

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**IDENTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DO TAMANHO DE CLONES DE CÉLULAS
DEFICIENTES EM GPI-AP EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA APLÁSICA,
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E TROMBOSE**

Virginia Etges Helfer

Porto Alegre, junho de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**IDENTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DO TAMANHO DE CLONES DE CÉLULAS
DEFICIENTES EM GPI-AP EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA APLÁSICA,
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E TROMBOSE**

Trabalho apresentado como requisito
parcial para aprovação na Disciplina de Trabalho de
Conclusão do Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Virginia Etges Helfer

Professora Orientadora: Simone Martins de Castro

Co-orientadora: Mariela Granero Farias

Porto Alegre, junho de 2016

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Anexo I) na qualidade de “Artigo Original”. A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca avaliadora.

Identificação e comparação do tamanho de clones de células deficientes em GPI-AP em indivíduos com anemia aplásica, síndrome mielodisplásica e trombose

Virginia Etges Helfer^{1,2}; Mariela Granero Farias²; Simone Martins de Castro¹

¹Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Unidade de Diagnóstico Personalizado (Citometria de Fluxo), Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil

Autor correspondente

Simone Martins de Castro

Faculdade de Farmácia – UFRGS

Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, Brasil, 90610-000

Tel: 51 33165434

E-mail: simonecastro13@gmail.com

Resumo

Introdução: A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença rara que acomete a célula-tronco hematopoética, manifestando-se por hemólise intravascular crônica, falência medular e trombose. Esta alteração pode estar associada à anemia aplásica (AA) e à síndrome mielodisplásica (SMD), com relevância clínica ainda desconhecida. *Objetivo:* Este estudo teve como objetivo identificar e avaliar o tamanho do clone HPN em pacientes com AA/SMD e compará-los com pacientes HPN, pacientes com eventos trombóticos e indivíduos normais. *Materiais e Método:* Foram avaliados pacientes que tiveram solicitação para pesquisa de clones HPN na Unidade de Diagnóstico Personalizado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre janeiro de 2014 e maio de 2016, sendo subdivididos nos grupos HPN, AA/SMD e trombose. As amostras de indivíduos normais foram obtidas de doadores de sangue no Serviço de Hemoterapia do HCPA. A pesquisa dos clones HPN foi realizada por citometria de fluxo com a utilização dos marcadores FLAER e CD157 para leucócitos e CD59 para eritrócitos. Os grupos foram comparados em relação aos parâmetros hematológicos, bioquímicos e tamanho de clone. *Resultados:* Foram incluídos no estudo 103 pacientes, subdivididos em HPN (18), AA/SMD (30) e trombose (10) e 45 doadores de sangue. Como esperado, o grupo HPN diferiu dos demais grupos em relação ao tamanho dos clones HPN nos neutrófilos, monócitos e eritrócitos ($p < 0,05$). Pequenos clones HPN foram identificados nos pacientes com AA/SMD, assim como nos indivíduos normais. A hemólise constante e a necessidade de transfusões sanguíneas levam o indivíduo com HPN a apresentar clones menores nos eritrócitos em comparação aos leucócitos. Os grupos HPN e AA/SMD tiveram níveis de hemoglobina inferiores aos grupos trombose e normal ($p < 0,001$). Os níveis de LDH e bilirrubina indireta foram obtidos apenas para os grupos HPN e AA/SMD, sendo níveis mais elevados de LDH encontrados para o grupo HPN ($p = 0,02$). *Conclusão:* Pacientes com AA/SMD são estudados quanto ao desenvolvimento de clones HPN no curso da doença, porém ainda não se sabe a sua implicação. O estudo buscou comparar este grupo com os demais, avaliando a extensão das células HPN que eles apresentaram. Sugere-se acompanhamento destes pacientes, evitando desencadeamento de hemólise intravascular associada à doença.

Palavras-chave: hemoglobinúria paroxística noturna; GPI-AP; aplasia; síndrome mielodisplásica; citometria de fluxo.

Introdução

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma doença rara, geneticamente adquirida, que afeta igualmente homens e mulheres de qualquer idade, sendo mais frequente em adultos.¹ Devido à dificuldade diagnóstica e à raridade da doença, sua incidência não é bem conhecida, sendo estimada em 0,1 a 0,2 casos por 100.000 pessoas ao ano, com sobrevida média de 10 a 20 anos.² Clinicamente, a doença caracteriza-se por hemólise intravascular, falência medular e trombose, sendo causas principais da morbimortalidade.³⁻⁵ Cerca de 50% dos pacientes vão à óbito devido a complicações trombóticas.¹ Os primeiros relatos de pacientes com sintomatologia semelhante à HPN datam do final do século 18, porém, apenas em 1882, Paul Strübing descreveu a doença como sendo uma síndrome clínica. Em 1937, Thomas Ham observou que os eritrócitos de pacientes HPN sofriam hemólise quando incubados com soro acidificado de pacientes normais. Este experimento levou ao desenvolvimento do primeiro exame diagnóstico para HPN, o teste de Ham.⁶

A doença desenvolve-se pela expansão clonal não maligna de células-tronco hematopoéticas que adquiriram uma mutação somática em um gene ligado ao cromossomo X: o gene fosfatidil-inositol-glicano classe A (PIG-A).^{4,7} Este gene é necessário na síntese do glicolípido glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) que tem como função ancorar mais de 150 proteínas diferentes à membrana celular.³ Nas células sanguíneas, já foram descritas mais de 25 proteínas ancoradas pelo GPI, algumas com ação desconhecida outras já bem documentadas, como antígenos de grupo sanguíneo, moléculas de adesão e proteínas regulatórias do complemento como, por exemplo, as proteínas CD55 e CD59, ancoradas na membrana dos eritrócitos.^{3,8} É a ausência destas duas últimas proteínas, reguladoras do complemento, que leva ao aparecimento de hemólise intravascular, por ação do sistema do complemento e, conseqüentemente, da hemoglobinúria. O CD55 (*decay accelerating factor* – DAF) acelera a destruição de C3 convertase, logo, não há a formação de C3a e C3b, bem como de C5 e seus produtos; e o CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis* – MIRL)

se liga às frações C8 e C9 do complemento, evitando a formação do MAC (*membrane attack complex*) e, conseqüentemente, a lise celular.⁹ Leucócitos e eritrócitos são acometidos e as células geradas com essa anomalia são chamadas de clone HPN.

