

Estudo Pioneiro sobre a Presença de Clone de Hemoglobinúria Paroxística Noturna durante Acompanhamento Terapêutico de Leucemia Aguda

doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2021v67n3.1228>

Pioneering Study about the Presence of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clone during Therapeutic Monitoring of Acute Leukemia

Estudio Pionero sobre la Presencia de un Clon de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna durante el Seguimiento Terapêutico de la Leucemia Aguda

Eduardo dos Santos Martins Filho¹; Lacy Cardoso de Brito Junior²; Murilo Chermont Azevedo³; Ana Paula Silveira Paixão⁴; Debora Monteiro Carneiro⁵; Matheus Holanda Nascimento (in memoriam)⁶

RESUMO

Introdução: O potencial de transformação maligna de células-tronco hematopoiéticas portadoras de mutações no gene glicosilfosfatidilinositol classe A (*PIG-A*) para leucemias agudas, embora raro, já é bem descrito na literatura. **Objetivo:** Neste estudo, porém, buscou-se evidenciar pela primeira vez na literatura o surgimento ou a manutenção de clones de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) em pacientes diagnosticados com leucemia aguda ou ainda após o início do tratamento quimioterápico. **Método:** A pesquisa de clones de HPN foi realizada por citometria de fluxo em blastos, hemácias, granulócitos ou monócitos de 47 amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes submetidos à investigação diagnóstica ou acompanhamento terapêutico, provenientes de dois hospitais oncológicos e públicos de Belém, no período de dezembro de 2017 a dezembro de 2018. **Resultados:** A presença de clones de HPN foi observada em 19/47 (40,4%) amostras de pacientes, em investigação diagnóstica ou acompanhamento terapêutico, que realizaram pelo menos um estudo de acompanhamento terapêutico e ainda tiveram o surgimento ou a manutenção do clone de HPN mesmo após iniciado o tratamento quimioterápico. **Conclusão:** Foi possível evidenciar, de forma primária, a presença de clones de HPN em pacientes diagnosticados com leucemia aguda tanto no período de investigação diagnóstica como durante o acompanhamento terapêutico, independentemente da ontogenia celular. Sem, porém, que se possa ainda avaliar a importância da presença desses clones de HPN para a evolução da doença primária, prognóstico ou necessidade de tratamento específico.

Palavras-chave: Hemoglobinúria Paroxística/diagnóstico; Hemoglobinúria Paroxística/tratamento farmacológico; Leucemia/diagnóstico; Doença Aguda.

ABSTRACT

Introduction: The potential for malignant transformation of hematopoietic stem cells carrying mutations in the glycosylphosphatidylinositol class A (*PIG-A*) gene for acute leukemias, although rare, is already well described in the literature. **Objective:** In this study, however, it was attempted to show for the first time in the literature the emergence or maintenance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clones in patients diagnosed with acute leukemia or even after the beginning of the chemotherapy treatment. **Method:** The search of PNH clones was performed by flow cytometry in blasts, erythrocytes, granulocytes or monocytes of 47 samples of peripheral blood and bone marrow from patients undergoing diagnostic investigation or therapeutic follow-up in two oncological and public hospitals in Belém, from December 2017 to December 2018. **Results:** The presence of PNH clones was observed in 19/47 (40.4%) patient samples, in diagnostic investigation or therapeutic follow-up, who participated of at least one therapeutic follow-up study and still experience the appearance or maintenance of the PNH clone even after the beginning of the chemotherapy treatment. **Conclusion:** Primarily, it was possible to demonstrate the presence of PNH clones in patients diagnosed with acute leukemia both during the diagnostic investigation period and therapeutic follow-up, regardless of cell ontogeny. However, the importance of the presence of these PNH clones for the evolution of the primary disease, prognosis or need for specific treatment was not evaluated yet.

Key words: Hemoglobinuria, Paroxysmal/diagnosis; Hemoglobinuria, Paroxysmal/drug therapy; Leukemia/diagnosis; Acute Disease.

