células foram fixadas em formaldeído a 1% em PBS.

### **Aquisição e análise das amostras**

A aquisição e análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Systems, São José, CA), utilizando-se o programa Cell-Quest (Becton Dickinson). A calibração e a compensação da fluorescência foi realizada através de Calibrite beads (Becton Dickinson, São José, CA). Em todos os casos foram utilizados imunoglobulinas controles isotipos negativos, sem reatividade para a população de células em análise.

Nos pacientes com deficiência protéica sugestiva de HPN, utilizou-se a marcação de CD59 em eritrócitos para classificação do tipo de deficiência (HPN tipo I, tipo II ou tipo III), segundo critérios já bem definidos.(Hillmen and Richards 2000; Richards, Rawstron et al. 2000)



## **Estudo da expressão do Fas e FasL, através da citometria de fluxo**

Foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados diretamente para identificação das populações HPN, conforme descrito anteriormente. A expressão do Fas e do FasL, foi realizada em neutrófilos (população CD59+ e CD59-; PharMingen) e em monócitos (população CD14+ e CD14-; B-D)

Para cada tubo foram adicionados 100  $\mu$ L de sangue total. Inicialmente, procedeu-se a realização do método indireto, marcando-se as células com o anticorpo biotilado (anti-FasL, Pharmigem), acrescido de streptavidina conjugada com PE (tabela 5: tubo 5). Após lavagem com PBS para retirar o excesso do anticorpo biotilado, foram acrescidos os AcMo conjugados (CD59/FITC, CD33/PerCP, CD14/APC). Após incubação de 15 minutos, as hemácias foram lisadas, incubando-se com *Facs Lysing solution* por 10 minutos, e as células foram fixadas com 500  $\mu$ L de solução de formaldeído.

Para o estudo da expressão do Fas (CD95, Pharmigem), foram utilizados AcMo conjugados (método direto): CD95/PE, CD59/FITC, CD33/PerCP, CD14/APC, conformemostrado na tabela 5 (tubo 3). Foram utilizados anticorpos isotipos (IgG) (tubo 1) para controle negativo e controles de ajuste do citômetro (tubos 2 e 4).

### **Aquisição e análise dos dados**

A aquisição e análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, São José, CA), utilizando-se o programa Cell-Quest (Becton Dickinson), da mesma forma descrita no item Diagnóstico de HPN

**Tabela 5** – Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios para determinação da expressão de Fas/FasL.

	<b>Sangue total</b>	<b>FITC</b>	<b>PE ou Streptavidina-PE</b>	<b>PerCP</b>	<b>APC</b>
TUBO 1	100 µL	IgG 1	IgG 1	IgG 1	IgG 1
TUBO 2	100 µL	Anti-CD4	Anti-CD19	Anti-CD3	Anti-CD8
TUBO 3	100 µL	Anti-CD59	Anti-CD95	Anti-CD33	Anti-CD14
TUBO 4	100 µL	Anti-CD4	IgG 1 biotinilado	Anti-CD3	Anti-CD8
TUBO 5	100 µL	Anti-CD59	Anti-FasL biotinilado	Anti-CD33	Anti-CD14

*Legenda:*

*IgG1: Isotipo IgG controle*

*PE: ficoeritrina*

*FITC: isoticianato de fluoresceína*

*PerCP: peridina clorofila*

*APC: alo-fiocianina*

## **Análise Estatística**

Para a análise dos resultados foram utilizados testes não paramétricos, levando-se em conta a variabilidade e a natureza da distribuição das variáveis estudadas. Os testes utilizados foram:

Teste de Mann Whitney para duas amostras independentes com a finalidade de comparar os dados nos diferentes grupos estudados.

Análise de variância por postos de Kruskal-Wallis, com o objetivo de comparar mais de duas amostras em relação às variáveis estudadas (controle *vs* HPN+ *vs* HPN-). Quando mostrou diferença significativa, foi complementada pelo teste de Dunn.

Wilcoxon foi utilizado para análise de variância de dados pareados (células HPN+ *vs* HPN-).

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ( $\alpha \leq 0,05$ ) o nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

Os testes foram calculados utilizando-se o programa *Instat-2 software* (Graphpad®, São Diego, CA, USA).

## RESULTADOS

Foram estudados 16 indivíduos com diagnóstico de HPN realizado no período de 1981 a 2007. A maioria (11, 68%) destes teve seu diagnóstico realizado por teste de Ham, devido ao longo tempo de diagnóstico, complementado em 100% dos casos por citometria de fluxo.

A média de tempo de diagnóstico foi de  $13,4 \pm 8,4$  anos. Seis pacientes (37,5%) pertenciam ao gênero masculino e 10 (62,5%) ao feminino. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 30 anos (16-66 anos; média  $33,2 \pm 14,47$ ) (Tabela 6).

O grupo controle foi constituído por 10 voluntários sadios, sendo 3 (30%) do gênero masculino e 7 (70%) do feminino. A mediana de idade destes indivíduos foi de 37 anos (26-54 anos;  $39,6 \pm 10,7$ ) (Tabela A1 no anexo). Este grupo não diferiu significativamente do grupo de pacientes ( $p=0,14$ , Mann-Whitney).

Na Tabela 7 estão relacionados os dados de hemograma, ao diagnóstico e atual. Embora possamos observar diferenças evidentes nos exames de cada paciente quando comparados os dados de diagnóstico com os dados atuais, a análise estatística destes dados não mostrou significância, como pode ser observado na Tabela 8.

**Tabela 6** – Apresentação dos dados clínicos dos pacientes

<b>IDENTI-FICAÇÃO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE DIAGN.</b>	<b>ANO DIAGN.</b>	<b>MANIFESTAÇÃO INICIAL</b>
1 - AJGB	M	21	1985	Hemoglobinúria
2 - AMS	F	22	1992	Anemia Aplástica Grave
3 - APL	F	27	2009	Anemia Aplástica
4 - CAL	F	30	1994	Hemoglobinúria
5 - CGA	M	37	2009	Anemia Aplástica
6 - CFF	F	39	1993	Hemoglobinúria
7 - FJFL	F	66	2002	ARSA
8 - JMV	M	48	1988	Anemia Aplástica
9 - KS	F	43	1984	Hemoglobinúria / Dor Abdominal
10 - KY	M	39	1981	Hemoglobinúria
11 - MCFLB	F	22	1986	Hemoglobinúria
12 - NRS	M	48	2001	Anemia Aplástica
13 - OSP	M	19	1991	Anemia Aplástica Grave
14 - RAF	F	16	2001	Hemoglobinúria
15 - RSG	F	22	2007	Tromboses repetição
16 - RA	F	30	2007	Hemoglobinúria

*Legenda:*

*DIAGN. = diagnóstico*

*ARSA = anemia refratária com sideroblastos em anel*

**Tabela 7** – Dados de hemograma, ao diagnóstico e atual, de cada paciente analisado.

IDENT		Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	GB (x10 <sup>9</sup> )	NEUT (%)	NEUT_abs (x10 <sup>9</sup> )	PLAQ (x10 <sup>9</sup> )
1	diag	9,2	29,0	90	4,7	63	2,96	180
	atual	12,3	37,5	85	5,7	60	3,42	197
2	diag	9,3	28,0	88	1,9	11	0,21	61
	atual	8,2	25,4	98	4,3	30	1,29	152
3	diag	4,1	12,4	86,7	0,73	62	0,5	5
	atual	8,4	27,9	83	5,6	51	2,86	285
4	diag	3,3	10,0		2,8	69	1,93	47
	atual	8,9	27,6	84	3,0	60	1,80	152
5	diag	7,7	22,5	110,8	5,0	27	1,4	40
	atual	8,1	26,2	93	4,3	46	1,99	396
6	diag	7,3	25,5		5,1	55	2,80	259
	atual	11,9	36,2	89	6,4	81	5,18	196
7	diag	8,4	29,1	91	3,7	20	0,74	72
	atual	6,6	19,6	91	2,8	5	0,14	70
8	diag	10,6	33,0	94	3,0	50	1,50	250
	atual	6,5	19,2	87	1,1	52	0,57	7
9	diag	5,5	19,2	125	3,4			80
	atual	7,2	22,6	113	2,4	63	1,51	113
10	diag	8,5	24,9	105	3,8	55	2,09	63
	atual	9,1	29,7	96	3,9	46	1,79	136
11	diag	9,6	33,0	91	5,5	62	3,41	172
	atual	14,0	41,9	93	3,9	36	1,42	166
12	diag	7,9	22,5	85	1,5	80	1,20	46
	atual	6,2	18,8	83	1,3	6	0,07	19
13	diag	5,8	17,0		3,8	48	1,82	94
	atual	5,5	14,8	122	9,4	80	7,52	129

<b>IDENT</b>		<b>Hb (g/dL)</b>	<b>Ht (%)</b>	<b>VCM (fL)</b>	<b>GB (x10<sup>9</sup>)</b>	<b>NEUT (%)</b>	<b>NEUT_abs (x10<sup>9</sup>)</b>	<b>PLAQ (x10<sup>9</sup>)</b>
14	diag	5,2	15,0	127	6,1	62	3,76	167
	atual	10,1	31,1	87	5,8	73	4,23	115
15	diag	8,5	28,4	99	4,5	42	1,88	195
	atual	11,0	34,7	92	10,7	70	7,54	245
16	diag	9,2	30,8	106	9,2	39	3,57	213
	atual	7,3	23,8	82	9,3	54	4,99	320

*Legenda:*

Diag No diagnóstico

*Ht* Hematócrito*GB* Glóbulos Brancos*NEUT\_abs* Contagem de Neutrófilos absoluta

IDENT Identificação

*Hb* Hemoglobina*VCM* Volume corpuscular Médio*NEUT* Neutrófilos*PLAQ* Plaquetas

**Tabela 8** – Dados de média  $\pm$  DP e de mediana (min-max) e estatística dos dados de hemogramas analisados

		<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>	<b>Mann-Whitney</b>
<b>Hb</b>	diag	7,5	2,1	8,2	3,3	10,6	0,327
	atual	8,8	2,4	8,3	5,5	14,0	
<b>Ht</b>	diag	23,8	7,2	25,2	33,0	10,0	0,309
	atual	27,3	7,6	26,9	14,8	41,9	
<b>VCM</b>	diag	99,9	14,1	94,0	85,0	127,0	0,096
	atual	92,4	11,0	90,0	82,0	122,0	
<b>GB</b>	diag	4,0	2,0	3,8	0,7	9,2	0,337
	atual	5,0	2,8	4,3	1,1	10,7	
<b>NEUT</b>	diag	49,7	19,0	55,0	11,0	80,0	0,859
	atual	50,8	22,7	53,0	5,0	81,0	
<b>NEUT_abs</b>	diag	1,98	1,12	1,88	0,21	3,76	0,520
	atual	2,90	2,39	1,90	0,07	7,54	
<b>PLAQ</b>	diag	121,5	81,9	87,0	5,0	259,0	0,254
	atual	168,6	104,2	152,0	7,0	396,0	

*Legenda:*

*Ht Hematócrito*

*GB Glóbulos Brancos*

*NEUT\_abs Neutrófilos contagem absoluta*

*Hb Hemoglobina*

*VCM Volume corpuscular médio*

*NEUT Neutrófilos*

*PLAQ Plaquetas*



Na tabela 9 estão descritos os tratamentos realizados e a evolução de cada um deles. Os resultados da citometria de fluxo realizada na coleta de dados deste estudo, confirmando a presença de células HPN, estão mostrados na Tabela 10.

Quanto aos resultados da análise de Fas e FasL eles foram mostrados em intensidade média de fluorescência (IMF). Para padronização da apresentação dos resultados, na análise de neutrófilos as células CD59+ do grupo controle foram identificadas no texto como 59+/GC, as CD59+ dos pacientes como 59+/PC e as células negativas do paciente para o CD59 como 59-/PC. Do mesmo modo, na análise dos monócitos denominamos 14+/GC, 14+/PC e 14-/PC.