Devido à constante ativação do complemento, a hemólise intravascular é crônica, levando a hemoglobinúria, hemossiderinúria e anemia.¹⁰ A hemoglobina livre dos eritrócitos possui alta afinidade pelo óxido nítrico (NO) presente no plasma provocando a diminuição da concentração de NO nos tecidos. A depleção de NO é responsável por desencadear a maioria dos demais sintomas da HPN: fadiga, dor abdominal, espasmo esofágico, disfunção erétil e trombose, sendo mais comuns nos pacientes com clones HPN maiores (>60% dos granulócitos).¹¹ A incidência de tromboses varia entre pacientes, pois, além do tamanho do clone, há fatores de risco individuais que predispõe a trombose, como fatores ambientais e fatores genéticos. Em pacientes HPN, tromboses ocorrem em sítios incomuns: veias intra-abdominais, cerebrais e dos membros, seguidas das veias pulmonares e das artérias. Destes, a veia hepática é a mais comum a sofrer com trombose, caracterizando a Síndrome de Budd-Chiari, desfecho clínico frequentemente relatado, principalmente naqueles pacientes com grandes clones HPN.¹⁰

Por ser uma doença com manifestações clínicas variáveis de acordo com o tamanho do clone e presença ou ausência de outra patologia medular, o *International PNH Interest Group* (IPIG) classificou a HPN em três subgrupos, a fim de uniformizar o diagnóstico:^{12,13}

HPN clássica: definida em pacientes com manifestações clínicas devido a hemólise intravascular intensa, sem evidência de alteração medular. A medula óssea é normocelular ou hipocelular com áreas de hiperplasia eritróide e morfologia normal, sem alterações cariotípicas. A análise do clone HPN indica grandes populações deficientes em GPI-AP (>50%).

HPN associada a outras desordens hematológicas: pacientes que apresentam hemólise intravascular moderada associada a confirmação de alguma síndrome de falência medular, sendo as mais comuns anemia aplásica (AA), síndrome mielodisplásica (SMD) e mielofibrose primária. População de células deficientes em GPI-AP menor do que na HPN clássica (<10%, apesar de haver variações).

HPN subclínica: observada em pacientes sem evidência clínica ou laboratorial de hemólise intravascular. São detectadas pequenas populações de células HPN

(<1%) em pacientes diagnosticados com síndrome de falência medular, particularmente SMD e AA.

A detecção de células deficientes em GPI-AP é realizada por citometria de fluxo, método de escolha no auxílio diagnóstico da HPN e acompanhamento dos pacientes. A técnica permite a identificação de populações de células deficientes, bem como a determinação da porcentagem destas células anormais e seus graus de deficiência, com alta sensibilidade e especificidade.^{6,7} Atualmente, sabe-se que a população de eritrócitos deficientes em GPI-AP varia de acordo com episódios hemolíticos e transfusões recentes, o que pode levar à resultados falso-negativos. Diferentemente dos eritrócitos, leucócitos não sofrem influência destes fatores, logo refletem com maior precisão o tamanho do clone HPN. Como critério diagnóstico de HPN, dois marcadores diferentes, associados à GPI-AP, em duas linhagens de células hematopoéticas, devem ser identificados como ausentes na população clonal de células.¹⁴

Em 2010, a *International Clinical Cytometry Society* (ICCS) publicou recomendações para a análise de eritrócitos, de neutrófilos e de monócitos na pesquisa de clones HPN. A identificação destes clones na população eritrocítica era realizada pela ausência das proteínas CD55 e CD59, sendo que a última fornece resultados mais adequados na identificação e separação das populações deficientes, pois está expressa em níveis maiores, quando comparada com a CD55. Para avaliação da população leucocitária, um marcador de linhagem deve ser utilizado, como por exemplo, CD45, e a identificação de neutrófilos e monócitos realizada através de marcadores específicos destas células, como CD10 e CD33. A identificação dos clones HPN é realizada através de, pelo menos, dois marcadores específicos para GPI. Os anticorpos CD14 e CD24, combinados com o marcador FLAER (*fluorescein-labeled proaerolysin*), são indicados para determinação de populações deficientes em GPI-AP em monócitos e neutrófilos, respectivamente.⁷ Recentemente, foi demonstrado que o anticorpo CD157 pode ser uma alternativa aos anticorpos CD14 e CD24. Esta molécula está presente em grandes quantidades na superfície das células mielóides, sendo ancorada pelo GPI. Com isso, o CD157 funciona como marcador específico para GPI nos neutrófilos e nos monócitos, permitindo a análise destas duas populações celulares em um único tubo de trabalho.¹⁵

A pesquisa de clones HPN é recomendada para pacientes classificados como grupos de alto risco. Estes pacientes apresentam como sintomas, isolados ou não, hemoglobinúria, hemólise intravascular com teste de Coombs negativo, disfagia e dor abdominal com evidência de hemólise intravascular, e eventos de trombose em locais não comuns. Incluídos nestes grupos estão pacientes citopênicos, pacientes com anemia aplásica, mesmo na ausência de hemólise, e pacientes com síndrome mielodisplásica.^{12,16}

Células clonais GPI-AP negativas também são encontradas em pacientes com algum tipo de falência medular, sendo a correlação mais bem estudada e definida na anemia aplásica (AA). Além de AA, clones HPN podem ser detectados nas síndromes mielodisplásicas (SMD), principalmente na anemia refratária.¹⁷ O desenvolvimento de AA é o mais bem estabelecido fator de risco relacionado à expansão clonal de células GPI-AP deficientes. Pacientes que, primeiramente desenvolvem HPN, também podem cursar em AA, sendo que alguns cursam com SMD.¹⁸

Em um último grande estudo realizado, foram observados clones HPN maiores que 0,01% em 39,5% dos pacientes diagnosticados com AA, 1,8% dos pacientes com SMD e 2% dos pacientes com outras desordens medulares. Além disso, os maiores clones observados foram para os pacientes do último grupo, com 24,4% de clone HPN. Foi com o aumento da sensibilidade da técnica diagnóstica que tornou-se possível a detecção de clones tão pequenos em patologias complexas, sendo, hoje, muito importante no acompanhamento dos pacientes com falência medular, pois este é um grupo de risco no desenvolvimento de hemólise intravascular por HPN.¹⁷ Por isso, é sugerido o monitoramento anual dos pacientes com AA e SMD positivos para HPN.⁷ O mecanismo pelo qual há a expansão clonal das células deficientes em GPI-AP nos pacientes com falência medular não está claro. A hipótese mais aceita para a coexistência de células HPN na aplasia medular seria a vantagem proliferativa que estas células possuem através de um processo imuno-mediado, no qual as células do sistema imune não reconheceriam o clone HPN.¹⁹

Neste contexto, o estudo teve como objetivo identificar a presença e avaliar o tamanho de clones HPN em indivíduos com AA e SMD, comparando os dados com pacientes clinicamente confirmados para HPN, pacientes que apresentaram eventos trombóticos, bem como indivíduos normais.