RESUMEN

Introducción: El potencial de transformación maligna de las células madre hematopoyéticas que portan mutaciones en el gen glicosilfosfatidilinositol (GPI) clase A (*PIGA*) para las leucemias agudas, aunque raro, ya está bien descrito en la literatura. **Objetivo:** En este estudio, sin embargo, buscamos mostrar por primera vez en la literatura la aparición o mantenimiento de clones de HPN en pacientes diagnosticados de leucemia aguda o incluso después del inicio de la quimioterapia. **Método:** La investigación de clones de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) se realizó mediante citometría de flujo en blastos, eritrocitos, granulocitos o monocitos de 47 muestras de sangre periférica y médula ósea de pacientes sometidos a investigación diagnóstica o seguimiento terapéutico de dos hospitales oncológicos y públicos de Belém, durante el período de diciembre de 2017 a diciembre de 2018. **Resultados:** La presencia de clones HPN se observó en 19/47 (40,4%) muestras de pacientes, en investigación diagnóstica o seguimiento terapéutico, que realizaron al menos un estudio de seguimiento terapéutico y aún tenían la aparición o mantenimiento del clon HPN incluso después de iniciado el tratamiento de quimioterapia. **Conclusión:** Se pudo evidenciar, de forma primaria, la presencia de clones de HPN en pacientes diagnosticados de leucemia aguda tanto durante el período de investigación diagnóstica como durante el seguimiento terapéutico, independientemente de la ontogenia celular. Sin embargo, no podemos todavía evaluar la importancia de la presencia de estos clones de HPN para la evolución de la enfermedad primaria, el pronóstico o la necesidad de un tratamiento específico.

Palabras clave: Hemoglobinuria Paroxística/diagnóstico; Hemoglobinuria Paroxística/tratamiento farmacológico; Leucemia/diagnóstico; Enfermedad Aguda.

¹Fundação Hemopa. Belém (PA), Brasil. E-mail: esm.filho@bol.com.br. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-7876-0582>

²Universidade Federal do Pará (UFPA). Instituto de Ciências Biológicas. Laboratório de Patologia Geral - Imunopatologia e Citologia. Belém (PA), Brasil. E-mail: lcdbrito2@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-9102-5817>

^{3,4,6}UFPA. Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo. Belém (PA), Brasil. E-mails: muriloaz@gmail.com; apsp17@gmail.com; matheusnh97@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-5924-4152>; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0003-3827-507X>; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-9351-2918>

⁵Hospital Ophir Loyola. Belém (PA), Brasil. E-mail: debbybio@gmail.com. Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0003-2199-4246>

Endereço para correspondência: Lacy Cardoso de Brito Júnior. Instituto de Ciências Biológicas. Laboratório de Patologia Geral - Imunopatologia e Citologia da UFPA. Av. Augusto Corrêa, 1 - Guamá. Belém (PA), Brasil. CEP 66075-900. E-mail: lcdbrito@ufpa.br ou lcdbrito@bol.com.br



INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma desordem clonal rara de células-tronco hematopoéticas que decorre da mutação somática do gene glicosilfosfatidilinositol (GPI – *glycosylphosphatidylinositol*) classe A (*PIG-A*) e que tem como consequência o bloqueio da síntese da âncora de GPI que, por sua vez, é responsável por manter aderidas à membrana plasmática dezenas de proteínas com funções específicas para as células, como, por exemplo, a ancoragem de proteínas reguladoras do sistema complemento. Assim, a deficiência da âncora de GPI, em diversos tipos celulares, tem como consequência clínica o surgimento de quadros de anemia hemolítica crônica, falência medular e manifestações trombóticas em sítios não habituais¹⁻⁷.

Em relação à gênese da HPN, já foram identificadas mais de 180 mutações no gene *PIG-A*, com a maioria dessas mutações associadas a pequenas inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos que acabam por resultar em alteração da matriz de leitura (*frameshift*) desse gene e por ocasionar a terminação precoce da transcrição, e consequente bloqueio do processo normal de síntese da molécula de GPI^{1,4,6,8-11}.

