

DIAGNÓSTICO POR CITOMETRIA DE FLUXO DA HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA

DIAGNOSIS BY FLOW CYTOMETRY OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA

Gabriela Silva FERREIRA¹

Vitória Lucena BRASIL²

Natália Virtude CAROBIN³

Resumo

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é caracterizada por uma doença hemolítica crônica rara adquirida. A HPN pode surgir juntamente com outras doenças hematológicas e achados laboratoriais, como trombocitopenia, neutropenia e síndromes de falência medular. A HPN é uma doença adquirida em decorrência de uma mutação somática no gene PIG-A, isso ocorre nas células tronco, ocasionando na ausência de CD59 na superfície dos eritrócitos tornando os mesmos vulneráveis a lise mediada pelo sistema complemento. Dessa forma, podemos observar na atualidade as deficiências dos testes de triagem para HPN (testes Ham, pesquisas de CD59 e CD55 em coluna em gel), sendo o método mais utilizado na atualidade a citometria de fluxo (CMF), este que é um teste capaz de quantificar e detectar o clone da HPN com mais rapidez e eficácia, assim ajudando em um melhor prognóstico. Os diagnósticos e resultados realizados através do método de citometria de fluxo comprovam o motivo da limitação dos outros testes de triagem, demonstrando o lado vantajoso da citometria de fluxo em identificar variações e intensidades dos clones, garantindo um diagnóstico mais certo e preciso.

Palavras chave: Glicosil-fosfatidil inositol, Fosfatidilinositol glicano classe A, Hemoglobinúria Paroxística Noturna, Citometria de Fluxo.

¹ Estudante em Biomedicina do Centro Universitário UNA Linha Verde de Belo Horizonte (MG). Email: gabriela.senac.18@gmail.com

² Estudante em Biomedicina do Centro Universitário UNA Linha Verde de Belo Horizonte (MG). Email: vit.orialucena@hotmail.com

³ Professora orientadora do Centro Universitário UNA Linha Verde de Belo Horizonte (MG). Email: natyvirca@gmail.com

Abstract

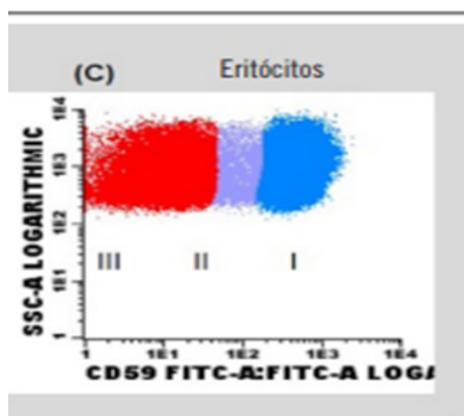
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is characterized by a rare acquired chronic hemolytic disease. This disease arises along with other hematological diseases. It often presents with infections, these infections are often recurrent, thrombocytopenia and neutropenia, especially with bone marrow failure syndromes. This disease arises in association with other types of diseases, such as myelodysplastic syndrome and aplastic anemia. PNH is a disease acquired as a result of a somatic mutation in the PIG-A gene, this occurs in stem cells, causing a failure of erythrocytes, leukocytes and platelets to protect themselves against lysis that are measured by the complement system. Thus, we can currently observe the deficiencies of screening tests for PNH (Ham tests, CD59 and CD55 research in gel column), ceasing to use these tests, and starting to use the test by the flow cytometry method (CMF) , which is a test capable of quantifying and detecting PNH clones more quickly and efficiently, thus helping to improve the prognosis. The diagnoses and results performed using the flow cytometry method prove the reason for the low use and limitation of other screening tests, and demonstrate the advantage of identifying variations and intensities of clones, ensuring a more accurate and accurate diagnosis.

Keywords: Glycosyl-phosphatidyl inositol, Phosphatidylinositol glycan class A, Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Flow Cytometry.

Introdução

A hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) se dá por uma anormalidade rara das células tronco hematopoiéticas que obtiveram uma mutação no gene fosfatidilinositol glicano classe A (PIG-A) situado no cromossomo x, não possui influência de sexo ou idade. Essas mutações causam um bloqueio da síntese de âncoras de glicosil-fosfatidil inositol (GPI), o mesmo é responsável pela ancoragem e fixação de mais de 150 proteínas na membrana celular externa dos leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Logo, as células sanguíneas do clone HPN expressam uma deficiência dessas proteínas, podendo ser classificadas como: tipo I (normal), tipo II (deficiência parcial de GPI) e tipo III (deficiência total de GPI). (LETHICIA *et al.*, 2021) Como mostra a seguinte imagem.