Materiais e métodos

Obtenção das amostras

Para determinação de clones HPN em indivíduos saudáveis, foram obtidas amostras de sangue periférico, coletadas por punção venosa em tubos contendo K₂EDTA como anticoagulante, de doadores voluntários de sangue no Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram incluídos no grupo aqueles indivíduos que apresentaram todos os parâmetros hematológicos (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, RDW) dentro da faixa de normalidade e sem qualquer outra doença hematológica associada.

Nos grupos anemia aplásica/síndrome mielodisplásica (AA/SMD), hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e trombose foram incluídos pacientes que tiveram solicitação do exame de imunofenotipagem para HPN no laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre janeiro de 2014 e maio de 2016. Para que fossem incluídos nos grupos, os pacientes tiveram confirmação clínica de HPN, AA/SMD e trombose.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, registrado pelo número 1.420.575.

Preparação das amostras para imunofenotipagem

Preparação do material para avaliação dos eritrócitos: 50 µL de uma diluição 1:100 do sangue periférico com tampão fosfato-salino (PBS acrescido de azida sódica e 0,5% de soro fetal bovino) foram adicionados à um tubo contendo os anticorpos CD59 FITC (EXBIO, Clone MEM-43), CD235a PE (EXBIO, Clone HIR2), CD61 PerCP-Cy 5.5 (BD, Clone VI-PL2) e CD45 APC (BD, Clone HI30). A incubação foi realizada por 20 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Após, foi realizada a lavagem do material com PBS seguida de centrifugação (540 g por 5 minutos). O *pellet* final foi ressuspenso em 500 µL de PBS e adquirido no citômetro de fluxo dentro de 15 minutos.

Preparação do material para avaliação dos neutrófilos e monócitos: 100 µL da amostra de sangue periférico foram adicionados a um tubo contendo os anticorpos FLAER-Alexa 488 (Cedarlane), CD157 PE (BD, Clone sy/11B5), CD45 PerCP (BD, Clone 2D1), CD33 APC (BD, Clone WM53) e CD10 APC-H7 (BD, Clone HI10a). A incubação foi realizada por 20 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, os eritrócitos foram lisados, adicionando-se uma solução de lise (BD FACS™ Lysing Solution) por 10 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. O material foi lavado com PBS com 3% de soro fetal bovino, seguido de centrifugação (540 g por 5 minutos). O *pellet* final foi ressuscitado em 350 µL de PBS com 3% de soro fetal bovino e adquirido imediatamente no citômetro de fluxo.

Aquisição dos dados e análises

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando-se o programa BD FACSDiva™ *software*, e analisadas no programa Infinicyt™ *software* (Cytognos SL, Salamanca, Espanha).

Avaliação dos eritrócitos: foram adquiridos 1.000.000 eventos no *gate* de eritrócitos, em baixa pressão. A identificação da linhagem eritrocítica foi feita pela seguinte estratégia de *gates*: seleção da população de interesse nos parâmetros FSCxSSC, adicionada à população CD45 negativa, CD61 negativa e CD235a positiva. Com apenas esta população selecionada e visualizada no *dot plot*, as células CD59 negativas foram selecionadas e identificadas como GPI-AP deficientes.

Para avaliação dos leucócitos, foram adquiridos um total de 500.000 eventos em baixa pressão. As análises foram realizadas pela estratégia de *gates* abaixo:

Neutrófilos: identificação da população de neutrófilos CD45 forte, adicionada à população correspondente CD10 forte e CD33 fraca e, ainda, seleção desta população no *dot plot* FSCxSSC. A visualização apenas desta população permitiu a identificação e caracterização das células GPI-AP deficientes, negativas para CD157 e FLAER.

Monócitos: identificação da população de monócitos CD45 forte, adicionada à população correspondente CD33 forte e CD10 negativo. A partir da seleção desta

população, foram identificadas e caracterizadas as células GPI-AP deficientes, negativas para CD157 e FLAER.

A presença de células mutadas para HPN foi estabelecida pela detecção inequívoca de clones HPN por citometria de fluxo, com sensibilidade de 0,01%, identificando pequenos clones HPN (<1%) e células com fenótipo de HPN (<0,1%).²⁰ O tamanho do clone foi definido pela porcentagem de células detectadas em cada uma das linhagens celulares.

Análise estatística

Foi realizada análise descritiva dos dados demográficos e laboratoriais dos indivíduos. A avaliação de normalidade da distribuição dos dados foi realizada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis* com correção de *Bonferroni*. Os dados foram apresentados como mediana e percentis (25 e 75). As análises foram realizadas no *software* SPSS[®] versão 24, considerando nível de significância de 5%.

Resultados

Um total de 103 amostras foram incluídas neste estudo, sendo 61 do sexo feminino e 42 do sexo masculino, com média de idade de 29 anos (22 – 47 anos). Estas amostras foram divididas em quatro grupos de acordo com a condição clínica, sendo 18 pacientes com HPN (17,47%), 30 pacientes com AA/SMD (29,13%), 10 pacientes apresentaram trombose (9,7%) e 45 amostras de pacientes normais (43,7%). A descrição dos grupos e seus respectivos parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como o tamanho dos clones HPN, estão representados na tabela 1. A quantidade de reticulócitos e os níveis de LDH e bilirrubina indireta somente foram obtidos para os pacientes dos grupos HPN e AA/SMD.

Houve diferença entre os grupos na distribuição dos resultados para leucócitos totais, plaquetas e níveis de hemoglobina e para os clones nos neutrófilos, monócitos e eritrócitos. Os níveis de hemoglobina diferiram significativamente ($P<0,001$) dos grupos HPN e AA/SMD para o grupo normal. O número de plaquetas foi significativamente menor no grupo HPN em relação aos grupos trombose ($P=0,009$) e normal ($P<0,001$) bem como no grupo AA/SMD para

os grupos trombose ($P=0,001$) e normal ($P<0,001$). O tamanho dos clones GPI-AP detectados nos grupos do estudo teve diferença significativa ($P<0,05$) para neutrófilos, monócitos e eritrócitos do grupo HPN em relação aos demais, AA/SMD, trombose e normal. Também houve diferença significativa ($P=0,042$) para os clones GPI-AP encontrados nos eritrócitos do grupo AA/SMD para o grupo normal.

Na análise por citometria de fluxo, primeiramente, foi identificada a linhagem celular de interesse para, então, caracterizar e quantificar o clone HPN, quando presente. Um dos critérios diagnósticos para HPN é a presença de clones maiores do que 1% em, pelo menos, duas linhagens celulares (figuras 1 e 2). Foram identificados 7 pacientes com HPN clássica. Eles apresentaram tamanho de clone de 97% (85,8 – 99,86%), 97,2% (88,1 – 98,9%) e 44,5% (39,1 – 93,8%) para neutrófilos, monócitos e eritrócitos, respectivamente. Estes pacientes apresentaram níveis médios de hemoglobina, LDH e bilirrubina indireta de 9,9 g/dL (6 – 10,8 g/dL), 1175,5 U/L (852 – 2344,25 U/L) e 0,7 mg/dL (0,45 – 1,5 mg/dL), respectivamente.