O mecanismo exato que leva à expansão clonal das células HPN ainda é incerto. Hoje, o mecanismo mais aceito para essa expansão clonal de células HPN baseia-se na “hipótese dos dois passos”: no primeiro, ocorre a mutação somática no gene *PIG-A* sem a geração de expansão clonal; e, no segundo passo, há ação de um ou mais fatores externos ambientais que exercem pressão seletiva em favor da expansão do clone HPN. Sendo essa expansão clonal também favorecida pelo fato de que as células deficientes de proteínas ancoradas pela GPI parecem ser mais resistentes ao ataque imune exercido por células T e natural killer (NK) na medula óssea^{8,10-14}.

Diversos estudos na literatura têm mostrado também que portadores de clone HPN apresentam mutações somáticas em outros genes, além do gene *PIG-A*, e que frequentemente estes estão associados a processos celulares de crescimento, diferenciação celular e regulação da apoptose, e que também são frequentes na gênese de diversas neoplasias hematológicas¹¹⁻¹⁶. Sendo esse estado de hipermutabilidade da célula portadora do clone HPN o principal fator que associa o clone HPN com a capacidade de expansão e transformação maligna dessas células^{8,9,15-20}.

Essa capacidade de transformação maligna das células portadoras do clone HPN para leucemias agudas então, embora rara, há muito vem sendo relatada na literatura^{8,14,15}. Contudo, pouco tem sido descrito quanto à presença de clones HPN “silenciosos” em portadores de leucemias agudas²¹ e menos ainda com relação à

capacidade de persistência desses clones mesmo após iniciado o acompanhamento terapêutico. Assim, o objetivo deste estudo foi evidenciar pela primeira vez na literatura a manutenção de clones de HPN em pacientes diagnosticados com leucemia aguda mesmo após o início do tratamento quimioterápico.

MÉTODO

Estudo prospectivo com amostras de sangue periférico e medula óssea de 47 pacientes, ambos os sexos, atendidos nos Hospitais: Ophir Loyola (HOL) e Oncológico Infantil Dr. Octávio Lobo (HOIOL), no período de dezembro de 2017 a dezembro de 2018, para investigação diagnóstica para leucemias agudas ou acompanhamento terapêutico e pesquisa de clones HPN por citometria de fluxo, independentemente da presença de hemólise, trombose ou qualquer outra alteração clínica associada à HPN. Todos esses procedimentos foram realizados em um laboratório particular de Belém, Pará, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pública Estadual Hospital de Clínica Gaspar Vianna, parecer nº. 732.668, de 22 de maio de 2014.

Foram incluídas amostras de pacientes de ambos os sexos, de qualquer faixa etária, que foram atendidos nos hospitais oncológicos HOL e HOIOL. Esses pacientes precisavam necessariamente estar em investigação diagnóstica ou já terem iniciado o tratamento quimioterápico (acompanhamento terapêutico) para leucemia aguda. Para participarem deste estudo, os pacientes ou seus responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram excluídas amostras coaguladas, com volume inferior a 1 ml e de pacientes que tiveram diagnóstico de outros tipos de doenças onco-hematológicas ou que não aceitaram participar do estudo.

Para todas as amostras, foram confeccionados esfregaços para análise morfológica e seu posterior processamento para diagnóstico ou acompanhamento terapêutico das leucemias agudas. O processamento das amostras foi realizado pela adição de 100 µL da amostra a ser investigada em tubos cônicos, acrescidos de 7 µL de diferentes combinações de anticorpos monoclonais comerciais – pan-hematopoético: CD34, CD45, HLA-DR; linfócitos B: CD19, CD10, CD20, CD22, CD79a, TdT, IgG1, IgG1, IgM, antikappa e antilambda; linfócitos T e NK: CD5, CD7, CD2, CD1a, CD3, CD4, CD8, CD56; ou mielóides: CD13, CD33, CD117, CD61, CD14, CD64, CD11b, glicoforina A, CD42a, MPO – marcados com FITC, PE, PerCP e APC, mais lise de hemácias ou permeabilização, incubação no escuro por dez minutos, com duas centrifugações e duas lavagens

sucessivas com tampão fosfato (PBS). Posteriormente, foi realizada a aquisição e análise de 100 mil eventos em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™, com BD CellQuest™ Pro *software* (BD, San Jose, CA, EUA), para quatro cores.