Quando foi analisado os resultados dos neutrófilos marcados com CD59 (para identificação de células HPN+ e HPN-), alguns pacientes apresentaram expressão intermediária deste monoclonal na superfície celular, correspondendo às células HPN do tipo II. Na análise de Fas e FasL destes casos, a população HPN tipo II foi considerada como CD59- e, naqueles indivíduos que apresentaram 3 populações (CD59+, CD59- intermediária e CD59-) foi considerado, para efeito de análise estatística, a intensidade média de fluorescência (IMF) do maior clone negativo (CD59- intermediária ou CD59-), devido à dificuldade de se obter uma média de IMF em populações diferentes. Os dados completos de cada paciente podem ser encontrados no anexo (Tabelas A2 e A3).

**Tabela 9** – Evolução e tratamentos instituídos para cada paciente.

<b>Identificação</b>	<b>Evolução</b>	<b>Tratamento</b>
AJGB	Diagnóstico inicial de HPN. Crises recorrentes de hemólise.	Corticosteróides, Danazol e Transfusões
AMS	Diagnóstico inicial de AAG em 1992 e de HPN em 1993. Algumas crises hemolíticas.	ATG, CSA e Corticosteróides.
APL	Diagnóstico inicial de AA em 2008, HPN em 2009	ATG, CSA e Corticosteróides.
CAL	Diagnóstico inicial de HPN. IRA em 2007.	Corticosteróides, Transfusões.
CGA	Diagnóstico inicial de hipoplasia medular em 2002. Diagnostico de HPN em 2009	dnd
CFF	Diagnóstico inicial de HPN. Manifestações: hemoglobinúria, alterações hepáticas. Apresentou 2 abortos.	Transfusões ocasionais, corticosteróides.
FJFL	Diagnóstico inicial de ARSA e de HPN desde 2002. Hiperferritinemia em queelação.	Transfusões frequentes, desferoxamina.
JMV	Diagnóstico inicial de AA e de HPN em 1988. Infectado por Hepatite C.	dnd
KS	Diagnóstico inicial de HPN com manifestação hemolítica e dor abdominal. Evoluiu com alteração renal e sobrecarga de ferro e hepatite B.	Transfusões ocasionais, Corticosteróides.
KY	Diagnóstico inicial de HPN. Quadro de hemólises ocasionais. Evoluiu com hepatopatia por vírus C e Tuberculose Pleural.	Transfusões ocasionais.
MCFLB	Diagnóstico inicial de HPN com hemoglobinúria. Apresentou 4 abortos espontâneos. TVP em 2003.	Anticoagulação.
NRS	Diagnóstico inicial de AA e de HPN em 2003.	Transfusões ocasionais.
OSP	Diagnóstico inicial de AA e de HPN 1998. Em 2008 evoluiu com SMD. Insuficiência cardíaca.	ATG, CSA e Corticosteróides. Danazol, Transfusões

<b>Identificação</b>	<b>Evolução</b>	<b>Tratamento</b>
		frequentes.
RAF	Diagnóstico inicial de HPN com hemoglobinúria.	Anticoagulação profilática, Corticoesteróides, Transfusões ocasionais.
RSG	Diagnóstico inicial de HPN. Tromboses extensas em locais de acesso venoso. Repetição das tromboses na vigência de anticoagulação.	Anticoagulação, eculizumab desde set/09.
RA	Diagnóstico inicial de HPN. Após crise de hemólise maciça evoluiu com IRA e necessidade dialítica. Episódio de trombose em MIE.	Corticosteróides. Anticoagulação.

*Legenda:*

*AAG Anemia Aplástica Grave*

*ATG Globulina Anti-timocítica*

*IRA Insuficiência Renal Aguda*

*SMD Síndrome Mielodisplásica*

*ARSA Anemia Refratária com sideroblastos em anel*

*HPN Hemoglobinúria Paroxística Noturna*

*AA Anemia Aplástica*

*CSA Ciclosporina A*

*TVP TRrombose Venosa Profunda*

*Dnd dado não disponível*

Quando analisamos os resultados de IMF do Fas nos neutrófilos em relação à positividade para CD59, observamos que as células dos pacientes, 59+/PC e 59-/PC, apresentaram IMF maior que as 59+/GC (indivíduos normais) e que as células 59-/PC tiveram IMF maior que as 59+/PC. Estas diferenças, entretanto, não foram significantes ( $p=0,154$ ) (Tabela 11, Figura 6). Quando, neste mesmo grupo, foram comparados os dados de 59+/PC e 59-/PC de modo pareado, o resultado também não mostrou diferença estatística (Wilcoxon,  $p=0,278$ ).

**Tabela 10** – Análise de células negativas, em porcentagem, para cada anticorpo monoclonal analisado no momento deste estudo.

Identificação	Granulócitos (%)			Monócitos (%)	Eritrócitos (%)	
	CD66b	CD55	CD59	CD14	CD55	CD59
1	92,7	63,7	60,4	78,0	25,2	25,0
2		70,0	70,0			
3		84,6	87,1	75,9		
4	98,6	40,8	43,8	47,3	72,1	18,6
5			100,0	100,0		
6		87,1	86,4			
7		47,0	49,0	91,7		
8		91,0	90,0	98,0		
9		85,0	85,0	89,0	15,0	14,0
10		84,0	87,0	96,0	42,0	39,0
11	14,7	7,8	9,9	17,5	17,9	33,7
12			95,0	15,8		
13	97,1	88,4	89,2	92,1	41,1	57,9
14		93,0	96,0	100,0		
15		78,0	81,0	90,0	89,6	97,6
16	89,2	61,6	46,1	69,7	37,1	29,2

**TABELA 11** - Resultado do Fas (CD95), em intensidade média de imunofluorescência, nos neutrófilos de acordo com a expressão do CD59.

<b>59+/GC</b>		<b>59+/PC</b>		<b>59-/PC</b>	
<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>
100	346,8	18,4	206,6	81,1	284,5
100	245,3	0	*	99,3	191,6
100	158,3	68,3	166,9	30,6	194,7
100	142,1	0	*	99,6	297,5
100	155,8	15,3	103,9	84,7	125,2
100	244,3	0	*	100	363,4
100	170,5	69,2	177,7	30,2	221,7
100	219,4	0	*	79,9	199,5
100	171,6	5,3	285,5	94,7	302,1
100	172,4	1,1	197,3	98,9	207,1
		92,6	146,6	5,7	185,4
		4,9	190,3	83,2	205,5
		11,9	343,5	87,5	300,6
		0	*	100	298,6
		3,8	252,1	96,2	228,6
		3,8	392,8	67,9	367,6
<b>Média</b>	202,7		223,9		248,3
<b>± DP</b>	62,7		86,8		69,1
<b>Mediana</b>	171,9		197,3		225,2
<b>Valor mínimo</b>	142,1		103,9		125,2
<b>Valor máximo</b>	346,8		392,8		367,6
<b>Kruskal Wallis</b>	<b>p=0,154</b>				

Legenda: DP = desvio padrão

59+/PC = células CD59+ nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

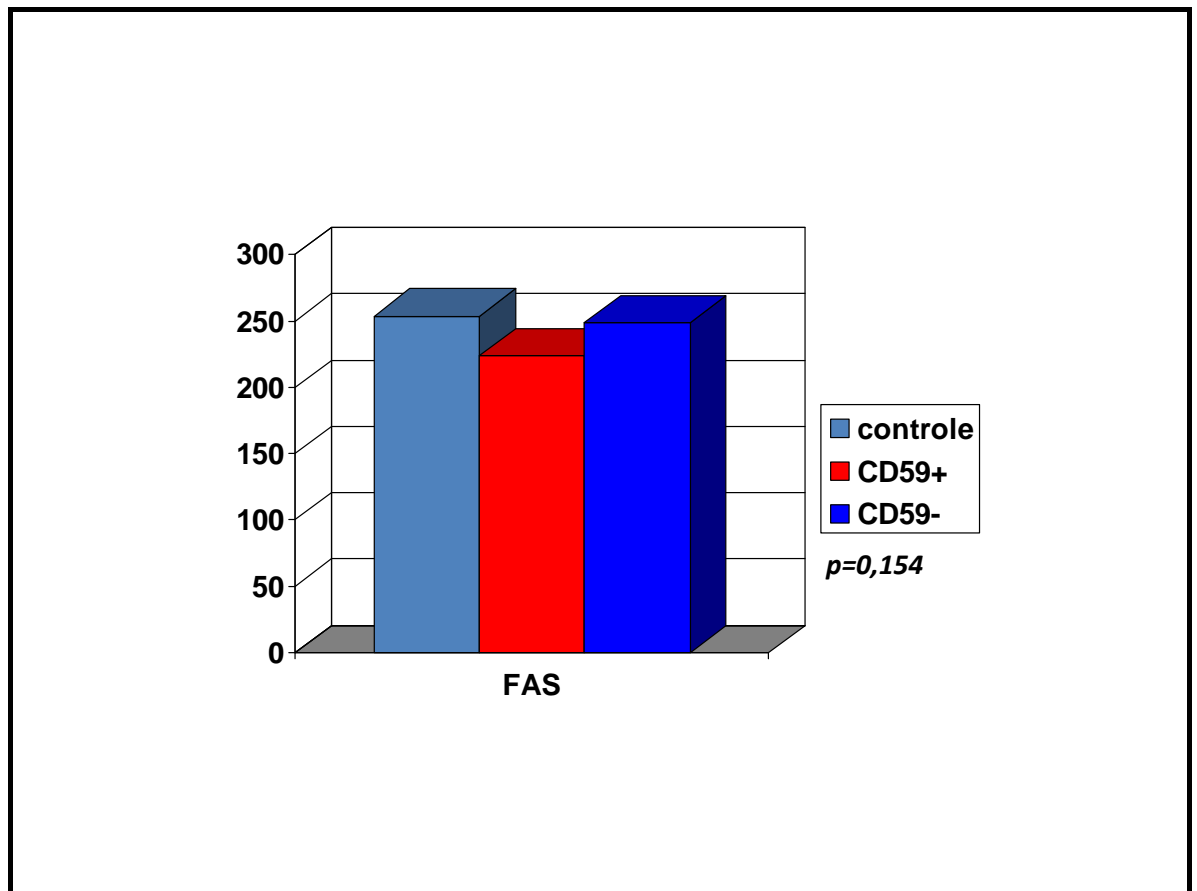
IMF = intensidade média de fluorescência do CD95

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

59+/GC = células CD59+ no grupo controle

59-/PC = células CD59- nos pacientes

**Figura 6** - Representação gráfica dos resultados da média da intensidade média de imunofluorescência do Fas em neutrófilos



Da mesma maneira, a IMF do Fas em monócitos mostra-se aumentada nas células 14-/PC em relação às 14+/PC e 14+/GC, assim como as células 14+/PC tiveram maior IMF do que as 14+/GC, porém não houve diferença significativa nesta análise. Nesta avaliação foram excluídos 3 indivíduos: 2 por falha no procedimento e 1 que teve seu experimento realizado com CD59. (Tabela 12 e Figura 7). A análise dos dados pareando os resultados também não mostrou significância. (Wilcoxon,  $p=0,898$ ).

**TABELA 12** - Resultado do Fas (CD95), em intensidade média de imunofluorescência, nos monócitos de acordo com a expressão do CD14.