Discussão

A HPN é uma doença rara, causada por uma mutação adquirida que se manifesta, principalmente, por anemia hemolítica, trombose e falência medular. A associação desta com anemia aplásica e com síndrome mielodisplásica tem sido muito discutida. Diversos pacientes com AA possuem clones HPN no momento do diagnóstico, outros desenvolvem o clone durante o curso da doença.

Por muitos anos, o diagnóstico da HPN era realizado pela detecção de células sensíveis à lise pelo teste de Ham. Este teste baseava-se no aumento da sensibilidade dos eritrócitos à ação do sistema complemento, sendo o diagnóstico apenas na detecção de hemácias deficientes em GPI-AP. Devido à dificuldade de execução e padronização da técnica, bem como da baixa sensibilidade do método, pequenas populações de células mutadas não eram detectadas. Com o desenvolvimento e aprimoramento da técnica de citometria de fluxo, tornou-se possível a detecção de pequenos clones deficientes em GPI-AP nos eritrócitos, bem como nos neutrófilos e nos monócitos, com alta sensibilidade (0,01%). Com a citometria de fluxo como padrão-ouro no diagnóstico de HPN, muitos clones pequenos de GPI-AP podem ser identificados, principalmente em pacientes com

outras desordens medulares sem manifestação clínica de HPN, como AA e SMD. O presente estudo baseou-se no documento *Guidelines for the Diagnosis and Monitoring of PNH and related disorders by Flow Cytometry*, publicado pelo ICCS.⁷

Por ser uma doença de baixa incidência na população, a pesquisa de clones HPN ainda é pouco requisitada. Com isso, o aprimoramento e a padronização de técnicas laboratoriais tornam-se limitados. Um levantamento realizado em 105 centros laboratoriais, de 26 países, reuniu informações referentes aos procedimentos de análise para detecção de HPN. Apesar da publicação de *guidelines* sugerindo padronização da técnica, há grande variabilidade entre os centros. De acordo com o estudo, contabilizadas as variações de anticorpos utilizados, número de células adquiridas e estratégias de *gates* aplicadas, há 1014 diferentes possibilidades para determinação dos clones HPN nos eritrócitos, nos granulócitos e nos monócitos. Levando-se em consideração a presença de grandes clones, pequenas variações de análise entre os centros podem não ser tão significativas. Porém, quando avaliadas células de pacientes com pequenos clones, a possibilidade de não serem detectados é grande. Além disso, ainda não há consenso com relação a valores de referência, sendo que alguns centros reportam como presença de clones HPN valores inferiores a sensibilidade do método (<0,01%).²¹

No presente estudo, foi observado, para todos os grupos, que o clone HPN nos eritrócitos é menor do que o clone encontrado nos neutrófilos e nos monócitos. Esta diferença já era esperada, conforme literatura.⁷ Além das transfusões sanguíneas que são submetidos os pacientes com HPN e com AA, outra justificativa para essa diferença está no fato que as hemácias permanecem na corrente circulatória por mais tempo, em comparação com os leucócitos, portanto, são mais propensas a sofrerem ataque do sistema do complemento.^{7,22}

Segundo a literatura, a presença de um número significativo de eritrócitos deficientes em GPI-AP deve ser concomitante com a presença desta mesma deficiência em leucócitos.⁷ Quando avaliados os resultados nos quais foram identificadas células com fenótipo HPN (<0,1%), há a presença de pequenas populações eritrocitárias com estas características mesmo sem detecção deste fenótipo em leucócitos. Este resultado pode estar associado com o uso de diferentes anticorpos para identificação dos clones durante o estudo, pois houve modificação dos painéis de trabalho para caracterização do clone HPN, a fim de melhorar a

detecção destas células. O aumento de sensibilidade do método durante a pesquisa, através da combinação de diferentes marcadores e aquisição de maior número de eventos, permitiu a identificação destas células com maior precisão. Além de marcadores mais específicos, a sensibilidade e a precisão do método também aumentam à medida que um maior número de eventos é analisado.²³

Apesar de não obtermos informações a respeito das manifestações clínicas de cada paciente e de outros exames como critérios diagnósticos de HPN, identificamos sete indivíduos como portadores de HPN clássica. Todos apresentaram tamanho de clone GPI-AP deficiente maior que 50% e indicadores laboratoriais de hemólise intravascular, como níveis de LDH elevados (417-4346 U/L), reticulócitos aumentados (57800-344800/uL) e bilirrubina indireta aumentada (0,4-1,7 mg/dL). O menor nível de hemoglobina encontrado para esse grupo em relação ao grupo normal ($P < 0,001$) é devido à expansão do clone HPN que, quando maior, maior a hemólise e menor a quantidade de hemoglobina nestes pacientes.²⁴ A menor quantidade de leucócitos e de plaquetas encontrada relaciona-se com a ativação crônica do complemento, causando destruição destas células.²² Estes pacientes, na maioria dos casos, sofrem constantes transfusões sanguíneas, o que explica o menor tamanho de clone HPN dos eritrócitos, em comparação com os leucócitos.⁷

O sangue periférico de pacientes com HPN é relatado como sendo um mosaico, contendo células com fenótipo normal e com fenótipo HPN sendo que, a proporção destas células, varia de paciente para paciente, como foi observado neste estudo (o clone HPN nos neutrófilos variou de 0,8% a 99,86% nos 18 pacientes analisados). A explicação para esta diferença entre pacientes ainda não foi esclarecida. Entretanto, a determinação do tamanho do clone HPN é clinicamente relevante, pois pacientes com pequenos clones podem não apresentar sintomas da doença, sendo avaliada a necessidade de tratamento, enquanto que pacientes com clones maiores apresentam, entre outros sintomas, hemólise intravascular crônica e respondem bem à terapia específica de inibição do complemento.¹³