Figura 01. Representação dos 3 graus do clone com marcador CD59



Fonte: (LETHICIA *et al.*, 2021). Em azul é possível observar a classificação tipo I, onde é considerado paciente saudável. Em Lilás observamos a classificação tipo II, sendo considerada a perda parcial de GPI nos eritrócitos. Em vermelho a representação da classificação tipo III, onde possui a deficiência total da GPI nos eritrócitos.

Em consequência da deficiência da síntese de âncoras do GPI, ocorre a hemólise intravascular crônica, isto é, as hemácias são lisadas devido a ausência de CD59 na superfície dos eritrócitos tornando susceptíveis à lise mediada pelo complexo de complemento terminal, e com isto produzem sintomas consideráveis, como a urina escura (marrom escura) decorrente a liberação dessas hemácias destruídas. Outro fator é a anemia resultante da perda significativa de hemácias. A hemoglobina possui afinidade

ao óxido nítrico (NO) que tem como função manter o tônus muscular dos vasos sanguíneos e também evita a agregação plaquetária. Com a redução do NO paciente passa apresentar fadiga devido a baixa tonicidade dos vasos comprometendo a pressão sanguínea, podendo levar a dores no peito, hipertensão pulmonar, disfagia, dores abdominais e além disso, indução a fenômenos de trombose. A função Renal também pode ser comprometida pela destruição dos glóbulos vermelhos, assim, o ferro livre é depositado nos rins prejudicando a atividade renal. (LETHICIA *et al.*, 2021)

A média de vida desde o diagnóstico é de 10 a 15 anos, contudo uma proporção significativa de doentes sobrevive por períodos mais prolongados como 25 anos, e cerca de 15% recuperam espontaneamente. (LETHICIA *et al.*, 2021)

O diagnóstico da HPN vem evoluindo ao longo do tempo e, os antigos testes bioquímicos vêm sendo substituídos pela citometria de fluxo. O teste de Ham, durante muito tempo, foi o meio de diagnóstico principal para identificar o clone HPN nos eritrócitos. O teste de lise da sacarose foi utilizado no rastreamento da HPN, numa solução isotônica de sacarose a baixa força iônica, há agregação das globulinas séricas que fixam o complemento. Os testes de Ham e o de lise da sacarose não são específicos para a doença, só detectam o defeito proteico nos eritrócitos e deixam de ter utilidade após a transfusão devido à ocorrência de resultados falsos negativos. O teste de sensibilidade de lise ao complemento avalia a proporção e os tipos de eritrócitos “HPN”, sendo mais eficaz. Mas este teste é tecnicamente mais difícil e não tem utilidade no diagnóstico de rotina. O teste de cartão em gel, baseia-se no princípio da hemaglutinação após uma reação antígeno-anticorpo e detecta os eritrócitos deficientes em CD55 e CD59. O CD55 e CD59 são proteínas da membrana ancorada, que apresentam propriedades reguladoras da ativação da cascata do complemento. (LETHICIA *et al.*, 2021)

A sensibilidade do teste de cartão em gel, varia entre 2% a 10% para os eritrócitos HPN tipo III. Apesar de ser um exame de realização e interpretação simples, não é quantitativo nem sensível na detecção de pequenos clones. A citometria de fluxo veio para substituir o teste de Ham no diagnóstico definitivo da HPN. Ao contrário dos testes citados acima, esta técnica permite a análise de todas as populações do sangue periférico, eritrócitos, plaquetas e leucócitos (RODRIGUES,2011).

Esta pesquisa tem como objetivo, descrever os principais métodos utilizados para o diagnóstico da HPN. Dando ênfase na técnica de citometria de fluxo, visando

um diagnóstico fidedigno e rápido, a fim de proporcionar ao paciente um tratamento adequado e melhor qualidade de vida. (RODRIGUES,2012).

O diagnóstico precoce e monitoramento de pacientes com risco elevado para HPN se torna importante para um melhor prognóstico e escolha do tratamento, uma vez que a doença não possui cura (LETHICIA *et al.*, 2021) e contribuiria com a melhoria da qualidade de vida do paciente evitando atraso no diagnóstico.

Materiais e métodos

Para esta pesquisa foram realizadas revisões bibliográficas exploratórias de artigos publicados entre os anos de 2006 a 2022 visando o aprimoramento pessoal e profissional para o tema Diagnóstico por Citometria de fluxo da Hemoglobinúria Paroxística Noturna. Para essas revisões foram realizadas pesquisas em 8 artigos, sendo incluídos 5. Os critérios estabelecidos foram como artigos que abordassem melhor e mais a fundo a citometria de fluxo.