<b>14+/GC</b>		<b>14+/PC</b>		<b>14-/PC</b>	
<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>
100	142,5	16,0	339,9	83,3	376,7
100	315,7	19,4	251,7	77,9	234,3
100	198,8	65,9	274,0	33,1	242,1
100	222,9	0,1	295,4	99,9	289,2
100	333,1	9,6	199,7	90,1	206,5
100	274,8	0	*	100	533,2
100	265,4	0,9	320,1	98,9	328,7
100	299,22	0,8	230,1	99,1	244,1
100	219,9	2,5	300,3	97,5	298,9
100	264,4	0,6	245,9	99,2	253,5
		84,2	203,7	15,8	177,8
		0	*	100	462,7
		2,4	288,2	97,3	280,2
<b>Média</b>	253,7		268,1		302,1
<b>± DP</b>	58,1		45,9		101,9
<b>Mediana</b>	264,9		274,0		280,2
<b>Valor mínimo</b>	142,5		199,7		177,8
<b>Valor máximo</b>	295,2		339,9		533,2
<b>Kruskal Wallis</b>	<b>p=0,644</b>				

Legenda: DP = desvio padrão

14+/PC = células CD14+ nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

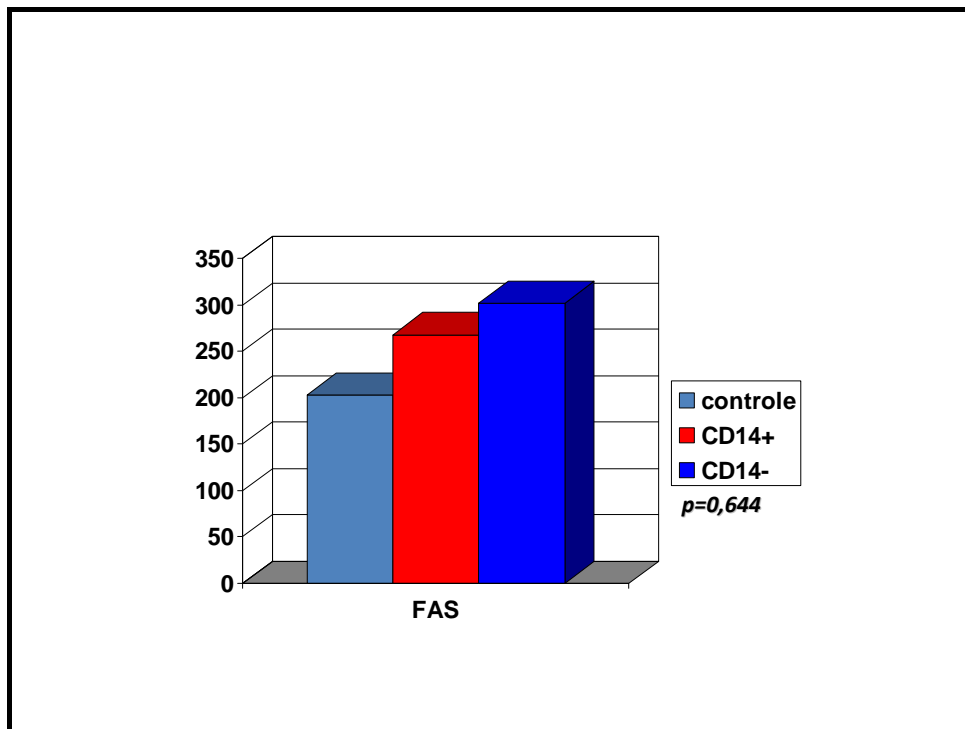
IMF = intensidade média de fluorescência do CD95

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

14+/GC = células CD14+ no grupo controle

14-/PC = células CD14- nos pacientes

**Figura 7** - Representação gráfica dos resultados da média da intensidade média de imunofluorescência do Fas em monócitos



A análise dos resultados de IMF do FasL nos neutrófilos mostrou diferença significativa entre as 3 populações 59+/GC, 59+/PC e 59-/PC ( $p=0,003$ ) (Tabela 13 e Figura 8). Esta análise mostrou que a IMF das células 59+/PC foi significativamente maior que a das 59-/PC (Mann-Whitney,  $p=0,008$ ). Nesta análise foi excluído 1 paciente cujo exame foi realizado com CD55. A análise pareada também foi significativa (Wilcoxon,  $p=0,014$ ).



**TABELA 13** - Resultado do FasL, em intensidade média de imunofluorescência, nos neutrófilos de acordo com a expressão do CD59.

<b>59+/GC</b>		<b>59+/PC</b>		<b>59-/PC</b>	
<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>
100	11,9	15,5	19,4	73,3	20,1
100	18,9	0	*	100	27,1
100	30,6	60,2	23,9	39,8	17,4
100	26,9	17,0	148,1	82,9	27,4
100	18,5	14,2	23,3	85,8	20,4
100	58,9	0	*	100	16,2
100	15,9	100,0	48,7	0	*
100	16,5	21,2	106,6	78,8	17,5
100	25,5	5,1	25,5	94,9	28,2
100	64,6	1,1	17,2	98,9	19,6
		91,8	43,1	8,2	21,3
		91,8	31,5	7,9	19,4
		0	*	100	26,1
		4,0	58,0	95,9	21,1
		13,1	43,2	85,8	31,9
<b>Média</b>	28,9		49,1		22,4
<b>± DP</b>	18,3		37,9		4,8
<b>Mediana</b>	22,3		37,3		20,7
<b>Valor mínimo</b>	11,9		17,2		16,2
<b>Valor máximo</b>	64,58		148,1		31,9
<b>Kruskal Wallis</b>	<b>p=0,003*</b>				

Legenda: DP = desvio padrão

59+/PC = células CD59+ nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

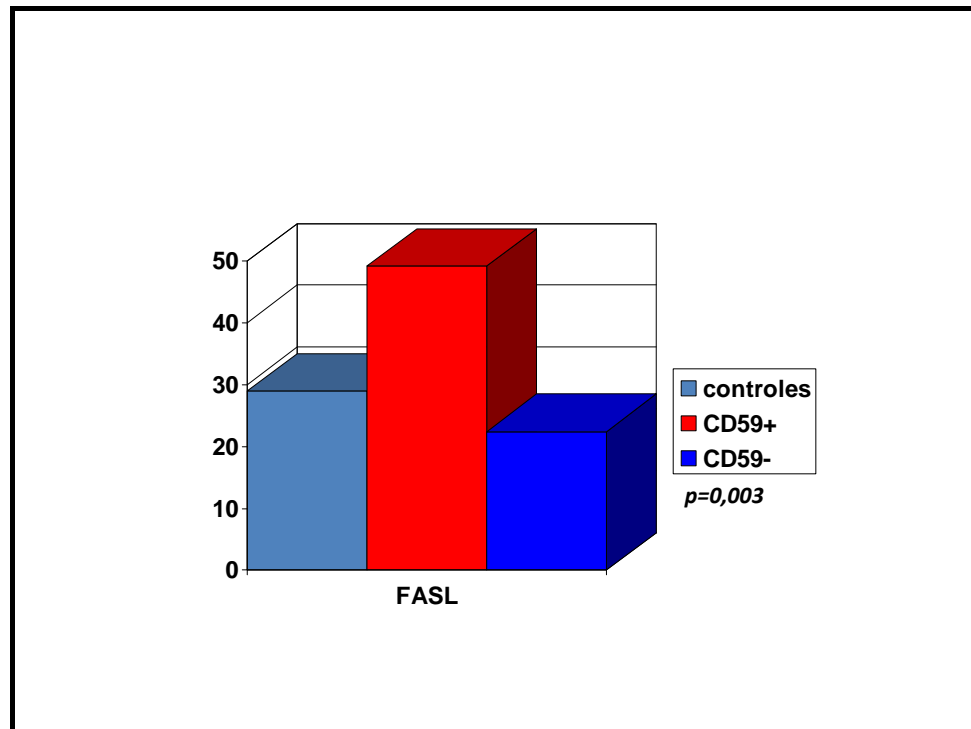
IMF = intensidade média de fluorescência do FasL

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

59+/GC = células CD59+ no grupo controle

59-/PC = células CD59- nos pacientes

**Figura 8** - Representação gráfica dos resultados da média da intensidade média de imunofluorescência do FasL em neutrófilos.



Já a análise de IMF para o FasL em monócitos não mostrou resultado significativo quando analisados em comparação ao grupo controle (Tabela 14 e Figura 9) nem quando analisados os resultados pareados por paciente (Wilcoxon,  $p=0,193$ ). Nesta análise foi excluído 1 paciente por problemas técnicos e 1 paciente cujo exame foi realizado com CD55.

**TABELA 14** - Resultado do FasL, em intensidade média de imunofluorescência, nos monócitos de acordo com a expressão do CD14.

<b>14+ /GC</b>		<b>14+ /PC</b>		<b>14- /PC</b>	
<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>	<b>%</b>	<b>IMF</b>
100	23,7	16,4	31,9	83,6	32,2
100	31,1	20,4	56,3	78,2	35,9
100	45,6	68,5	36,9	31,1	33,8
100	37,7	0,2	51,8	99,8	36,3
100	40,1	8,6	36,8	91,2	34,8
100	61,4	0	*	100	28,5
100	23,5	100	46,5	0	*
100	34,6	0,6	27,4	99,4	34,5
100	36,1	2,6	53,9	97,4	44,4
100	64,4	0,5	53,1	99,4	50,5
		100	37,9	0	*
		2,9	42,9	96,9	50,1
		0	*	100	39,0
		2,1	50,1	97,8	43,9
<b>Média</b>	39,8		43,8		38,7
<b>± DP</b>	13,9		9,5		7,0
<b>Mediana</b>	36,9		44,7		36,1
<b>Valor mínimo</b>	23,4		27,4		28,5
<b>Valor máximo</b>	64,4		56,3		50,5
<b>Kruskal Wallis</b>	<b>p=0,315</b>				

Legenda: DP = desvio padrão

14+ /PC = células CD14+ nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

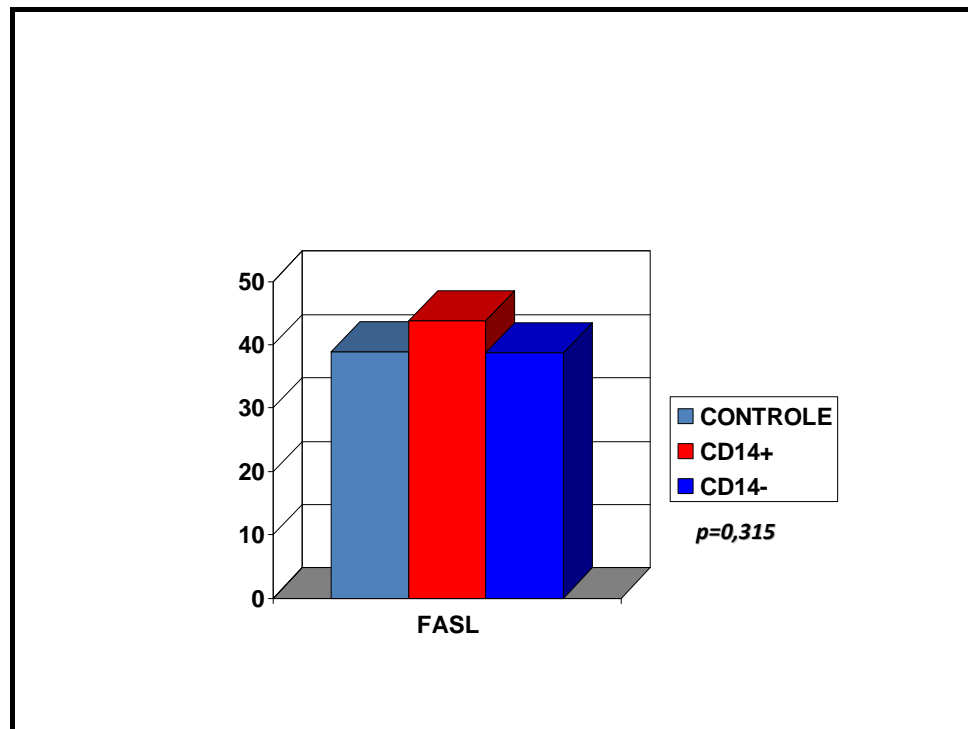
IMF = intensidade média de fluorescência do FasL

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

14+ /GC = células CD14+ no grupo controle

14- /PC = células CD14- nos pacientes

**Figura 9** - Representação gráfica dos resultados da média da intensidade média de imunofluorescência do FasL em monócitos



Quanto à avaliação clínica, utilizamos a classificação da HPN para dividir os pacientes em 2 grupos: HPN clássica e HPN no contexto de falência medular associada, já que os casos subclínicos não foram incluídos neste estudo. Os dados de IMF foram então comparados entre estes grupos.