A presença de pequenos clones HPN nos pacientes AA/SMD neste estudo confirma o que já é relatado na literatura, porém ainda não há esclarecimento acerca da implicação clínica deles.²⁵ A diferença significativa encontrada entre o grupo AA/SMD e o grupo normal para leucócitos totais, plaquetas e níveis de hemoglobina ($P < 0,001$) já era esperada, pois citopenias são características normais destas duas

desordens¹⁸, não sendo causadas pela pequena população de células HPN. O pequeno clone HPN encontrado em pacientes com anemia aplásica pode continuar estável por anos, sendo apenas uma minoria acometida pela expansão destas células, associado à hemólise e anemia.²⁶ Diversos são os relatos de que a presença de clones HPN em pacientes AA/SMD teria valor prognóstico, associando com uma resposta favorável à terapia imunossupressora. Porém, um estudo retrospectivo não encontrou associação entre a presença do clone HPN e a resposta ao tratamento.²⁷ A detecção de um pequeno número de células GPI-AP deficientes em pacientes com AA ou SMD não indica a necessidade de terapia imunossupressora, pois os eventos hemolíticos são raros quando os clones são pequenos.⁷ A pesquisa de clones HPN nestes pacientes é indicada no diagnóstico da desordem medular e, pelo menos, anualmente enquanto houver o acompanhamento do indivíduo.¹² A detecção de células com fenótipo HPN em pacientes que apresentam alguma desordem medular sinaliza que estes devem ser acompanhados quanto a evolução para HPN, facilitando intervenção precoce e consequente redução das morbidades associadas à doença não tratada.¹⁷

Pequenas populações de células com fenótipo HPN também foram identificadas e quantificadas em pacientes normais. O tamanho dos clones nos leucócitos encontrados nesses pacientes não foi significativamente diferente daqueles encontrados nos pacientes AA/SMD, como esperado. A pequena diferença encontrada para os clones nos eritrócitos entre estes dois grupos pode ser devido às mudanças na técnica ao longo do estudo. É relatado na literatura que a presença de células GPI-AP deficientes no sangue de pacientes normais sugere que ser portador da mutação no gene PIG-A não seria suficiente para haver a expansão clonal destas células deficientes. Assim, um segundo evento é necessário, como alguma desordem medular para o desencadeamento das manifestações clínicas. As células não mutadas do indivíduo seriam destruídas pelo sistema imune e as células GPI-AP deficientes seriam preservadas. Este mecanismo é sugerido pois, provavelmente, as proteínas ancoradas pelo glicolípido GPI seriam necessárias para desencadear o processo de citotoxicidade mediado por células T. Como consequência, há falência medular com expansão clonal das células mutadas para o gene PIG-A.²

Na ocorrência de trombose sem causa conhecida e em sítios não usuais, a pesquisa para o clone HPN é indicada. É sabido que 40-67% dos óbitos de

pacientes com HPN ocorrem por complicações trombóticas.¹⁶ Por isso, a observação de uma amostra isolada de casos de trombose se fez presente neste trabalho. Dos 10 pacientes incluídos no grupo, apenas um apresentou clone GPI-AP deficiente em leucócitos acima de 1%. Não houve diferença significativa entre o tamanho dos clones detectados neste grupo com o grupo controle. O risco de desenvolvimento de trombos parece estar diretamente associado ao tamanho do clone HPN, sendo clones maiores responsáveis por aumentar este risco.²⁸ Assim, o fator causador do evento trombótico nos pacientes deste estudo parece não estar associado a mutação para HPN. Porém, a formação do trombo sem causa aparente reforça a indicação para acompanhamento destes pacientes.

A sensibilidade e a especificidade da técnica para detecção de clones HPN por citometria de fluxo têm aumentado nos últimos anos. A detecção de leucócitos deficientes em GPI-AP mostrou-se mais sensível e fidedigna em comparação com os eritrócitos, uma vez que estes últimos são lisados pelo complemento, e os pacientes podem necessitar de transfusões sanguíneas recorrentes. Com isso, a utilização de anticorpos com maior especificidade, tornou-se necessária. O desenvolvimento da técnica utilizando FLAER²⁹ melhorou a sensibilidade na detecção dos clones, bem como a inclusão do CD157 no painel de pesquisa de clones nos leucócitos, recentemente.¹⁵ O laboratório onde o estudo foi realizado foi adequando-se às mudanças, levando ao aumento de sensibilidade das análises. Apesar de não termos obtido dados estatísticos para comparação, foi observado aumento na sensibilidade de detecção dos clones, principalmente para pequenas populações de células com fenótipo HPN.

Conclusão

Este trabalho buscou identificar a presença de clones HPN em pacientes com HPN diagnosticada, AA/SMD, trombose e indivíduos normais. Foi possível identificar pacientes com grandes populações de células deficientes em GPI-AP, caracterizando a HPN clássica. Foi detectada a presença de pequenos grupos de células mutadas para HPN no grupo AA/SMD neste trabalho, apesar do tamanho desta mutação não ser diferente significativamente em relação ao grupo normal.

Sugerimos outros estudos com acompanhamento destes pacientes com falência medular, a fim de avaliar a evolução dos clones e sua implicação clínica.

A pesquisa de clones HPN ainda não está completamente padronizada entre os laboratórios. A detecção de pequenas populações GPI-AP deficientes ainda é dificultada entre os serviços devido a utilização de métodos com diferentes graus de sensibilidade. O uso do FLAER e do CD157 tem permitido a marcação simultânea de neutrófilos e monócitos com alta sensibilidade e especificidade, alternativa adotada durante o estudo.

Referências bibliográficas

1. Besa EC. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Background, Pathophysiology, Etiology. 15 2015. <http://emedicine.medscape.com/article/207468-overview#a9>. Accessed March 25, 2016.
2. Devalet B, Mullier F, Chatelain B, Dogné J-M, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol*. 2015;95(3):190-198.
3. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014;124(18):2804–2811.
4. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: *Curr Opin Hematol*. 2012;19(3):141-148.
5. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82B(4):195-208.
6. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. *ASH Educ Program Book*. 2008;2008(1):93–103.
7. Borowitz MJ, Craig FE, DiGiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. April 2010:211-230.
8. Risitano AM, Rotoli B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics*. 2008;2(2):205–22.
9. Brodsky RA. Complement in hemolytic anemia. *Blood*. 2015;126(22):2459-2465.
10. Risitano AM. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and the Complement System: Recent Insights and Novel Anticomplement Strategies. In: Lambris JD,

Holers VM, Ricklin D, eds. *Complement Therapeutics*. Vol 735. Boston, MA: Springer US; 2013:155-172.