As pesquisas foram efetuadas na seguinte base de dados eletrônica: (Scielo) Scientific Electronic Library Online e Google Acadêmico, publicados em idiomas Português e Inglês, utilizando-se dos descritores; Hemoglobinúria Paroxística Noturna, glicosil-fosfatidil inositol (GPI) e Citometria de Fluxo. Esses sites oferecem o acesso virtual a revistas e artigos científicos.

Resultados

Após a análise e obtenção dos dados foram incluídos nesse estudo 5 artigos científicos publicados em revistas nacionais que se enquadraram nos critérios de inclusão descritos na metodologia, os artigos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Descrição dos resultados dos artigos selecionados.

Título	Autores	Resultados
Fisiopatologia, diagnóstico e novas terapêuticas da Hemoglobinúria Paroxística Noturna	RODRIGUES (2011)	A abordagem terapêutica da HPN mudou radicalmente com a introdução do eculizumab. O eculizumab age como um anticorpo monoclonal que se dirige contra a fração C5 do sistema complemento. Os estudos mostram que é um fármaco seguro e bem tolerado e diminui a hemólise intravascular, reduz ou elimina a necessidade de transfusão, melhora a anemia, a fadiga e a qualidade de vida. A citometria de fluxo tornou-se o método de escolha no diagnóstico da doença pela sua sensibilidade e especificidade, permitindo quantificar o tamanho do clone HPN, o que torna esta técnica útil também na monitorização dos doentes. Contudo, a variedade de métodos utilizados pelos laboratórios torna evidente a necessidade de estabelecer guidelines internacionais.
A importância da citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento da hemoglobinúria paroxística noturna	LETHICIA <i>et al.</i> , (2021)	Contudo, há uma série de considerações importantes em termos de estratégias de análise e seleção de anticorpos que devem ser observadas. Além disso, a interpretação dos resultados necessita de um conhecimento detalhado da distribuição celular de antígenos ligados à GPI e a sua expressão nas diferentes fases de diferenciação das células hematopoiéticas. Laudos claros são essenciais para a tomada de decisões clínicas apropriadas e achados laboratoriais positivos devem ser vistos no contexto da apresentação clínica da doença, sendo o papel do médico classificar e definir o tratamento mais apropriado a cada paciente.

<p>Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento</p>	<p>ARRUDA et al., (2009)</p>	<p>Tendo em vista os avanços recentes no entendimento da doença, sua alta morbimortalidade e a disponibilidade de tratamentos eficazes, inclusive com potencial de cura, é fundamental que os médicos pensem no diagnóstico para HPN. Os portadores de HPN podem se beneficiar amplamente dos tratamentos disponíveis, com redução do risco de sequelas graves e melhora considerável da qualidade de vida.</p>
<p>A atuação dos linfócitos na patogênese da Hemoglobinúria Paroxística Noturna</p>	<p>ANDRADE (2022)</p>	<p>Existe a hipótese de que as CTH que expressam proteínas ancoradas em GPI são seletivamente mortas por linfócitos citotóxicos autorreativos, enquanto CTH deficientes em proteínas ancoradas em GPI são poupados da resposta autoimune. Sendo assim, os linfócitos T podem estar envolvidos na patogênese da HPN e podem fornecer novas estratégias no tratamento, retardando o ataque dos linfócitos T às CTH sem mutação do gene PIG-A e melhorar a qualidade de vida de pacientes.</p>
<p>Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna</p>	<p>MODESTO (2006)</p>	<p>Os resultados da CMF comprovam a limitação dos testes de triagem além de demonstrarem a relevância da citometria em identificar variações de intensidade do clone, garantindo inclusive o diagnóstico preciso em pacientes previamente transfundidos .</p>

Discussão

Para Lethicia *et al.*, 2021 o diagnóstico precoce da a HPN é de extrema importância para um melhor prognóstico e escolha de tratamento. A importância do diagnóstico precoce deve-se ao início imediato da terapêutica, acompanhamento do desfecho clínico e avaliação a longo prazo da evolução do paciente para melhor qualidade de vida dos mesmos. Portanto, a citometria de fluxo, técnica sensível e alta especificidade é considerada a metodologia padrão ouro para o diagnóstico da HPN.

Ainda, segundo Lethicia *et al.*, 2021, a interpretação dos resultados obtidos a partir da citometria de fluxo exige conhecimento especializado para a avaliação dos antígenos ligados a GPI, e entender a expressão dos mesmos em diferentes fases das células hematopoiéticas. Levando também em consideração a seleção correta dos anticorpos para análise.

Lethicia *et al.*, 2021 também destaca a importância da liberação de um laudo claro e objetivo, a fim de auxiliar a tomada de decisão dos médicos levando em consideração todos os achados laboratoriais e contexto da clínica do paciente para uma melhor classificação e obtenção do melhor tratamento.