Para realizar esta classificação, partimos, principalmente, da história clínica do doente. Como pode ser observado no texto de Parker (Parker, Omine et al. 2005) a porcentagem de células HPN no grupo relacionado a outra doença medular é variável, embora em geral seja menor que 30%. Nos pacientes analisados com história de doença medular associada, a maioria apresentava, no momento deste estudo, população HPN superior a 50%. Vale ressaltar que a única paciente com

população menor que 30% (paciente 11), manifestou doença hemolítica no seu início, sem indícios de outra doença medular associada e vem evoluindo com melhora clínica e diminuição do clone HPN.

Portanto, foram considerados como pertencentes ao grupo HPN clássico os indivíduos: 1, 4, 6, 9, 10, 11, 14, 15 e 16. O grupo de HPN no contexto de falência medular associada foi constituído pelos seguintes pacientes: 2, 3, 5, 7, 8, 12 e 13.

Quando avaliamos os dados destes indivíduos separadamente, observamos que no grupo de HPN clássica 7 eram do gênero feminino e 2 do masculino, por sua vez, no grupo com HPN e falência medular associada eram 3 do gênero feminino e 4 do masculino (Tabelas 15 e 16).

A idade ao diagnóstico foi semelhante nos dois grupos assim como o tempo de evolução (Tabelas 17 e 18, respectivamente).

**Tabela 15**– Dados clínicos dos pacientes com diagnóstico de HPN clássica.

<b>IDENTI-FICAÇÃO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE DIAGN.</b>	<b>ANO DIAGN.</b>	<b>MANIFESTAÇÃO INICIAL</b>
1	M	21	1985	Hemoglobinúria
4	F	30	1994	Hemoglobinúria
6	F	39	1993	Hemoglobinúria
9	F	43	1984	Hemoglobinúria / Dor Abdominal
10	M	39	1981	Hemoglobinúria
11	F	22	1986	Hemoglobinúria
14	F	16	2001	Hemoglobinúria
15	F	22	2007	Tromboses repetição
16	F	30	2007	Hemoglobinúria

**Tabela 16**– Dados clínicos dos pacientes com diagnóstico de HPN no contexto de falência medular associada.

<b>IDENTI-FICAÇÃO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE DIAGN.</b>	<b>ANO DIAGN.</b>	<b>MANIFESTAÇÃO INICIAL</b>
2	F	22	1992	Anemia Aplástica Grave
3	F	27	2009	Anemia Aplástica
5	M	37	2009	Anemia Aplástica
7	F	66	2002	ARSA
8	M	48	1988	Anemia Aplástica
12	M	48	2001	Anemia Aplástica
13	M	19	1991	Anemia Aplástica Grave

**Tabela 17** – Análise estatística da idade de diagnóstico do grupo com HPN clássica em comparação com o grupo de HPN e falência medular.

<b>Idade (anos)</b>	<b>HPN clássica</b>	<b>HPN + falência medular</b>
Média	29,1	38,1
± DP	9,5	16,9
Mediana	30,0	37,0
Valor mínimo	16,0	19,0
Valor máximo	43,0	66,0
Mann-Whitney	p=0,341	

**Tabela 18** – Análise estatística do tempo de evolução da doença do grupo com HPN clássica em comparação com o grupo de HPN e falência medular.

<b>Tempo de evolução (anos)</b>	<b>HPN clássica</b>	<b>HPN + falência medular</b>
Média	15,9	10,4
± DP	9,9	8,2
Mediana	16,0	8,0
Valor mínimo	2,0	1,0
Valor máximo	28,0	21,0
Mann-Whitney	p=0,223	

Na avaliação dos dados hematológicos dos dois grupos: HPN clássica (HPN) e HPN com falência medular associada (HPN/FM), observamos algumas diferenças.

A hemoglobina sérica (Hb) apesar de apresentar níveis similares entre os 2 grupos ao diagnóstico ( $p=0,918$ ), ela foi significativamente menor nos pacientes com HPN/FM em relação aos indivíduos com HPN quando avaliamos os exames atuais ( $p=0,005$ ). Os pacientes com HPN apresentaram Hb significativamente menor no diagnóstico em relação ao exame atual ( $p=0,046$ ), enquanto que o grupo HPN/FM não mostrou diferença ( $p=0,565$ ) (Tabela 19). Embora a análise do hematócrito não tenha mostrado diferença estatística, foi visto tendência de menor hematócrito nos pacientes com HPN/FM em relação aos indivíduos com HPN nos exames atuais ( $p=0,007$ ) e hematócrito significativamente menor nos indivíduos HPN ao diagnóstico em relação ao exame atual ( $p=0,06$ ) (Tabela 20).

Nos dados de Volume Corpuscular Médio, observamos macrocitose evidente nos indivíduos com HPN clássica ao diagnóstico como observado na Tabela 21 ( $p=0,03$  em comparação com exames atuais e  $p=0,08$  quando comparado aos exames de diagnóstico do grupo HPN/FM).



**Tabela 19** – Dados de Hemoglobina sérica (g/dL) de acordo com a manifestação clínica.

Hemoglobina sérica (g/dL)	HPN clássica		HPN + falência medular	
	Diagnóstico	Atual	Diagnóstico	Atual
	9,2	12,3	9,3	8,2
	3,3	8,9	4,1	8,4
	7,3	11,9	7,7	8,1
	5,5	7,2	8,4	6,6
	8,5	9,1	10,6	6,5
	9,6	14,0	7,9	6,2
	5,2	10,1	5,8	5,5
	8,5	11,0		
	9,2	7,3		
<b>Média</b>	7,4	10,2	7,7	7,1
<b>± DP</b>	2,2	2,3	2,1	1,1
<b>Mediana</b>	8,5	10,1	7,9	6,6
<b>Valor mínimo</b>	3,3	7,2	4,1	5,5
<b>Valor máximo</b>	9,6	14,0	10,6	8,4
<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>p=0,046*</i></b>		<b><i>p =0,565</i></b>	
<b>HPN clássica vs</b>	<b>Diagnóstico</b>		<b><i>p=0,918</i></b>	
<b>HPN + falência medular</b>	<b>Atual</b>		<b><i>p=0,005*</i></b>	

**Tabela 20**– Dados de Hematócrito (%) de acordo com a manifestação clínica.

Hematócrito (%)	HPN clássica		HPN + falência medular	
	Diagnóstico	Atual	Diagnóstico	Atual
	29,0	37,5	28,0	25,4
	10,0	27,6	12,4	27,9
	25,5	36,2	22,5	26,2
	19,2	22,6	29,1	19,6
	24,9	29,7	33,0	19,2
	33,0	41,9	22,5	18,8
	15,0	31,1	17,0	14,8
	28,4	34,7		
	30,8	23,8		
<b>Média</b>	23,9	31,7	23,5	21,7
<b>± DP</b>	7,7	6,5	7,2	4,8
<b>Mediana</b>	25,5	31,1	22,5	19,6
<b>Valor mínimo</b>	10,0	22,6	12,4	14,8
<b>Valor máximo</b>	33,0	41,9	33,0	27,9
<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>p=0,06</i></b>		<b><i>p=0,535</i></b>	
<b>HPN clássica vs</b>		<b>Diagnóstico</b>	<b><i>p=0,873</i></b>	
<b>HPN + falência medular</b>		<b>Atual</b>	<b><i>p=0,007</i></b>	

**Tabela 21** – Dados de Volume Corpuscular Médio (VCM em fL) de acordo com a manifestação clínica.

VCM (fL)	HPN clássica		HPN + falência medular	
	Diagnóstico	Atual	Diagnóstico	Atual
	90	85	88	98
		84	87	83
		89	111	93
	125	113	91	91
	105	96	94	87
	91	93	85	83
	127	87		122
	99	92		
	106	82		
<b>Média</b>	106,1	91,2	92,7	93,9
<b>± DP</b>	14,9	9,4	9,5	13,5
<b>Mediana</b>	105,0	89,0	89,5	91,0
<b>Valor mínimo</b>	90,0	82,0	85,0	83,0
<b>Valor máximo</b>	127,0	113,0	111,0	122,0
<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>p=0,030*</i></b>		<b><i>p=0,943</i></b>	
<b>HPN clássica vs</b>		<b>Diagnóstico</b>	<b><i>p=0,080</i></b>	
<b>HPN + falência medular</b>		<b>Atual</b>	<b><i>p=0,832</i></b>	

Na avaliação da leucometria, a contagem de total de leucócitos foi significativamente menor no grupo com HPN/FM em comparação com o grupo HPN ao diagnóstico ( $p=0,03$ ), sem outras diferenças significantes, conforme observado na Tabela 22. A porcentagem de neutrófilos não diferiu significativamente quando comparados os dados do diagnóstico com os dados atuais dentro de cada grupo, Tabela 23. Observou-se, entretanto, uma tendência a menor porcentagem de neutrófilos nos exames atuais dos indivíduos com HPN/FM em relação aos pacientes HPN ( $p=0,064$ ). Já na análise de neutrófilos em número absoluto (Tabela 24), os neutrófilos encontram-se significativamente diminuídos ao diagnóstico no grupo com HPN/FM em comparação ao outro grupo ( $p=0,0003$ ).

Na avaliação da contagem plaquetária não foi vista diferença estatística, conforme observado na Tabela 25, embora os pacientes com HPN/FM tenham tido uma tendência a apresentar plaquetopenia ao diagnóstico em comparação ao grupo com HPN ( $p=0,071$ ).

**Tabela 22** – Dados de Contagem de Leucócitos ( $\times 10^9/L$ ) de acordo com a manifestação clínica.

Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	HPN clássica		HPN + falência medular	
	Diagnóstico	Atual	Diagnóstico	Atual
	4,7	5,7	1,9	4,3
	2,8	3,0	0,73	5,6
	5,1	6,4	5,0	4,3
	3,4	2,4	3,7	2,8
	3,8	3,9	3,0	1,1
	5,5	3,9	1,5	1,3
	6,1	5,8	3,8	9,4
	4,5	10,7		
	9,2	9,3		
<b>Média</b>	5,0	5,7	2,8	4,1
<b>± DP</b>	1,9	2,8	1,5	2,8
<b>Mediana</b>	4,7	5,7	3,0	4,3
<b>Valor mínimo</b>	2,8	2,4	0,73	1,1
<b>Valor máximo</b>	9,2	10,4	5,0	9,4
<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>p=0,605</i></b>		<b><i>p=0,456</i></b>	
<b>HPN clássica vs</b>		<b>Diagnóstico</b>	<b><i>p=0,030*</i></b>	
<b>HPN + falência medular</b>		<b>Atual</b>	<b><i>p=0,299</i></b>	

**Tabela 23** – Dados de Contagem de Neutrófilos (%) de acordo com a manifestação clínica.

Neutrófilos (%)	HPN clássica		HPN + falência medular	
	Diagnóstico	Atual	Diagnóstico	Atual
	63	60	11	30
	69	60	62	51
	55	81	27	46
		63	20	5
	55	46	50	52
	62	36	80	6
	62	73	48	80
	42	70		
	39	54		
<b>Média</b>	55,9	60,3	42,6	38,6
<b>± DP</b>	10,5	13,8	24,5	26,9
<b>Mediana</b>	58,5	60,0	48,0	46,0
<b>Valor mínimo</b>	39,0	36,0	11,0	5,0
<b>Valor máximo</b>	69,0	81,0	80,0	80,0
<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>p=0,564</i></b>		<b><i>p=0,848</i></b>	
<b>HPN clássica vs</b>		<b>Diagnóstico</b>	<b><i>p=0,224</i></b>	
<b>HPN + falência medular</b>		<b>Atual</b>	<b><i>p=0,064</i></b>	

**Tabela 24** – Dados de Contagem de Neutrófilos em número absoluto ( $\times 10^9/L$ ) de acordo com a manifestação clínica.

Neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )	HPN clássica		HPN + falência medular	
	Diagnóstico	Atual	Diagnóstico	Atual
	2,96	3,42	0,21	1,29
	1,93	1,80	0,5	2,86
	2,80	5,18	1,4	1,99
		1,51	0,74	0,14
	2,09	1,79	1,50	0,57
	3,41	1,42	1,20	0,07
	3,76	4,23	1,82	7,52
	1,88	7,54		
	3,57	4,99		
<b>Média</b>	2,8	3,54	1,05	2,06
<b>± DP</b>	0,76	2,12	0,58	2,61
<b>Mediana</b>	2,88	3,42	1,20	1,29
<b>Valor mínimo</b>	1,88	1,42	0,21	0,07
<b>Valor máximo</b>	3,76	7,54	1,82	7,53
<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>p=0,888</i></b>		<b><i>p=0,805</i></b>	
<b>HPN clássica vs</b>	<b>Diagnóstico</b>		<b><i>p=0,0003*</i></b>	
<b>HPN + falência medular</b>	<b>Atual</b>		<b><i>p=0,114</i></b>	

**Tabela 25** – Dados de Contagem de Plaquetas ( $\times 10^9/L$ ) de acordo com a manifestação clínica.

Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	HPN clássica		HPN + falência medular	
	Diagnóstico	Atual	Diagnóstico	Atual
	180	197	61	152
	47	152	5	285
	259	196	40	396
	80	113	72	70
	63	136	250	7
	172	166	46	19
	167	115	94	129
	195	245		
	213	320		
<b>Média</b>	152,9	182,2	81,1	151,1
<b>± DP</b>	72,9	67,0	79,5	143,3
<b>Mediana</b>	172,0	166,0	61,0	129,0
<b>Valor mínimo</b>	47,0	113,0	5,0	7,0
<b>Valor máximo</b>	259,0	320,0	250,0	396,0
<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>p=0,666</i></b>		<b><i>p=0,383</i></b>	
<b>HPN clássica vs</b>		<b>Diagnóstico</b>	<b><i>p=0,071</i></b>	
<b>HPN + falência medular</b>		<b>Atual</b>	<b><i>p=0,368</i></b>	



Quando analisamos o resultado do Fas em neutrófilos, comparando-se indivíduos com HPN clássica com indivíduos com HPN e falência medular não houve diferença de expressão das células CD59+ ( $p=0,132$ ). A análise, porém, das células CD59- mostrou que os indivíduos com outra doença medular associada apresentavam IMF menor que os com HPN clássica ( $p=0,041$ ). Não houve diferença quando analisamos, dentro do mesmo subtipo clínico, a IMF das células 59+/PC e 59-/PC (Tabela 15 e figura 10).

Quando analisamos o resultado do Fas em monócitos, não houve diferença de IMF entre indivíduos com HPN clássica com indivíduos com HPN e falência medular ( $p=0,125$ ). Na análise das células CD14- entre os 2 subgrupos de pacientes, entretanto, observamos que os indivíduos com HPN clássica tinham IMF significativamente maior que o outro subgrupo ( $p=0,014$ ). Dentro do mesmo subtipo clínico, a IMF das células CD14+ e CD14- não mostrou diferença (Tabela 16 e figura 11).

**TABELA 26** - Resultado do Fas (CD95), em intensidade média de imunofluorescência, nos neutrófilos de acordo com o subtipo clínico.

	HPN clássico				HPN no contexto de outra doença medular			
	59+/PC		59-/PC		59+/PC		59-/PC	
	%	IMF	%	IMF	%	IMF	%	IMF
	18,4	206,6	81,1	284,5	*	*	99,3	191,6
	*	*	99,6	297,5	68,3	166,8	30,6	194,7
	*	*	100,0	363,4	15,3	103,9	84,7	125,2
	5,3	285,5	94,7	302,1	69,2	177,7	30,2	221,7
	1,1	197,3	98,9	207,1	20,0	132,7	79,9	199,5
	92,6	146,6	5,7	185,4	4,9	190,3	83,2	205,5
	3,8	252,1	96,2	228,6	11,9	343,5	87,5	300,6
	*	*	100,0	298,6				
	3,8	392,8	67,9	367,6				
<b>Média</b>		246,8		281,4		185,8		205,5
<b>± DP</b>		85,9		63,9		83,4		51,8
<b>Mediana</b>		229,3		297,5		172,2		199,5
<b>Valor mínimo</b>		146,6		185,4		103,9		125,2
<b>Valor máximo</b>		392,8		367,6		343,5		300,6

Legenda: DP = desvio padrão

59+/PC = células CD59+ nos pacientes

59-/PC = células CD59- nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

IMF = intensidade média de fluorescência do CD95

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

**Análise Estatística** (Mann-Whitney):

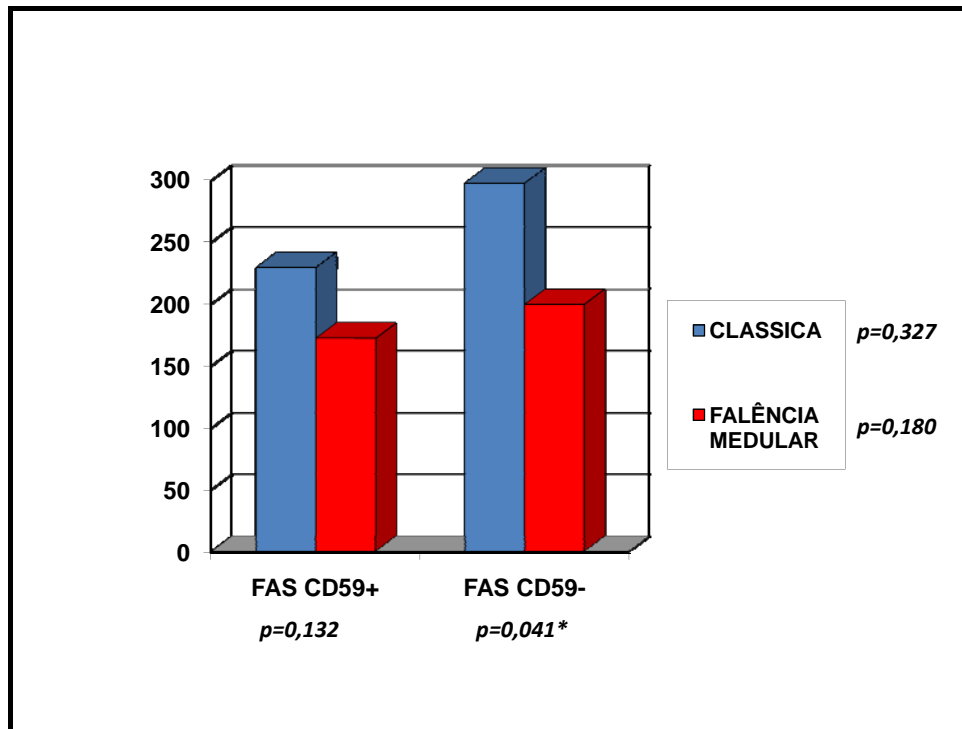
59+/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p=0,132$**

59-/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p=0,041^*$**

HPN clássico (59+/PC vs 59-/PC):  **$p=0,327$**

HPN + doença medular (59+/PC vs 59-/PC):  **$p=0,180$**

**Figura 10** - Representação gráfica da mediana de IMF do Fas em neutrófilos de acordo com a manifestação clínica.



A análise do resultado do FasL em neutrófilos, comparando-se indivíduos com HPN clássica com indivíduos com HPN e falência medular não mostrou diferença de expressão das células CD59+ nem das células CD59- ( $p > 0,999$  e  $p = 0,189$ , respectivamente). Na análise dentro do mesmo subtipo clínico dos indivíduos com HPN clássica também não evidenciou diferença estatística ( $p = 0,252$ ), entretanto, nos indivíduos com HPN e doença medular, a expressão de FasL esteve aumentada nas células CD59- em comparação com as CD59+ ( $p = 0,031$ ) (Tabela 17 e figura 12).

**TABELA 27** - Resultado do Fas, em intensidade média de imunofluorescência, em monócitos de acordo com o subtipo clínico.

	HPN clássico				HPN no contexto de outra doença medular			
	14+/PC		14-/PC		14+/PC		14-/PC	
	%	IMF	%	IMF	%	IMF	%	IMF
	16	339,9	83,3	376,7	19,4	251,7	77,9	234,3
	0,1	295,4	99,9	289,2	65,9	274,0	33,1	242,1
	*	*	100,0	533,2	9,6	199,7	90,1	206,5
	2,6	300,3	97,5	298,9	1,0	320,1	98,9	328,7
	0,6	245,9	99,2	253,5	0,9	230,1	99,1	244,1
	NR	NR	NR	NR	84,2	203,7	15,8	177,8
	*	*	100	462,7	NR	NR	NR	NR
	2,4	288,2	97,3	280,2				
	NR	NR	NR	NR				
<b>Média</b>		293,9		356,3		246,5		238,9
<b>± DP</b>		33,5		100,8		45,8		50,8
<b>Mediana</b>		295,4		298,9		240,9		238,2
<b>Valor mínimo</b>		245,9		253,5		199,7		177,8
<b>Valor máximo</b>		339,9		533,2		320,1		328,7

Legenda: DP = desvio padrão

NR = não realizado

14+/PC = células CD14+ nos pacientes

14-/PC = células CD14- nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

IMF = intensidade média de fluorescência do CD95

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

**Análise Estatística** (Mann-Whitney):

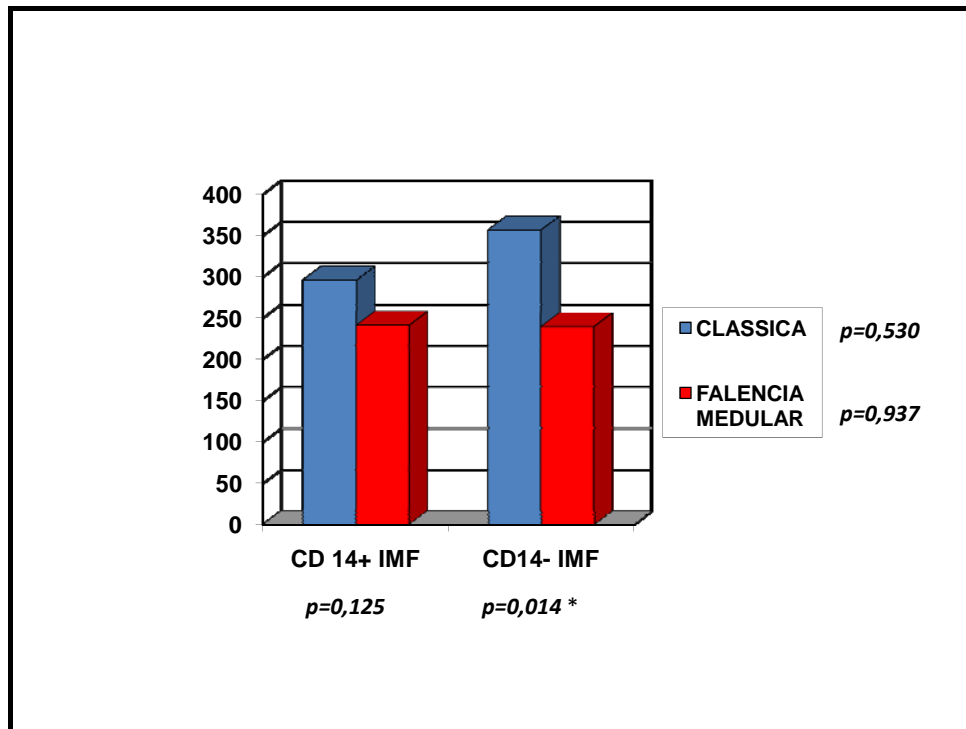
14+/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p=0,125$**

14-/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p=0,014^*$**

HPN clássico (14+/PC vs 14-/PC):  **$p=0,530$**

HPN + doença medular (14+/PC vs 14-/PC):  **$p=0,937$**

**Figura 11** - Representação gráfica da mediana de IMF do Fas em monócitos de acordo com a manifestação clínica.



A análise do FasL em monócitos, não mostrou significância de IMF entre indivíduos com HPN clássica e indivíduos com HPN e falência medular ( $p=0,267$ ). Na análise das células CD14- entre os 2 subgrupos de pacientes também não se observa diferença ( $p=0,638$ ). Dentro do mesmo subtipo clínico, a IMF das células CD14+ e CD14- não mostrou diferença (Tabela 18 e figura 13).

**TABELA 28** - Resultado do FasL, em intensidade média de imunofluorescência, nos neutrófilos de acordo com o subtipo clínico.