Para a pesquisa de clones HPN em amostras de pacientes em investigação diagnóstica ou em acompanhamento terapêutico com doença em atividade, foi utilizado o painel de anticorpos FLAER/CD59PE/CD45Per-Cy5 para o estudo em populações de blastos leucêmicos, e o uso do painel CD235FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5 para o estudo em hemácias. Já para as amostras de pacientes em acompanhamento terapêutico livres de doença, utilizou-se a combinação de anticorpos proposta por Borowitz et al.²²: FLAER/CD15PE/CD45Per-Cy5/CD24APC para granulócitos, FLAER/CD14PE/CD45Per-Cy5/CD64APC para monócitos e CD235FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5 para hemácias. Com todas as amostras sendo submetidas à aquisição e à análise de 250 mil eventos.

Foram aplicados métodos descritivos para a determinação de frequências, máximos, mínimos e medianas, por meio da utilização do *software* BioEstat 5.0.

RESULTADOS

Do total de casos analisados, 42/47 (89,4%) foram de amostras de pacientes em investigação diagnóstica que, conforme decisão médica, foram submetidas a um ou até quatro estudos sequenciais de acompanhamento terapêutico e que, após concordância dos participantes ou seus responsáveis, foram também submetidos à pesquisa de clones HPN; enquanto apenas 5/47 (10,6%) das amostras foram de pacientes que já se encontravam em acompanhamento terapêutico e que também foram submetidos a estudo sequencial e à pesquisa de clones HPN.

Desse total, 30/47 (63,83%) das amostras eram de indivíduos do sexo masculino; 17/47 (36,17%) do sexo feminino; e 29/47 (61,7%) eram de amostras de indivíduos na faixa etária de zero a 17 anos. Entre as leucemias agudas de maior frequência, a leucemia/linfoma linfoblástico de células pré-pré-B foi observada em 18/47 (38,4%) das amostras e a leucemia mieloide aguda em 14/47 (29,79%) das amostras analisadas (Tabela 1).

A presença de clones HPN foi observada em 24/42 (57,1%) das amostras de pacientes em investigação diagnóstica, independentemente do tipo de leucemia (Tabela 2). Entre essas amostras, as maiores frequências de clones HPN foram observadas em pacientes diagnosticados com leucemia mieloide aguda com 11/14 (78,5%) casos, e de leucemia/linfoma linfoblástico de células pré-pré-B com 8/17 (47%) dos casos.

Tabela 1. Frequência de leucemias agudas em relação ao total de pacientes estudados, independentemente da idade, atendidos em dois hospitais oncológicos. Belém-Pará, Brasil, dezembro de 2017 a dezembro de 2018

Diagnóstico Inicial	Amostra (#)	Porcentagem (%)
LLA pré-pré-B	18	38,4
LLA pré-B	5	10,2
LMA	14	29,9
LLA-T	3	6,5
Leucemia bilinhagem	2	4,4
Diagnóstico não realizado neste estudo	5	10,6
TOTAL	47	100

Legendas: LLA: leucemia/linfoma linfoblástico de células B ou de células T; LMA: leucemia mieloide aguda.

(#) valor absoluto.

(%) valor percentual.

Em seguida, foi realizada a estratificação da população de pacientes que participaram de pelo menos um estudo sequencial de acompanhamento terapêutico e da pesquisa para verificar a presença de clones HPN (Quadro 1), perfazendo um total de 19/47 (40,4%) das amostras analisadas. Destas, 15/19 (79%) eram de pacientes em investigação diagnóstica que também realizaram estudo sequencial de acompanhamento terapêutico e apresentaram clone HPN em pelo menos um dos estudos de acompanhamento e 4/19 (21%) eram de amostras de pacientes que foram incluídos no estudo mesmo sem a pesquisa de clones de HPN ao diagnóstico, mas que apresentaram clone HPN no estudo sequencial de acompanhamento terapêutico.