11. Brodsky RA. Narrative review: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the physiology of complement-related hemolytic anemia. *Ann Intern Med*. 2008;148(8):587–595.
12. Parker C. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106(12):3699-3709.
13. Parker CJ. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *ASH Educ Program Book*. 2011;2011(1):21–29.
14. Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev*. 2008;22(2):65-74.
15. Sutherland DR, Acton E, Keeney M, Davis BH, Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection: Use of CD157 in Flaer-Based Assays. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(1):44-55.
16. Villegas A, Arrizabalaga B, Bonanad S, et al. Consenso español para el diagnóstico y tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clínica*. 2016;146(6):278.e1-278.e7.
17. Raza A, Ravandi F, Rastogi A, et al. A prospective multicenter study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure: PNH Cells in Bone Marrow Dysfunction: Explore. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(3):175-182.
18. Aplastic Anemia and MDS International Foundation. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH). May 2016. <http://www.aamds.org/diseases/pnh>. Accessed May, 21, 2016.
19. de Azambuja AP, Malvezzi M, Bitencourt MA, Oliveira MM, Medeiros LA, Pasquini R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone in 103 Brazilian patients: diagnosis and classification. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2015;37(2):90-97.
20. Marinov I, Kohoutová M, Tkáčová V, Pešek A, Čermák J, Cetkovský P. Clinical relevance of CD157 for rapid and cost-effective simultaneous evaluation of PNH granulocytes and monocytes by flow cytometry. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(2):231-237.
21. Fletcher M, Whitby L, Whitby A, Barnett D. Current International Flow Cytometric Practices for the Detection and Monitoring of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (PNH) clones: A UK NEQAS Survey. *Cytometry B Clin Cytom*. March 2016.
22. Sharma VR, Talwalkar SS. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pathogenesis, Testing, and Diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2013;11(9). <http://www.hematologyandoncology.net/index.php/supplements/paroxysmal->

nocturnal-hemoglobinuria-pathogenesis-testing-and-diagnosis/. Accessed May 23, 2016.

23. Liew M, Farley M, Andreasen J, Parker CJ, Wittwer CT. Rare event counting of CD59- red cells in human blood: A 47-month experience using PNH consensus guidelines for WBC and RBC testing in a reference lab: PNH Testing in a Reference Laboratory. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015;88(4):261-269.
24. Agarwal R, Chapple P, Brown M, Szer J, Juneja S. Analysis of abnormal clones by the fluorescent aerolysin method in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and other marrow disorders. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(1):14-21.
25. Wanachiwanawin W, Siripanyaphinyo U, Piyawattanasakul N, Kinoshita T. A cohort study of the nature of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and PIG-A mutations in patients with aplastic anemia. *Eur J Haematol*. 2006;76(6):502-509.
26. Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Haematologica*. 2009;94(1):3-7.
27. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2009;144(2):206-216.
28. Hall C. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2003;102(10):3587-3591.
29. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(3):459-466.

ANEXO I

Normas da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH)

Information for authors/ Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia/ Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

The Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, ISSN 1516 8484, the official scientific publication of the Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, Associazione Italo-Brasiliana di Ematologia and Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica aims to promote scientific development in Hematology, Transfusion Medicine and related areas. All manuscripts, after initial acceptance by the editors, will be sent for analysis by two peer reviewers. Anonymity is guaranteed throughout the evaluation process. When considered necessary, a list of modifications will be sent to authors to correct their work or justify their decision not to do so.

The responsibility for opinions expressed in articles is solely of the authors.

Manuscripts should not be submitted simultaneously to more than one journal. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Reproduction, in full or partial, translated into other languages requires prior permission of the editors.

The journal publishes the following sessions: Original Article, Special Article, Review Article, Updates in the Specialty, Case report, Letter to the Editor, Images in Clinical Hematology, Editorial, Scientific Comment and What is the Evidence. Other types of publications of interest in the area will be published at the discretion of the editors. All manuscripts must be submitted in English.

PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

General information

For any manuscript to be evaluated, it must be accompanied by the following documentation:

- Conflict of interest: Situations that may improperly influence the development or the conclusions of the work such as participation in drug- or equipment-producing companies cited or used in the work, as well as competitors of these companies should be mentioned. Financial assistance, payments received for consultancies, relationships related to employment, etc. are also considered sources of conflict.
- Approval of the study by a Research Ethics Committee recognized by the National Research Ethics Committee (CONEP);
- Articles that deal with clinical research involving human beings must include a statement in the Methods Section that all study participants signed an informed consent form. Authors should also confirm that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2008;
- For works involving animal experimentation, the authors should confirm in the Methods Section that the study followed the rules contained in the Ethical Code for Animal Experimentation of the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) [WHO Chronicle 1985; 39 (2): 51-6] and the principles of the Brazilian College of Animal experimentation - COBEA (www.cobea.org.br). Authors must complete the Declaration - Statement of Human and Animal Rights.

All randomized controlled trials and clinical trials submitted for publication must be registered in a clinical trials database. This is a guideline of the International Clinical Trial Registry Platform (ICTPR) of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The instructions for the registry are available at <http://www.icmje.org/clinicaltrialsup.htm> and registration can be attained in the Clinical Trials Database of the National Library of Medicine available at <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.

Technical requirements

1. Article identification: a) A concise however informative title; b) Complete names of authors without abbreviations and their institutions; c) Department and official name of the institution(s) to which the work should be attributed; d) Name, full address including telephone and e-mail of corresponding author; e) financial support (if any).

2. Abstract and keywords: Abstract in English of not more than 250 words. For Original Articles this should be structured with background, method, main results and conclusion. For the other article types, the abstract need not be structured but should contain information illustrating the importance of the work. Specify up to five keywords, which define the theme of the paper. The keywords should be based on MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine available at: <http://www.sgp-online.com.br/rbhh/sgp/naveg/mesh.asp>. For clinical trials, indicate the International Clinical Trials Registry Number below the summary.

3. Manuscript content: a) Original Article: Used to publish the results of scientific research, it must be original and should comprise the following: Introduction, Objective, Method, Results, Discussion, Conclusion and References. The work should not exceed 4000 words (including references), up to 6 authors, up to 7 tables, illustrations and photos and up to 30 references; b) Special Article: With the same structure as original articles, Original Articles are reclassified by the Editor depending on their importance; c) Review Articles: narrative reviews addressing an important issue in the specialty. These articles should not exceed 5000 words (including references), a maximum of 7 tables, Figures and Photos and up to 60 references; d) Update in the Specialty: on a theme, method, treatment, etc. It must contain a brief history of the topic, its current state of knowledge and the reasons for the work; study methods (data sources, selection criteria), hypotheses, study lines, etc., criteria similar to review articles; e) Case Report: should have an introduction with a brief literature review, a description of the case showing significant results for the diagnosis and differential diagnoses (if any), discussion or comments and references. It should not exceed 1800 words, two tables, illustrations and photographs, up to four authors and ten references; f) Letters to the Editor: a maximum of 1000 words (including references), three authors, and two illustrations; g) Images in Clinical Hematology: Maximum 100 words, two images, three authors and three references; h) Scientific comments: will only be accepted by invitation of the editors.

4. Acknowledgements: Should be addressed to collaborators who deserve recognition, but whose participation does not justify their inclusion as an author such as technical assistants, as well as financial support received.