	HPN clássico				HPN no contexto de outra doença medular			
	59+/PC		59-/PC		59+/PC		59-/PC	
	%	IMF	%	IMF	%	IMF	%	IMF
	15,5	19,4	73,3	20,1	*	*	100,0	27,1
	17,0	148,1	82,9	27,4	60,2	23,9	39,8	17,4
	*	*	100,0	16,2	14,2	23,3	85,8	20,4
	5,1	25,5	94,9	28,2	100,0	48,7	*	*
	1,1	17,2	98,9	19,6	21,2	106,6	78,8	17,5
	91,8	43,1	8,2	21,3	91,8	31,5	7,9	19,4
	*	*	100,0	26,1	NR	NR	NR	NR
	4,0	58,0	95,9	21,1				
	13,1	43,2	85,8	31,9				
<b>Média</b>		50,6		23,5		46,8		20,3
<b>± DP</b>		45,4		5,1		34,9		3,9
<b>Mediana</b>		43,1		21,3		31,5		19,4
<b>Valor mínimo</b>		17,2		16,2		23,3		17,4
<b>Valor máximo</b>		148,1		31,9		106,6		27,1

Legenda: DP = desvio padrão

NR = não realizado

59+/PC = células CD59+ nos pacientes

59-/PC = células CD59- nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

IMF = intensidade média de fluorescência do FasL

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

**Análise Estatística** (Mann-Whitney):

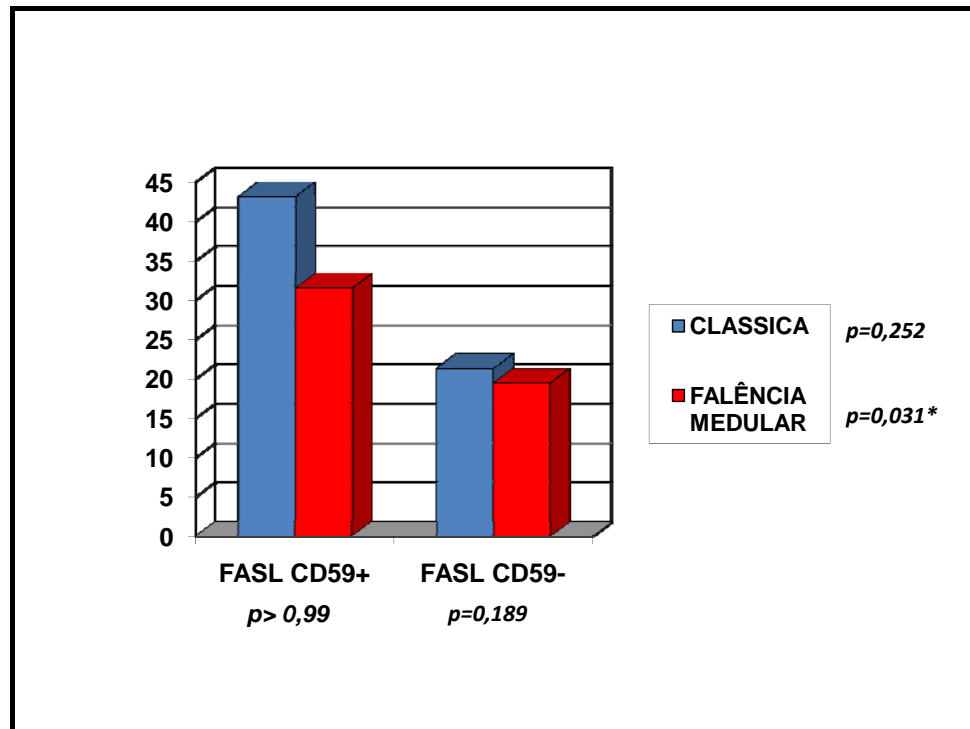
59+/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p > 0,999$**

59-/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p = 0,189$**

HPN clássico (59+/PC vs 59-/PC):  **$p = 0,252$**

HPN + doença medular (59+/PC vs 59-/PC):  **$p = 0,031^*$**

**Figura 12** - Representação gráfica da mediana de IMF do Fas em neutrófilos de acordo com a manifestação clínica.



**TABELA 29** - Resultado do FasL, em intensidade média de imunofluorescência, nos monócitos de acordo com o subtipo clínico.

	HPN clássico				HPN no contexto de outra doença medular			
	14+/PC		14-/PC		14+/PC		14-/PC	
	%	IMF	%	IMF	%	IMF	%	IMF
	16,4	31,9	83,6	32,2	20,4	56,3	78,2	35,9
	0,2	51,8	99,8	36,3	68,5	36,9	31,1	33,8
	*	*	100	28,5	8,6	36,8	91,2	34,8
	2,6	53,9	97,4	44,4	100	46,5	*	*
	0,5	53,1	99,4	50,5	0,6	27,4	99,4	34,5
	NR	NR	NR	NR	100	37,9	*	*
	*	*	100	39,0	2,9	42,9	96,9	50,1
	2,1	50,1	97,8	43,9				
	NR	NR	NR	NR				
<b>Média</b>		48,1		39,2		40,6		37,8
<b>± DP</b>		9,2		7,6		9,1		6,9
<b>Mediana</b>		51,8		39,0		37,9		34,8
<b>Valor mínimo</b>		31,9		28,5		27,4		33,8
<b>Valor máximo</b>		53,9		50,5		56,3		50,1

Legenda: DP = desvio padrão

NR = não realizado

14+/PC = células CD14+ nos pacientes

14-/PC = células CD14- nos pacientes

% = reflete a porcentagem de células analisadas

IMF = intensidade média de fluorescência do FasL

\* = sem medida de IMF devido ao baixo contingente de células

**Análise Estatística** (Mann-Whitney):

14+/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p=0,267$**

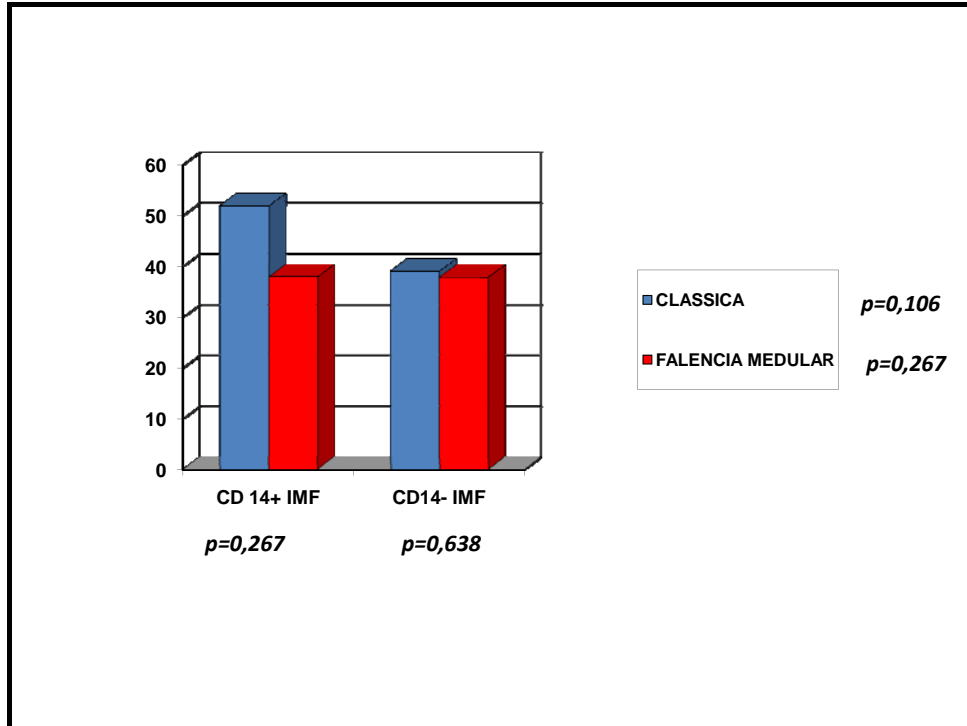
14-/PC (HPN clássico vs HPN e doença medular):  **$p=0,638$**

HPN clássico (14+/PC vs 14-/PC):  **$p=0,106$**

HPN + doença medular (14+/PC vs 14-/PC):  **$p=0,267$**



**Figura 13** - Representação gráfica da mediana de IMF do FasL em monócitos de acordo com a manifestação clínica.



## DISCUSSÃO

A tríade: anemia hemolítica, pancitopenia e trombose, faz da HPN uma síndrome clínica única, que deixou de ser encarada como uma simples anemia hemolítica adquirida para ser considerada um defeito mutacional clonal da célula tronco hematopoética (CTH), no gene da fosfaditilinositolglicana classe A.(Arruda, Rodrigues et al. 2009)

A possibilidade de evolução para AA e o aparecimento de clone HPN em pacientes com história pregressa de AA representam evidência de disfunção medular subjacente. (Marsh and Elebute 2003) Assim, um ambiente medular anormal, como a hipoplasia no caso da AA, poderia ser necessário para expansão do clone HPN, independente da mutação presente no gene PIG-A. (Maciejewski, Sloand et al. 1997; Risitano, Maciejewski et al. 2007)

CHEN *ET AL.* (Chen, Nagarajan et al. 2000) sugerem que as células PIGA-possuam uma vantagem de crescimento herdada, pois analisando células tronco (CD34+), estes autores mostraram que havia aumento da apoptose nas células tronco CD59+ em relação às CD59- na via do Fas.

Devido à importância conhecida do sistema Fas/FasL na apoptose de granulócitos (Husain, Almeciga et al. 2006) e considerando que a análise de positividade do CD59 é de fácil identificação nestas células, (Hall and Rosse 1996; Jennings and Foon 1997; Johnson, Rawstron et al. 1998) decidimos avaliar a expressão de Fas/FasL em fagócitos e sua relação com HPN.

Neste estudo foram analisados pacientes de duas instituições: Hospital das Clínicas da FMUSP e Hospital São Paulo da UNIFESP, sendo que a maior parte deles é acompanhada na primeira instituição. Por ser um trabalho clínico, tivemos dificuldades na obtenção das amostras, que foi aquém do planejado.

No que diz respeito à média de idade, observamos predomínio de diagnóstico no adulto jovem (33 anos), o que está de acordo com a literatura.(de Latour, Mary et al. 2008)

A maioria dos diagnósticos nos pacientes analisados foi realizada por teste de HAM, indicando o longo curso clínico de alguns pacientes.(Young, Abkowitz et al. 2000) Vale ressaltar, que todos os pacientes analisados tiveram seu diagnóstico confirmado por citometria de fluxo, exame padrão de diagnóstico nos dias atuais.(Brodsky 2008)

Os dados de hemograma refletem as manifestações da doença, ou seja, anemia nos pacientes com manifestação clássica e pancitopenia naqueles com lesão medular. Embora possamos observar diferenças evidentes nos exames de cada paciente quando comparados os dados de diagnóstico com os dados atuais, a análise estatística destes dados não mostrou significância.

Não foi observada diferença na expressão do Fas nas células CD59+ em relação às células CD59- e destas em relação ao grupo controle. Estes dados não são concordantes com achados anteriores, onde foi observada maior expressão de Fas em células tronco CD59+ em comparação com células tronco CD59- (Maciejewski, Selleri et al. 1995; Chen, Nagarajan et al. 2000; Ismail, Tooze et al. 2003).

O fato de estarmos analisando células de sangue periférico enquanto os autores citados utilizaram células tronco poderia ser um dos fatores implicados nesta

diferença, visto que, estudo de YAMAMOTO *ET AL.* (Yamamoto, Shichishima et al. 2002), não observou diferença na indução de apoptose dos granulócitos de pacientes com HPN em relação a granulócitos de indivíduos normais, sugerindo que os granulócitos na HPN tenham uma sobrevivência normal. Além disso, análise de neutrófilos de medula óssea comparando pacientes HPN com controles normais, realizada por CAO *ET AL.* (Cao, Shao et al. 2005), não mostrou diferença de expressão de proteínas relacionadas à apoptose, incluindo o CD95 (Fas).