Ainda em relação às amostras de pacientes que foram submetidos a estudo de acompanhamento terapêutico e à pesquisa de clone HPN, observou-se que 8/19 (42,1%) pacientes tinham realizado apenas um estudo de acompanhamento terapêutico com 15 dias após o início da quimioterapia (Quadro 1), e que todos que estavam em avaliação diagnóstica apresentavam clones de HPN durante essa avaliação em blastos e hemácias (2/8), assim como todos os pacientes que estavam em acompanhamento terapêutico, independentemente da presença de doença em atividade ou não, também apresentavam clones de HPN em granulócitos, monócitos e hemácias (6/8).

Observou-se também que apenas 8/19 (42,1%) dos pacientes realizaram dois estudos de acompanhamento terapêutico, com 15 e 30 dias após o início da quimioterapia, e que todos apresentaram clone HPN em suas amostras durante essa 2ª avaliação (30 dias) de

Tabela 2. Representação do total de pacientes diagnosticados com leucemia aguda em investigação diagnóstica em relação ao sexo, idade (mínimo, máximo e mediana) e presença e tamanho do clone HPN (>1%) em blastos. Belém-Pará, Brasil, dezembro de 2017 a dezembro de 2018

Tipo de leucemia	Pacientes/sexo	Idades (Min-Máx)	Mediana de idades (anos)	Total de portadores de clone HPN (#)	Tamanho do clone HPN (Min%-Máx%)
LMA	11M/3F	7 – 79	31	11	3,06 – 99,36
LLA-T	3M/1F	5 – 19	14	1	85,81
LLA pré-pré-B	10M/7F	2 – 69	7	8	1,22 – 99,22
LLA pré-B	3M/2F	3 – 76	5	2	5,6 – 90,33
Leucemia bilinhagem	1M/1F	13 – 32	22,5	2	8,68 – 97,0
TOTAL	42	--	--	24	--

Legendas: LLA: leucemia/linfoma linfoblástico de células B ou de células T; LMA: leucemia mieloide aguda; M: masculino; F: feminino; Min: Mínimo; Máx: Máximo. (#) valor absoluto. (%) valor percentual.

Quadro 1. Pesquisa da presença de clone HPN e/ou atividade da doença primária em pacientes durante o diagnóstico inicial ou em acompanhamento terapêutico em atendimento em dois hospitais oncológicos. Belém-Pará, Brasil, dezembro de 2017 a dezembro de 2018

Paciente	Sexo	Idade	Diagnóstico inicial		1º Acompanhamento terapêutico		2º Acompanhamento terapêutico		3º Acompanhamento terapêutico		4º Acompanhamento terapêutico	
			Diagnóstico da leucemia aguda	Clone HPN	Leucemia em atividade	Clone HPN	Leucemia em atividade	Clone HPN	Leucemia em atividade	Clone HPN	Leucemia em atividade	Clone HPN
1	M	16	LLA pré-pré B	-	-	-	-	+				
2	F	7	LLA pré-pré B	-	-	+						
3	M	3	LLA pré-pré B	-	-	+	-	+				
4	M	7	LLA pré-pré B	-	-	-	-	+				
5	M	9	LLA pré-pré B	+	-	+	-	+				
6	M	14	LLA pré-pré B	+	+	+	-	+				
7	F	7	LLA pré-pré B CD33 +	+	-	+	-	+				
8	F	13	LLA pré-pré B		-	+						
9	M	3	LLA pré-B	-	-	+	-	+	-	+		
10	F	5	LLA pré-B	-	-	+						
11	M	7	LMA	+	-	+						
12	F	13	LMA	+	+	+	-	+	-	+		
13	M	8	LMA	-	-	+						
14	M	62	LMA	-	+	+						
15	M	13	LLA T	-	-	+	-	+				
16	M	19	LLA T	-	-	+						
17	F	15	LLA T	+	-	+						
18	F	2	LLA*		+	+	+	+	+	-	-	+
19	F	4	LLA*		-	-	-	+				

Legendas: LLA: leucemia/linfoma linfoblástico de células B ou de células T; LMA: leucemia mieloide aguda; M: masculino; F: feminino.