5. References: References should always be numbered in the order they appear in the text. The format must be based on the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" guidelines proposed by the International Committee of Medical Journal Editors and updated in 2009, as follows: the titles of journals should be abbreviated following the List of Journals Indexed in Index Medicus of the National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Cite the first six authors after which add the words et al. Examples of references: Printed documents

- Journals: Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA. Sterility testing of hematopoietic progenitor cell products: a single-institution series of culture-positive rates and successful infusion of culture-positive products. *Transfusion*. 2007;47(4):636-43.
- Books: Chalmers J. Clinician's manual on blood pressure and stroke prevention. 3rd ed. London: Science Press; 2002. 70 p. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection Diagnosis and Management. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Editorial Offices; 1997. 249 p.
- Book chapters: F. Reyes. Lymphocyte differentiation. In P Solal-Céligny, N Brousse, F Reyes, C Gisselbrecht, B Coiffier. Non-Hodgkin's Lymphomas. Paris: Éditions Frison-Roche; 1993. p.19-29.
- Annals: Souza AM, Vaz RS, Carvalho MB, Arai Y, Hamerschilak N. Prevalência de testes sorológicos relacionados à hepatite B e não-A, não-B em doadores de sangue. In: 19º Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia / 26º Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2003 Ago 6-9; São Paulo, 2003. Anais. p.103.
- Theses: Sandes AF. Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritrocitária, granulocítica e megacariótica em pacientes com síndromes mielodisplásicas [thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009. 126p.

Electronic documents

- Articles in Periodicals: Almeida ID, Coitinho AS, Juckowsky CA, Schmalfuss T, Balsan AM, Röhsig LM. Controle de esterilidade de produtos de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet] 2010 [cited 2010 Jun 10]; 32(1):23-8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n1/aop03010.pdf>

- Books: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. Clinical methods. The history, physical, and laboratory examinations. 3rd ed. [Internet]. Boston: Butterworths; 1990. [cited 2010 Jun 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm>
- Illustrations and photos: Must have a resolution of at least 1000 dpi. Color figures should be in CMYK and will be published in color only if essential and must be in TIFF, JPEG or CDR format. Do not send the figures within the text.
- Tables: should be numbered consecutively using Arabic numerals and cited in the text in numerical order. If the table requires special symbols, it should be sent as a high resolution image (1000 dpi) in TIFF or JPG format.

SUBMISSION

The submission of the manuscript must be via the website of the Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, (Journal of Hematology and Hemoterapy) www.rbhh.org. A copyright transfer form (available on the website) must be completed and signed by all authors and sent to the editorial office e-mail brazilbloodjournal@yahoo.com.br.

When a manuscript is accepted for publication, the author(s) will be requested to complete a conflict of interest form which must be sent to the editorial office.

It is the responsibility of authors to obtain written permission to reproduce any previously published data included in the manuscript.

The editors can publish papers that do not exactly follow the instructions after careful evaluation always taking into account the interests of the readership.

Correspondence address:

Fernando Ferreira Costa/ Editor in Chief/ Rua Carlos Chagas, 480/ Campinas, SP, Brazil/

CEP: 13083-970

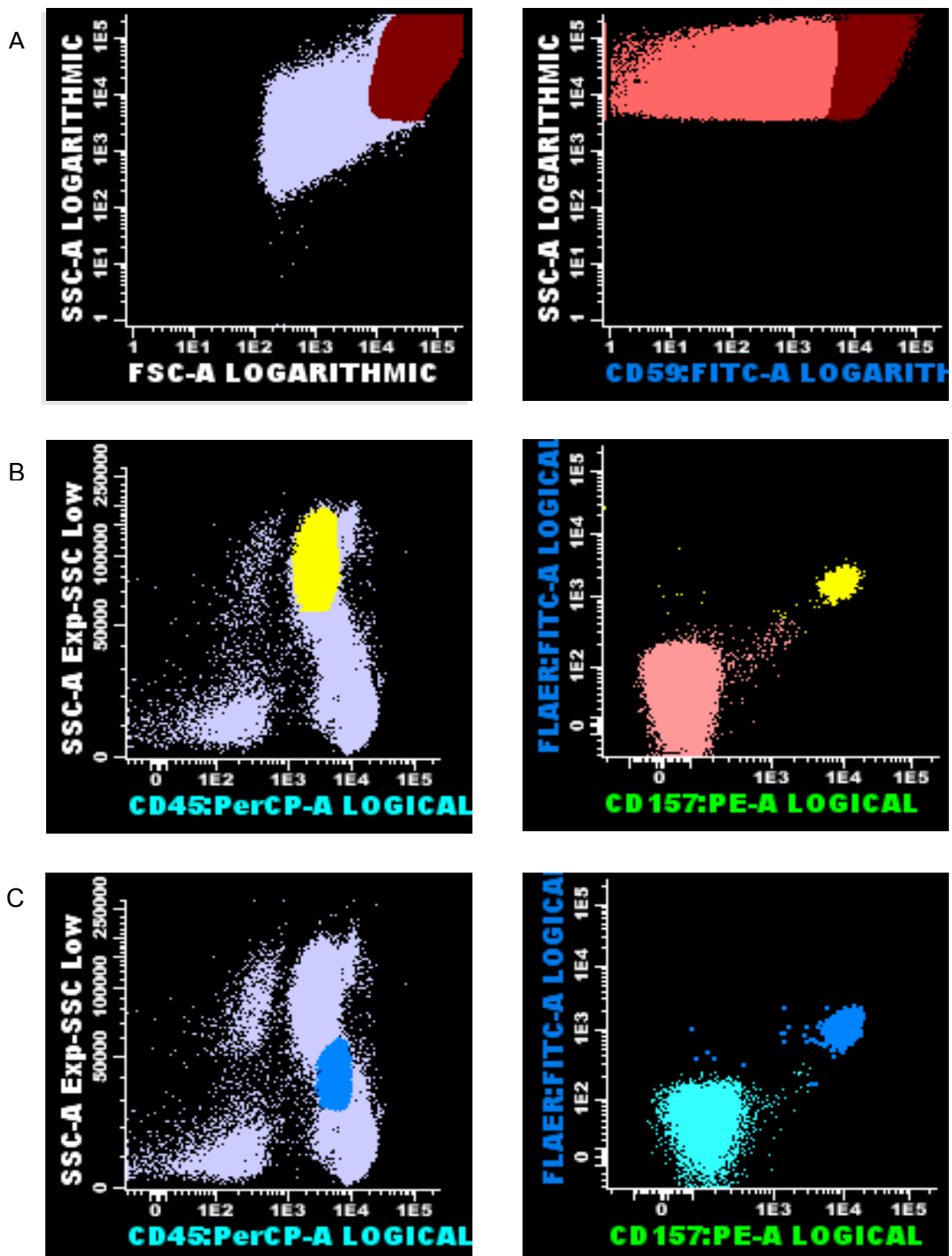


Figura 1. Detecção de células GPI-AP deficientes em paciente com HPN: 71,3% de clone HPN em eritrócitos (A), 94,2% de clone HPN em neutrófilos (B) e 88,1% de clones HPN em monócitos (C).