A expressão do FasL, por sua vez, mostrou estar aumentada nas células CD59+ em relação às CD59- de maneira significativa. Sua expressão, entretanto, não se mostrou diferente em relação aos neutrófilos do grupo controle. Em nossa revisão bibliográfica, não encontramos estudos que analisaram a expressão de FasL em fagócitos de pacientes com HPN.

O FasL parece ter papel de destaque na apoptose de neutrófilos. Sabemos, por exemplo, que células com receptores para FasL, como neutrófilo, (Tortorella, Piazzolla et al. 1998) podem iniciar a resolução da inflamação estimulando a secreção de IL-10 em monócitos e macrófagos que reduzem o nível de citocinas inflamatórias. (Simon 2001) Estudos demonstram, também, que neutrófilos podem liberar FasL solúvel em cultura de tecidos, e a interação autócrina entre o Fas do neutrófilo com FasL solúvel e/ou tecidual seria uma das explicações para o processo de apoptose que ocorre em neutrófilos normais. (Watson, Rotstein et al. 1997)

Nosso resultado sugere que exista aumento da expressão de FasL em neutrófilos CD59+ dos indivíduos com HPN. Como sugerido por Luzzato (Young, Abkowitz et al. 2000) devem existir outros mecanismos que expliquem o aumento da

incidência de infecções nestes indivíduos, além da hipoplasia medular. Poderíamos, talvez, inferir que, do mesmo modo que existe maior expressão de FasL nos neutrófilos do sangue periférico, haveria excesso de FasL na medula óssea levando à apoptose das células-tronco, o que explicaria a hipoproliferação medular característica da HPN.(Liles, Kiener et al. 1996)

Ainda resta determinar se os neutrófilos CD59+ dos portadores de HPN respondem diferentemente ao FasL ou não. Clement and Stamenkovic 1996 mostraram que altos níveis de superóxido inibem a morte celular mediada por Fas de células de melanoma, indicando que alterações no potencial de oxiredução da célula são capazes de influenciar a habilidade do Fas em induzir apoptose.(Watson, Rotstein et al. 1997)

Em relação aos dados hematológicos analisados nos grupos de acordo com o subtipo clínico, a melhora dos níveis de Hb e Ht após tratamento no grupo HPN que pode estar relacionada à transfusão ou mesmo à evolução da doença, que apresenta períodos de melhora clínica. Isso também pode ter influenciado os melhores níveis de Hb/Ht nos pacientes HPN em relação aos HPN/FM, que provavelmente apresentam maior gravidade pela concomitância da AA. Os dados do VCM elevado no grupo com HPN clássica refletem a manifestação evidente de hemólise deste grupo.

Dados dos leucócitos mostram uma tendência dos pacientes com HPN mostrarem leucopenia, que se mostra mais evidente no grupo com falência medular associada, como esperado. Esta leucopenia, consequência da neutropenia, é mais facilmente observada nos dados de neutrófilos em número absoluto. Os dados de contagem de plaquetas refletem o diagnóstico de falência medular associada.

De modo geral, os dados de hemograma de nossos pacientes estão de acordo com a sugestão de Parker ET al. de que haveria distintos subtipos clínicos na HPN, dando subsídios à realização da análise de Fas/FasL em separado nestes grupos.(Parker, Omine et al. 2005)

A análise da expressão de Fas em neutrófilos esteve diminuída nas células CD59- dos indivíduos com HPN e doença medular associada em comparação às células CD59- dos portadores de HPN clássica. Este dado poderia sugerir a ocorrência de menor apoptose das células HPN nos indivíduos com doença medular concomitante, contribuindo na sua sobrevivência em relação às células normais. Este achado poderia estar relacionado à teoria da vantagem de sobrevivência que sugere que a mutação no gene PIG-A conferiria uma vantagem relativa de sobrevivência. (Nakakuma and Kawaguchi 2003)

Os dados obtidos da expressão de Fas e FasL em monócitos não mostraram alterações características. Entretanto, quando analisados em relação às manifestações clínicas, os monócitos CD14- mostraram menor expressão de Fas nos indivíduos com lesão medular do que naqueles com HPN clássica. De modo similar, nos indivíduos com doença medular associada, os monócitos CD14- apresentaram menor expressão de FasL em relação às células CD14+.

Na anemia aplástica, a apoptose da célula CD34+ é mediada pelo Fas, ou seja, é esperado que as células tronco desta doença expressem em maior quantidade o receptor de Fas. (Young, Abkowitz et al. 2000) Por outro lado, o Fas parece ser necessário para a manutenção do monócito em circulação, impedindo sua ativação em macrófago.(Brown, Hutcheson et al. 2004) O fato de os pacientes com HPN e hipoplasia medular apresentarem monócitos CD14- com menor expressão de

Fas e de FasL sugere que estas células estariam menos predispostas à apoptose e migrariam em maior número para o tecido.

Embora classicamente o achado de aumento de macrófagos na medula óssea de pacientes com anemia aplástica seja atribuído mais a ausência dos outros elementos medulares do que ao aumento real desta célula,(Segel and Lichtman 2005) o encontro da menor expressão de FasL em monócitos de pacientes HPN com doença medular associada sugere a possibilidade do sistema Fas/FasL ter algum papel nesta alteração medular.

De modo geral os resultados obtidos sugerem que o sistema Fas/FasL tenha importância na sobrevivência da célula HPN, concordando, portanto, com a hipótese da vantagem relativa de sobrevivência das células HPN. Embora este trabalho tenha sido realizado em pequeno número de indivíduos, alguns dos dados encontrados são originais, entretanto, mais estudos são necessários para sua confirmação.

## CONCLUSÕES

A expressão de Fas não diferiu quando comparados os granulócitos 59+/PC, 59-/PC e 59+/GC.

A expressão de FasL nas células 59-/PC foi significativamente menor do que nas células 59+/PC. Não houve, entretanto, diferença entre as células 59+/PC e 59+/GC, nem entre 59-/PC e 59+/GC.

A expressão de Fas e de FasL em monócitos 14+/GC, 14+/PC e 14-/PC não mostrou diferença significativa.

Tentando estabelecer relação entre marcadores de apoptose e manifestações clínicas da doença, observou-se que:

- A análise do Fas nas células 59-/PC dos indivíduos com HPN clássica em comparação com as células 59-/PC dos pacientes com HPN e hipoplasia medular, mostrou menor expressão no grupo com doença medular associada;
- A análise do Fas nas células 14-/PC dos indivíduos com HPN clássica em comparação com as células 14-/PC dos pacientes com HPN e hipoplasia medular, mostrou menor expressão no grupo com doença medular associada;



- Quando analisada a expressão de FasL no grupo de indivíduos com HPN e doença medular concomitante, a expressão de FasL nas células 59-/PC foi significativamente menor do que a das células 59+/PC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akgul, C. and S. W. Edwards (2003). "Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors." Cell Mol Life Sci **60**(11): 2402-8.
- Arruda, M. M. A. S., C. A. Rodrigues, et al. (2009). "Hemoglobinúria Paroxística Noturna: da fisiopatologia ao tratamento." Rev Assoc Med Bras **in press**.
- Bacigalupo, A. (2007). "Aplastic anemia: pathogenesis and treatment." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 23-8.
- Bacigalupo, A. and J. Passweg (2009). "Diagnosis and treatment of acquired aplastic anemia." Hematol Oncol Clin North Am **23**(2): 159-70.
- Bergantini, A. P. F., F. A. Castro, et al. (2005). "Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL." Rev Bras Hematol Hemoter **27**(2): 120-5.
- Bessler, M., P. Mason, et al. (1994). "Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria." Lancet **343**: 951-3.
- Beutler, E. (2005). Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Williams Hematology. M. Lichtman, E. Beutler, K. Kaushansky et al. New York, McGraw-Hill Company: 419-24.
- Brodsky, R. A. (2008). "Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Blood Rev **22**(2): 65-74.
- Brodsky, R. A. (2008). "Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: stem cells and clonality." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 111-5.
- Brodsky, R. A. (2009). "How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Blood **113**(26): 6522-7.

- Brodsky, R. A., M. S. Vala, et al. (1997). "Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8756-60.
- Brodsky, R. A., N. S. Young, et al. (2008). "Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Blood **111**(4): 1840-7.
- Brown, N. J., J. Hutcheson, et al. (2004). "Fas death receptor signaling represses monocyte numbers and macrophage activation in vivo." J Immunol **173**(12): 7584-93.
- Cao, Y. R., Z. H. Shao, et al. (2005). "[Expression of apoptosis-related proteins in bone marrow neutrophils of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **13**(5): 871-4.
- Chauffaille, M. L. L. F. (2005). "A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores." Rev Bras Hematol Hemoter **27**(2): 79-82.
- Chen, G., W. Zeng, et al. (2005). "Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in "normal" phenotype cells." Leukemia **19**: 862-8.
- Chen, R., S. Nagarajan, et al. (2000). "Impaired growth and elevated fas receptor expression in PIGA(+) stem cells in primary paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." J Clin Invest **106**(5): 689-96.
- Clement, M. V. and I. Stamenkovic (1996). "Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death." Embo J **15**(2): 216-25.
- Conrad, M. E. and J. C. Barton (1979). "The aplastic anemia-paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome." Am J Hematol **7**(1): 61-7.

- Dacie, J. V. and S. M. Lewis (1972). "Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology, and nature of the disease." Ser Haematol **5**(3): 3-23.
- de Latour, R. P., J. Y. Mary, et al. (2008). "Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories." Blood **112**(8): 3099-106.
- Dotti, G., B. Savoldo, et al. (2005). "Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis." Blood **105**(12): 4677-84.
- Fujioka, S. and T. Asai (1989). "Prognostic features of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan." Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi **52**(8): 1386-94.
- Funaro, A., E. Ortolan, et al. (2004). "CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration." Blood **104**(13): 4269-78.
- Hall, S. E. and W. F. Rosse (1996). "The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Blood **87**(12): 5332-40.
- Heeney, M. M., S. M. Ormsbee, et al. (2003). "Increased expression of anti-apoptosis genes in peripheral blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Mol Genet Metab **78**(4): 291-4.
- Hernandez-Campo, P. M., J. Almeida, et al. (2008). "Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Transfusion **48**(7): 1403-14.
- Hill, A., P. Hillmen, et al. (2005). "Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Blood **106**(7): 2559-65.

- Hill, A., S. J. Richards, et al. (2007). "Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria." *B J Haematol* **137**: 181-92.
- Hillmen, P., S. M. Lewis, et al. (1995). "Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." *N Engl J Med* **333**(19): 1253-8.
- Hillmen, P. and S. J. Richards (2000). "Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria." *Br J Haematol* **108**(3): 470-9.
- Hillmen, P., N. S. Young, et al. (2006). "The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." *N Engl J Med* **355**(12): 1233-43.
- Hohlbaum, A. M., S. Moe, et al. (2000). "Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival." *J Exp Med* **191**(7): 1209-20.
- Horikawa, K., H. Nakakuma, et al. (1997). "Apoptosis resistance of blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and myelodysplastic syndrome." *Blood* **90**(7): 2716-22.
- Hu, R., G. L. Mukhina, et al. (2005). "PIG-A mutations in normal hematopoiesis." *Blood* **105**: 3848-54.
- Husain, Z., I. Almeciga, et al. (2006). "Increased FasL expression correlates with apoptotic changes in granulocytes cultured with oxidized clozapine." *Toxicol Appl Pharmacol* **214**(3): 326-34.
- Ismail, M. M., J. A. Tooze, et al. (2003). "Differential apoptosis and Fas expression on GPI-negative and GPI-positive stem cells: a mechanism for the evolution of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria." *Br J Haematol* **123**(3): 545-51.