(-) pesquisa negativa para clone de HPN.

(+) e (tarja cinza): pesquisa positiva para clone de HPN.

(*) Pacientes sem definição do tipo de leucemia/linfoma linfoblástico de células B ou de células T.

acompanhamento terapêutico, mesmo sem atividade da doença primária, em granulócitos, monócitos e hemácias (Quadro 1). E ainda que, dessas amostras, 3/8 (37,5%) apresentavam clone HPN ao diagnóstico e nos dois estudos de acompanhamento terapêutico.

Somente 2/19 (10,5%) pacientes realizaram três estudos de acompanhamento terapêutico e em ambos os casos suas amostras apresentaram clone HPN nos três períodos analisados, independentemente da presença de clone HPN durante a investigação diagnóstica. Apenas 1/19 (5,3%) paciente realizou quatro estudos de acompanhamento terapêutico consecutivos, sendo observada a presença de clone HPN em três períodos do estudo, porém, não de forma contínua (Quadro 1).

Quanto ao tamanho do clone de HPN nesses grupos de pacientes, foi observado que, para aqueles que realizaram apenas um estudo de acompanhamento terapêutico (8/19), o tamanho do clone HPN variou de 2,36 – 70,9% em granulócitos, de 7,24 – 89,4% em monócitos e de 2,8 – 62,7% em hemácias, independentemente do tipo de leucemia. Já nos pacientes que realizaram dois estudos de acompanhamento terapêutico (8/19), o tamanho do clone HPN variou de 1,38 – 50,9 em granulócitos, de 11,6 – 75,7% em monócitos, e de 3,3 – 81,3% em hemácias, independentemente do tipo de leucemia. E, nos pacientes que realizaram até três estudos de acompanhamento terapêutico (2/19), o tamanho do clone HPN variou de 3,97 – 10,1% em granulócitos, de 40,3 – 64,6% em monócitos, e de 12,4 – 14,2% em hemácias.

DISCUSSÃO

O potencial de transformação maligna de células-tronco hematopoiéticas portadoras de mutações no gene *PIG-A* para leucemias agudas, embora raro, já é bem descrito na literatura mundial^{5,6,8,9,13,14}. Contudo, Araten e Luzzatto¹⁶, Araten et al.¹⁵ e Inoue et al.¹⁷ sugerem que, para essa transformação maligna, as células-tronco hematopoiéticas portadoras de mutações no gene *PIG-A* deveriam passar por um segundo evento; isto é, mutações adicionais em outros genes, como por exemplo, *BCR-ABL*¹⁹, *HMGA*², *JAK2V617F* e *NRAS*¹⁸ na mesma população celular. Gerando assim vantagem à expansão e à transformação clonal das células portadoras de mutações no gene *PIG-A*²⁰.

Traulsen et al.¹² e Dingli et al.¹³, em seus estudos, sugerem ainda que a segunda mutação em células-tronco hematopoiéticas portadoras de mutações no gene *PIG-A* e a consequente transformação leucêmica na HPN são exceção e não regra nesses grupos celulares⁹.

No presente estudo, contudo, não se buscou mostrar o potencial de transformação maligna de células-tronco

hematopoiéticas portadoras de mutações no gene *PIG-A* para uma leucemia aguda, mas sim a presença, a manutenção ou o surgimento de clones HPN de tamanhos variados e em diversos tipos celulares em pacientes que já tinham leucemia aguda durante a investigação diagnóstica em blastos e hemácias, ou após iniciado o tratamento quimioterápico em granulócitos, monócitos ou hemácias, conforme também descrito em outro estudo do nosso grupo²¹.