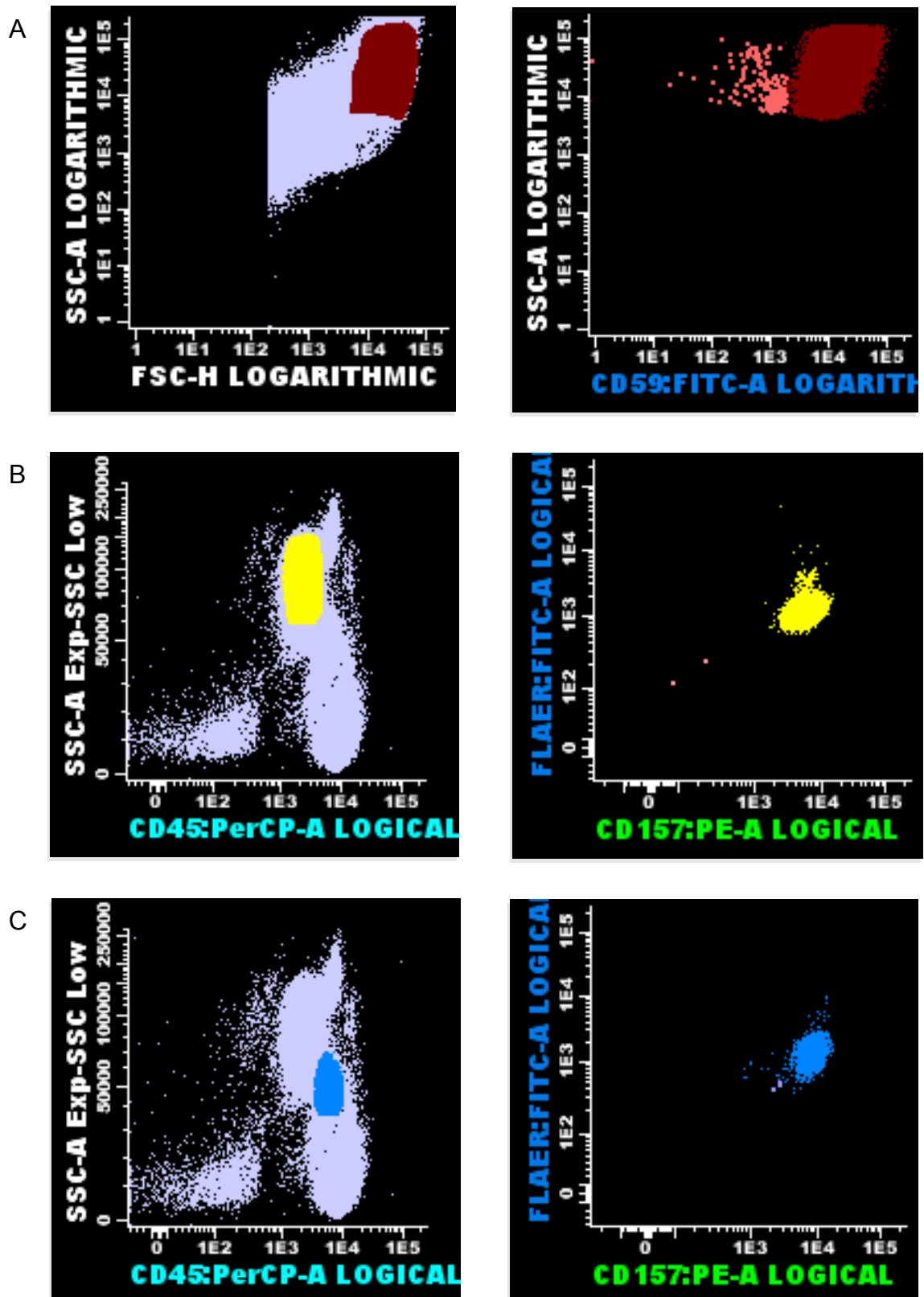


Figura 2. Detecção de células GPI-AP deficientes em paciente normal: 0,03% de células com fenótipo HPN em eritrócitos (A), sem detecção de células com fenótipo HPN em neutrófilos (B) e 0,08% de células com fenótipo HPN em monócitos (C).

Tabela 1. Características laboratoriais e tamanho de clones dos grupos HPN, AA/SMD, trombose e normal.

	HPN (n=18)	AA/SMD (n=30)	Trombose (n=10)	Normal (n=45)	Valor de P
Idade (anos)	39,0 (21,5-50,0)	34,0 (19,0-60,0)	32,5 (14,5-49,5)	29,0 (24,5-37,5)	<i>P</i> =0,754
Hemoglobina (g/dL)	8,7 (7,1-10,4)	8,3 (6,9-10,2)	12,1 (9,9-13,5)	14,3 (13,1-15,3)	<i>P</i> <0,001
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	2,8 (2,01-4,7)	3,3 (2,1-4,5)	8,4 (5,2-12,4)	6,3 (5,3-7,6)	<i>P</i> <0,001
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	56,0 (18,7-132,7)	28,0 (16,7-123,0)	248,5 (145,2-396,7)	263 (222-291,5)	<i>P</i> <0,001
Reticulócitos/uL	100350 (80050-140825)	47050 (21750-135975)	-	-	<i>P</i> =0,534
LDH (U/L)	683,0 (405,0-1175,5)	385,0 (291,5-505,2)	-	-	<i>P</i> =0,02
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,5 (0,3-0,9)	0,5 (0,2-1,1)	-	-	<i>P</i> =0,311
Tamanho do clone (%)					
Neutrófilos	18,70 (1,70-94,90)	0,17 (0,07-0,62)	0,15 (0,01-0,35)	0,08 (0,00-0,16)	<i>P</i> <0,001
Monócitos	18,80 (3,80-92,20)	0,50 (0,10-0,90)	0,20 (0,08-0,95)	0,13 (0,02-0,35)	<i>P</i> <0,001
Eritrócitos	3,50 (0,40-42,20)	0,10 (0,06-0,30)	0,10 (0,01-0,30)	0,04 (0,02-0,09)	<i>P</i> <0,001

HPN: hemoglobinúria paroxística noturna; AA: anemia aplásica; SMD: síndrome mielodisplásica; LDH: lactato desidrogenase. Os dados estão expressos em mediana e percentis (25 e 75). Significância para *p*<0,05.