- Jennings, C. D. and K. A. Foon (1997). "Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy." Blood **90**(8): 2863-92.
- Johnson, R. J., A. C. Rawstron, et al. (1998). "Circulating primitive stem cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) are predominantly normal in phenotype but granulocyte colony-stimulating factor treatment mobilizes mainly PNH stem cells." Blood **91**(12): 4504-8.
- Lewis, S. M. and J. V. Dacie (1967). "The aplastic anaemia--paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome." Br J Haematol **13**(2): 236-51.
- Liles, W. C., P. A. Kiener, et al. (1996). "Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils." J Exp Med **184**(2): 429-40.
- Lyakusheva, A., O. Felda, et al. (2002). "Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: differential gene expression of EGR-1 and TAXREB107." Exp Hematol **30**: 18-25.
- Maciejewski, J. P., C. Selleri, et al. (1995). "Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia." Br J Haematol **91**: 245-52.
- Maciejewski, J. P., E. M. Sloand, et al. (1997). "Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia is not associated with a selective proliferative defect in the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clone." Blood **89**: 1173-81.
- Marsh, J. C. W. and M. O. Elebute (2003). "Stem cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and aplastic anaemia: increasing evidence for overlap of haemopoietic defect." Transf Med **13**: 377-86.

- Mathieu, D., A. Rahmouni, et al. (1995). "Impact of magnetic resonance imaging on the diagnosis of abdominal complications of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Blood **85**(11): 3283-8.
- Meletis, J. and E. Terpos (2003). "Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Med Sci Monit **9**(7): RA161-72.
- Nakakuma, H. and T. Kawaguchi (2003). "Pathogenesis of selective expansion of PNH clones." Int J Hematol **77**: 121-4.
- Nguyen, J. S., S. S. Marinopoulos, et al. (2006). "Clinical problem-solving. More than meets the eye." N Engl J Med **355**(10): 1048-52.
- Nishimura, J., Y. Murakami, et al. (1999). "Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease." Am J Hematol **62**(3): 175-82.
- Parker, C., M. Omine, et al. (2005). "Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Blood **106**(12): 3699-709.
- Parker, C. J. (2007). "The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Exp Hematol **35**(523-33).
- Parker, C. J. (2009). "Bone marrow failure syndromes: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Hematol Oncol Clin North Am **23**(2): 333-46.
- Reeves, G. (2005). Immunobiology. New York, Wiley-Blackwell.
- Richards, S. J., A. C. Rawstron, et al. (2000). "Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Cytometry **42**(4): 223-33.
- Risitano, A. M., J. P. Maciejewski, et al. (2007). "Function and malfunction of hematopoietic stem cells in primary bone marrow failure syndromes." Curr Stem Cell Res Ther **2**(1): 39-52.

- Rosse, W. F. (2008). "Pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Missing cell proteins." 162. 2009,  
from <http://www.uptodate.com/patients/content/topic.do?topicKey=~8Lqsmoo1Q.M1.P>.
- Rosse, W. F., P. Hillmen, et al. (2004). "Immune-mediated hemolytic anemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 48-62.
- Rosse, W. F. and J. Nishimura (2003). "Clinical manifestations of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: present state and future problems." Int J Hematol **77**(2): 113-20.
- Rosti, V., G. Tremml, et al. (1997). "Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion." J Clin Invest **100**: 1028-36.
- Rother, R. P., L. Bell, et al. (2005). "The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease." Jama **293**(13): 1653-62.
- Segel, G. B. and M. A. Lichtman (2005). Aplastic Anemia. Williams Hematology. M. Lichtman, E. Beutler, K. Kaushansky et al. New York, McGraw-Hill Company: 375-90.
- Simon, H. U. (2001). "Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences." Immunol Rev **179**: 156-62.
- Socie, G., J. Y. Mary, et al. (1996). "Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology." Lancet **348**(9027): 573-7.



- Tortorella, C., G. Piazzolla, et al. (1998). "Spontaneous and Fas-induced apoptotic cell death in aged neutrophils." J Clin Immunol **18**(5): 321-9.
- Watson, R. W., O. D. Rotstein, et al. (1997). "Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils." Blood **89**(11): 4175-81.
- Yamamoto, T., T. Shichishima, et al. (2002). "Granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and normal individuals have the same sensitivity to spontaneous apoptosis." Exp Hematol **30**(3): 187-94.
- Young, N. S., J. L. Abkowitz, et al. (2000). "New Insights into the Pathophysiology of Acquired Cytopenias." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 18-38.

# **ANEXOS**



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 4 de março de 2005.  
CEP 0928/04

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) RODRIGO PAVANI  
Disciplina/Departamento: Hematologia e Hemoterapia/Medicina da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Análise da importância de genes relacionados à apoptose Hemoglobinúria Paraxística Noturna**".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **31/agosto/2005**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **27/fevereiro/2006**.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."



HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
DE SÃO PAULO DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

## APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.05.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 404/06, intitulado: "Análise da importância de genes relacionados à apoptose nas manifestações clínicas de pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna" apresentado pelo Departamento de Clínica Médica, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro

Pesquisador(a) Executante: Guilherme Henrique Hencklain Fonseca

CAPPesq, 25 de Maio de 2006.

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
 Presidente da Comissão de Ética para Análise  
 de Projetos de Pesquisa

## Questionário do levantamento

### Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_

ID \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Nascimento \_\_\_\_\_

Ocupação: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_

Grupo Racial: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ Serviço de Origem \_\_\_\_\_

### Histórico da Doença:

Data do

**Diagnóstico:** \_\_\_\_\_

Manifestação Inicial:

Hemoglobinúria:

Sim

Não

Citopenia

Trombose \_\_\_\_\_

Outras \_\_\_\_\_

### Diagnóstico:

Hemograma ao

HM \_\_\_\_\_ HB \_\_\_\_\_ HTO \_\_\_\_\_ VCM \_\_\_\_\_

diagnóstico

Leuco \_\_\_\_\_ B \_\_\_\_\_ S \_\_\_\_\_ E \_\_\_\_\_ B \_\_\_\_\_ L \_\_\_\_\_ LA \_\_\_\_\_ M \_\_\_\_\_

Plaquetas: \_\_\_\_\_ Ret \_\_\_\_\_

Mielograma: \_\_\_\_\_

—

Biopsia de Medula(        )

\_\_\_\_\_

—

Teste de Ham \_\_\_\_\_ Teste da

Sacarose \_\_\_\_\_

Citometria de Fluxo:

CD55E \_\_\_\_\_ CD59E \_\_\_\_\_

CD55G \_\_\_\_\_ CD59G \_\_\_\_\_ CD66bG \_\_\_\_\_ CD14

M \_\_\_\_\_

Tipo de população HPN

---

**Evolução/Complicações:**

Trombose \_\_\_\_\_

—

Sangramento: \_\_\_\_\_

—

Infecção:

---

Necessidade

Transfusional: \_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

—

**Tratamento:**

---

---

---

---

---

---

---

## **Análise da importância de genes relacionados à apoptose nas manifestações clínicas de pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna".**

### **Grupo Controle**

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Para ter maior conhecimento clínico e científico sobre Hemoglobinúria Paroxística Noturna, médicos e pesquisadores deste hospital desenvolvem pesquisas clínicas. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos desta doença e, portanto, oferecer, ao final da pesquisa, benefício clínico através de novas possibilidades de tratamento.

Para fazer este estudo, é necessário comparar os resultados obtidos em pacientes que tenham Hemoglobinúria Paroxística Noturna com aqueles de pessoas que não tenham, como você. Para fazer este estudo, é necessário que você autorize a coleta de 10 ml de sangue por punção de veia periférica, sem outros procedimentos alternativos. Neste sangue serão realizados exames laboratoriais específicos desta pesquisa. Vale ressaltar que todo sangue colhido será utilizado exclusivamente nesta pesquisa.

Em caso de dano pessoal causado por este procedimento, você terá direito a tratamento médico nesta instituição, bem como às indenizações legalmente previstas. Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do voluntário.

Concordando com a sua participação, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. É também garantida a retirada de consentimento a qualquer momento. Qualquer que seja, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o atendimento de parentes ou conhecidos seus ou um futuro atendimento seu neste hospital. É importante ressaltar que não existem despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, de acordo com o processo nº 0928/04, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do hospital. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para atualização dos resultados parciais do estudo, bem como esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Rodrigo Pavani, que pode ser encontrado na disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Rua Botucatu, 740 – 3º andar do prédio dos ambulatórios, fone 557-1550. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 1º andar cjto 14, fone 5571-1062, tel/FAX: 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com o Dr. Rodrigo sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Paciente/Representante

Legal:

\_\_\_\_\_

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

Testemunha:

\_\_\_\_\_

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

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Responsável

pelo

projeto:

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



**"Análise da importância de genes relacionados à apoptose nas manifestações clínicas de pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna".**

**Grupo de Pacientes**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Para ter maior conhecimento clínico e científico sobre Hemoglobinúria Paroxística Noturna, médicos e pesquisadores deste hospital desenvolvem pesquisas clínicas. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos desta doença e, portanto, oferecer, ao final da pesquisa, benefício clínico através de novas possibilidades de tratamento.

Para fazer este estudo, é necessário que você autorize a coleta de 10 ml de sangue por punção de veia periférica, sem outros procedimentos alternativos. Neste sangue serão realizados exames laboratoriais específicos desta pesquisa. Vale ressaltar que todo sangue colhido será utilizado exclusivamente nesta pesquisa.

Em caso de dano pessoal causado por este procedimento, você terá direito a tratamento médico nesta instituição, bem como às indenizações legalmente previstas. Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do voluntário.

Concordando com a sua participação, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios diretos sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. É também garantida a retirada de consentimento a qualquer momento. Qualquer que seja, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o atendimento de parentes ou conhecidos seus ou um futuro atendimento seu neste hospital. É importante ressaltar que não existem despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, de acordo com o processo nº 0928/04, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do hospital. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para atualização dos resultados parciais do estudo,

bem como esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Rodrigo Pavani, que pode ser encontrado na disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Rua Botucatu, 740 – 3º andar do prédio dos ambulatórios, fone 557-1550. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 1º andar cjto 14, fone 5571-1062, tel/FAX: 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com o Dr. Rodrigo sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Paciente/Representante

Legal:

\_\_\_\_\_

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

Testemunha:

\_\_\_\_\_

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

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Responsável

pelo

projeto:

\_\_\_\_\_

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

## RESULTADOS COMPLEMENTARES

**Tabela A1: dados de idade e sexo dos indivíduos do grupo controle.**

	<b>IDADE</b>	<b>SEXO</b>
AEFP	30	F
MAEF	54	F
MAH	51	F
ES	42	F
FJF	32	M
FMF	54	M
RP	34	M
SC	32	F
TS	40	F
CSC	42	F

**Tabela A2: Intensidade média de fluorescência para o Fas nos neutrófilos dos pacientes.**

FAS	Cd59++		Cd59+		Cd59-	
	%	IMF	%	IMF	%	IMF
1	18,4	206,6			81,1	284,5
2			0,7	226,6	99,3	191,6
3	68,3	166,8			30,6	194,7
4	0,5				99,6	297,5
5	15,3	103,9			84,7	125,2
6			100,0	363,4		
7	69,2	177,7			30,2	221,7
8			20,0	132,7	79,9	199,5
9	5,3	285,5	94,7	302,1		
10	1,1	197,3			98,9	207,1
11	92,6	146,6			5,7	185,4
12	4,9	190,3	83,2	205,5	11,9	242,9
13	11,9	343,5			87,5	300,6
14	3,8	252,1			96,2	228,6
15			100,0	298,6		
16	3,8	392,8	28,1	357,8	67,9	367,6

**Tabela A3: Intensidade média de fluorescência para o FasL nos neutrófilos dos pacientes.**

FASL	Cd59++		Cd59+		Cd59-	
	%	IMF	%	IMF	%	IMF
AJGB	15,5	19,4	10,6	60,4	73,3	20,1
AMS						27,1
APL	60,2	23,9			39,8	17,4
CAL	17,0	148,1			82,9	27,4
CGA	14,2	23,3			85,8	20,4
CFF			100,0	16,2		
FJFL	100,0	48,7				
JMV	21,2	106,6			78,8	17,5
KS	5,1	25,5	94,9	28,2		
KY	1,2	17,2			98,8	19,6
MCFLB	91,8	43,1			8,2	21,3
NRS	91,8	31,5			7,9	19,4
OSP	20,0	49,8			79,1	20,2
RAF			100,0	26,1		
RSG	3,95	57,98			95,89	21,07
RA	13,1	43,24			85,8	31,9

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)