Mon Pèrre et al.²³, utilizando um modelo matemático, mostraram que o tamanho do clone HPN está diretamente relacionado não somente ao aumento da probabilidade de expansão clonal das células portadoras de mutações no gene *PIG-A*, mas também é determinante para a definição da apresentação clínica da doença em suas formas clínica, subclínica ou de extinção do clone. Assim, neste estudo, os autores propõem que a probabilidade de um indivíduo desenvolver HPN na forma clínica aumenta com a idade²⁴ e depende também do número total de células-tronco portadoras de mutações no gene *PIG-A* (>20%). Esses resultados mostram semelhanças aos achados da prática clínica.

Nos estudos aqui apresentados, porém, mesmo quando foram observados clones HPN de grande tamanho em amostras de pacientes ao diagnóstico ou durante o acompanhamento terapêutico, esses pacientes não demonstraram evidências clínicas de HPN como: trombose venosa profunda em sítios não habituais, insuficiência renal crônica, insuficiência hepática ou falência medular dissociada da leucemia.

A hipótese inicial é de que os clones HPN observados nas amostras de pacientes diagnosticados ou em acompanhamento terapêutico para leucemias agudas estão na forma de clones “silenciosos” ou “latentes”, sem repercussão clínica, e são fruto do estado de hipermutabilidade típico das leucemias. Estando assim, em alguns casos, possivelmente relacionados apenas ao processo de expansão da neoplasia. Contudo, este é o primeiro estudo que mostra a presença de clones HPN em várias fases do processo de acompanhamento terapêutico de pacientes com leucemias agudas; então, ainda não é possível afirmar se, para esses pacientes portadores de clone HPN “silencioso”, seria necessária ou não, no futuro, a adoção de esquemas quimioterápicos que incorporem drogas específicas para o tratamento da HPN.

Araten et al.¹⁵, em seus estudos, utilizando o gene *PIG-A* como gene sentinela para mutações somáticas espontâneas, observaram indícios de hipermutabilidade em blastos leucêmicos de crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda. Esses autores observaram duas populações distintas de células leucêmicas em relação ao fenótipo HPN: uma com a taxa de mutação próxima ao grupo controle e outra

população apresentando taxa de mutação cerca de 50 vezes maior do que a do grupo controle, e associaram o estado de hipermutabilidade dessas células hipoteticamente com a maior probabilidade desse número de mutações ser um fator importante para o surgimento da leucemia.

Quanto à necessidade de tratamento nesses pacientes, Lanza et al.²⁵ mostraram um relato de caso de paciente com diagnóstico inicial de síndrome mielodisplásica (SMD) e que, durante o curso da doença, apresentou clone HPN grande e evolução para linfoma difuso de grandes células B, sendo obrigatório o tratamento da HPN com ecuzimab em associação à quimioterapia específica. Por sua vez, Li et al.²⁶ mostraram que a presença de clone HPN grande em paciente adulto, 52 anos, portador de leucemia mieloide crônica não exigiu a mesma necessidade de tratamento específico para HPN. Não havendo assim, até o momento, consenso na literatura sobre a necessidade ou não de tratamento específico para portadores de doenças onco-hematológicas na presença de clone HPN.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível observar, pela primeira vez na literatura, a presença de clones de HPN em pacientes diagnosticados com leucemia aguda tanto no período de investigação diagnóstica como durante o acompanhamento terapêutico, e ainda os surgimentos desses clones somente após ter sido iniciado o tratamento quimioterápico, independentemente da ontogenia celular. Fato que sugere a necessidade de novos estudos que possam evidenciar como a presença desses clones HPN podem influenciar no prognóstico, risco de recaída e mesmo na necessidade ou não de tratamento adicional para esses pacientes.