Andrade *et al.*, 2022 ressalta que existe a hipótese de que as células-tronco hematopoiéticas (CTH) que expressam proteínas ancoradas a GPI são seletivamente mortas por linfócitos citotóxicos, enquanto as CTH deficientes em proteínas ancoradas a GPI são poupadas da resposta imune. Assim os Linfócitos T podem estar envolvidos na patogênese da HPN, porém o papel específico desenvolvido pelos mesmos ainda não está claro e necessita de mais estudos para ser compreendido. Sua descoberta pode proporcionar estratégias novas e precisas no tratamento da doença.

Entretanto Arruda *et al.*, 2009 defende que todos os pacientes com anemia hemolítica adquirida, trombozes inexplicáveis em sítios pouco comuns, disfagia, odinofagia, citopenias e síndromes de falência medular, dores abdominais e impotência sexual masculina sem justificativa aparente devem ser submetidos ao exame para diagnóstico da HPN. Levando em consideração os avanços recentes no entendimento e diagnóstico da doença é preciso que os médicos levem em consideração

todas as possibilidades. Assim é possível um diagnóstico precoce da doença com redução do risco de sequelas graves e melhora considerável da qualidade de vida.

Rodrigues *et al.*, 2011 afirma que a Citometria de Fluxo tornou-se o método de análise de principal escolha para diagnóstico da HPN por sua rapidez, sensibilidade e especificidade, sendo capaz de quantificar o tamanho do clone HPN, sendo útil também na monitorização dos doentes. A monitorização é possível pois a citometria de fluxo permite a avaliação simultânea de várias características físicas e biológicas de uma célula em particular.

Para Sena *et al.*, 2018 é notório o desenvolvimento técnico-científico no diagnóstico das doenças imunohematológicas e afirma que a citometria de fluxo transformou o padrão de diagnóstico dessas doenças, principalmente das leucemias, por sua alta sensibilidade e especificidade.

Segundo Modesto *et al.*, 2006 o teste em gel se mostrou sensível e específico para diagnóstico da HPN, porém apresentando resultados falso-negativos em análises realizadas após transfusão de sangue, sugerindo que o mesmo seja utilizado obedecendo os critérios relativos à transfusão sanguínea. Já o teste de HAM se mostrou menos específico positivando em situações não-HPN, relatando não encontrar na literatura pesquisada razões para a provável falha técnica. O autor conclui que em seu estudo os resultados validam dados já apresentados na literatura, apontando a citometria como padrão ouro na identificação do clone HPN, sendo possível a quantificação dos clones, o que não é possível com o teste em gel.

Portanto, diante dos artigos revisados o diagnóstico das doenças hematológicas com ênfase a HPN pela citometria de fluxo se mostrou padrão ouro, pois nele é permitido a identificação das células deficientes da proteína âncora GPI, determinando então a porcentagem de populações discretas de células anormais e o grau de deficiência, que são as informações primordiais para o manejo da doença. A citometria de fluxo para o uso de diagnóstico tem um grande potencial, e vem se tornando cada vez mais uma ferramenta altamente relevante nos grandes laboratórios do país, pois leva confiabilidade nos resultados obtidos. Contudo, a atuação do profissional da saúde é altamente importante, pois dentre todas as etapas de análise, até a obtenção de um diagnóstico preciso, o profissional participa ativamente de todas, ou seja, o conhecimento específico da área se torna indispensável, assim o exame só é liberado

após o profissional realizar a análise de todas essas etapas e se certificar que tudo ocorreu corretamente.

Conclusão

Conclui-se que o diagnóstico precoce da Hemoglobinúria Paroxística Noturna se torna essencial para um melhor prognóstico e escolha do tratamento da doença. Em meio aos outros métodos de análise, a citometria de fluxo se apresenta como o meio mais sensível e assertivo para diagnóstico e monitoramento da HPN. Se torna necessário o conhecimento preciso da disposição celular de antígenos ligados a GPI a fim da liberação de forma clara para auxílio médico da tomada de decisões e definição de tratamento. Assim oferecendo uma melhor qualidade de vida para cada paciente.

Referências

- ANDRADE, R. G. A atuação dos linfócitos na patogênese da Hemoglobinúria Paroxística Noturna.** São Jose do Rio Preto, 2022.
- ARRUDA, S. A. M. et al. Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento.** São Paulo: UNIFESP, 2010.
- EHLERT, R. L. A importância da citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento da hemoglobinúria paroxística noturna.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2021.
- MODESTO, T. M Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna.** *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2006.
- RODRIGUES, T. M. B. Fisiopatologia, diagnóstico e novas terapêuticas da hemoglobinúria paroxística noturna.** Porto, 2011.
- SENA, C. R. et.al. A influência da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias linfóides.** *Rev. Textura* v.11 n.20. 2018.