CONTRIBUIÇÕES

Lacy Cardoso de Brito Junior contribuiu na concepção e desenho do estudo; análise e interpretação dos dados; e na redação e revisão crítica com contribuição intelectual. Eduardo dos Santos Martins Filho, Murilo Chermont Azevedo, Ana Paula Silveira Paixão, Debora Monteiro Carneiro e Matheus Holanda Nascimento contribuíram na concepção e no planejamento do estudo; e na análise e interpretação dos dados. Todos os autores aprovaram a versão final a ser publicada.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fundação Amazônia de Amparo a Estudo e Pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;(1):104-10. doi: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.104>
- Arruda MMAS, Rodrigues CA, Yamamoto M, et al. Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(2):214-21. doi: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000200022>
- Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106(12):3699-3709. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1717>
- Devalet B, Mullier F, Chatelain B, et al. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Hematol*. 2015;95(3):190-8. doi: <https://doi.org/10.1111/ejh.12543>
- Rosti V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2000;85(1):82-7.
- Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: stem cells and clonality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;(1):111-5. doi: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.111>
- Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur J Haematol*. 2009;83(6):503-11. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01338.x>
- Araten DJ, Bessler M, McKenzie S, et al. Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. *Leukemia*. 2002;16(11):2243-8. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402694>
- Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014;124(18):2804-11. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-522128>
- Schubert J, Röth A. Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: on the long way to understand the principles of the disease. *Eur J Haematol*. 2015;94(6):464-73. doi: <https://doi.org/10.1111/ejh.12520>
- Lee SC, Abdel-Wahab O. The mutational landscape of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria revealed: new insights into clonal dominance. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4227-30. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI77984>
- Traulsen A, Pacheco JM, Dingli D. On the origin of multiple mutant clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Stem Cells*. 2007;25(12):3081-4. doi: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0427>
- Dingli D, Pacheco JM, Traulsen A. Multiple mutant clones in blood rarely coexist. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2008;77(2):021915. doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.77.021915>

14. Shen W, Clemente MJ, Hosono N, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest.* 2014;124(10):4529-38. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI74747>
15. Araten DJ, Sanders KJ, Anscher D, et al. Leukemic blasts with the paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol.* 2012;181(5):1862-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.025>
16. Araten DJ, Luzzatto L. The mutation rate in PIG-A is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood.* 2006;108(2):734-6. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0256>
17. Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, et al. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood.* 2006;108(13):4232-6. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025148>
18. Mortazavi Y, Tooze JA, Gordon-Smith EC, et al. N-RAS gene mutation in patients with aplastic anemia and aplastic anemia/ paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during evolution to clonal disease. *Blood.* 2000;95(2):646-50. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V95.2.646>
19. Katagiri T, Tominaga R, Kataoka K, et al. A cure for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using molecular targeted therapy specific to a driver mutation. *Blood.* 2015;126(23):1215. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.1215.1215>
20. Mortazavi Y, Merk B, McIntosh J, et al. The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): a high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood.* 2003;101(7):2833-41. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2095>
21. Brito Júnior LC, Oliveira FR, Cardoso DA, et al. Presença de clones de hemoglobinúria paroxística noturna em portadores de leucemia aguda do estado do Pará, Amazônia, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2019;10:e201900021. doi: <https://doi.org/10.5123/S2176-6223201900021>
22. Borowitz MJ, Craig FE, Digioseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(4):211-30. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20525>
23. Mon Pèrè N, Lenaerts T, Pacheco JM, et al. Evolutionary dynamics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *PLoS Comput Biol.* 2018;14(6):e1006133. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006133>
24. Curran KJ, Kernan NA, Prockop SE, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric patients. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59(3):525-9. doi: <https://doi.org/10.1002/pbc.23410>
25. Lanza F, Lazzari MC, Brambilla P, et al. An unusual association of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, myelodysplastic syndrome, and diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma in a Caucasian man. *Ann Hematol.* 2016;95(9):1555-7. doi: <https://doi.org/10.1007/s00277-016-2728-5>
26. Li J, Azaad MA, Li Y. Possible evolution of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria into chronic myeloid leukemia: a rare transformation. *Open J Blood Diseases.* 2017;7(1):29-35. doi: <https://doi.org/10.4236/ojbd.2017.71003>

Recebido em 9/9/2020

Aprovado em 3/2/2021