



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

PRESENÇA DE CLONES DE HEMOGLOBINURIA
PAROXÍSTICA NOTURNA EM PORTADORES DE
LEUCEMIAS AGUDAS

EDUARDO DOS SANTOS MARTINS FILHO

Belém-Pará

2017

EDUARDO DOS SANTOS MARTINS FILHO

PRESENÇA DE CLONES DE HEMOGLOBINURIA
PAROXÍSTICA NOTURNA EM PORTADORES DE
LEUCEMIAS AGUDAS

Artigo científico apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Análises clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito

Belém-Pará

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F478p FILHO, EDUARDO DOS SANTOS MARTINS.
PRESENÇA DE CLONES DE HEMOGLOBINURIA
PAROXÍSTICA NOTURNA EM PORTADORES DE
LEUCEMIAS AGUDAS / EDUARDO DOS SANTOS MARTINS
FILHO. — 2017.
42 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Análises Clínicas, Belém, 2017.

1. Imunofenotipagem. 2. HPN. 3. Leucemias Agudas. I.
Título.

CDD 576.549

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar”.

Bertrand Russell

AGRADECIMENTOS

À Deus, o criador.

Ao meu orientador, Professor Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior, por sua confiança, dedicação e comprometimento na realização deste trabalho. Minha especial gratidão.

Ao Dr. Paulo Azevedo, pela disponibilização do setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Paulo Azevedo, para execução deste trabalho.

Ao Setor de Citometria de fluxo do Laboratório Paulo Azevedo, especialmente as funcionárias, Ana Paula e Débora, pela contribuição ao desenvolvimento deste trabalho.

À minha esposa Aurea Raylana, a melhor companheira de todas as horas, pelo incentivo e constante apoio.

Aos meus filhos, Eduardo Neto e Bernardo, por suportarem todos os meus momentos de tensão e minha falta de tempo para vocês!

Aos meus pais (in memorian) e irmãos, pelo apoio incondicional.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
REFERÊNCIAL TEÓRICO	8
HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA – DEFINIÇÃO.....	8
GENÉTICA DA HPN.....	9
CLASSIFICAÇÃO E DIAGNOSTICO DA HPN.....	10
EXPANSÃO CLONAL DAS CÉLULAS HPN	12
LEUCEMIAS AGUDAS.....	13
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA – LMA.....	13
LEUCEMIA LINFOIDE – LLA	15
1.3 INSTABILIDADE GENÉTICA <i>VERSUS</i> HIPERMUTABILIDADE <i>VERSUS</i> HPN <i>VERSUS</i> LEUCEMIAS	15
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
3. ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	23
ARTIGO CIENTÍFICO: PRESENÇA DE CLONES DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOTURNA EM PORTADORES DE LEUCEMIAS AGUDAS	25

ABREVIATURAS

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

HPN – Hemoglobinúria Paroxística Noturna

PIG-A – Phosphatidyl Inositol Glycan- class A

DAF – Decay Accelerating Factor

MIRL – Membrane Inhibitor of Reactive Lysis

FLAER – Fluorescent Aerolysin

OMS – Organização Mundial de Saúde

FAB – French American British

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da molécula de Glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e exemplos de proteínas ancoradas.

Figura 2 - Localização cromossômica do gene PIG-A.

Figura 3 - Biossíntese da molécula de GPI

Figura 4 - Identificação de clones HPN em granulócitos pela citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais CD55, CD59 e FLAER.

Figura 5 - Arquiteutura clonal e evolução de clones HPN

1. INTRODUÇÃO

REFERENCIAL TEÓRICO

- HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA - DEFINIÇÃO

A hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é uma rara forma de anemia hemolítica crônica, caracterizada por manifestações clínicas extremamente variáveis, decorrente da hemólise intravascular, eventos trombóticos e falência medular, resultando em sintomas tais como trombocitopenia, leucopenia ou ambos ^(1,2,7). Contudo, é a trombofilia a principal causa de morbi-mortalidade na HPN ^(1,2,3,5,7).

Apesar de relatos compatíveis com a doença desde 1873, esta só foi descrita pela primeira vez como síndrome clínica em 1882. Contudo, ainda hoje sua incidência exata é desconhecida, podendo ocorrer em qualquer idade, afetando homens e mulheres em igual proporção, sem predisposição familiar e com ocorrência de remissão espontânea em cerca de 10 a 15% dos pacientes. ^(1,2).

Quanto a sua causa, a HPN é referida como uma expansão clonal não maligna de uma ou mais células derivadas das células tronco hematopoiéticas a partir de mutação(ções) somática(s) adquirida(s) no gene PIG-A, cujo produto é necessário para a síntese da molécula Glicosilfosfatidil-Inositol (GPI) que serve de ancora para outras várias proteínas com funções específicas e em especial as que desempenham importante papel em relação ao controle do sistema complemento(fig.1). Contudo, estudos recentes tem também associado o surgimento destas mutações somáticas no gene PIG-A da HPN com outras doenças hematológicas, em especial às síndromes de insuficiência medular, como anemia aplástica e síndromes mielodisplásicas ^(1,2,3,4,5,6).

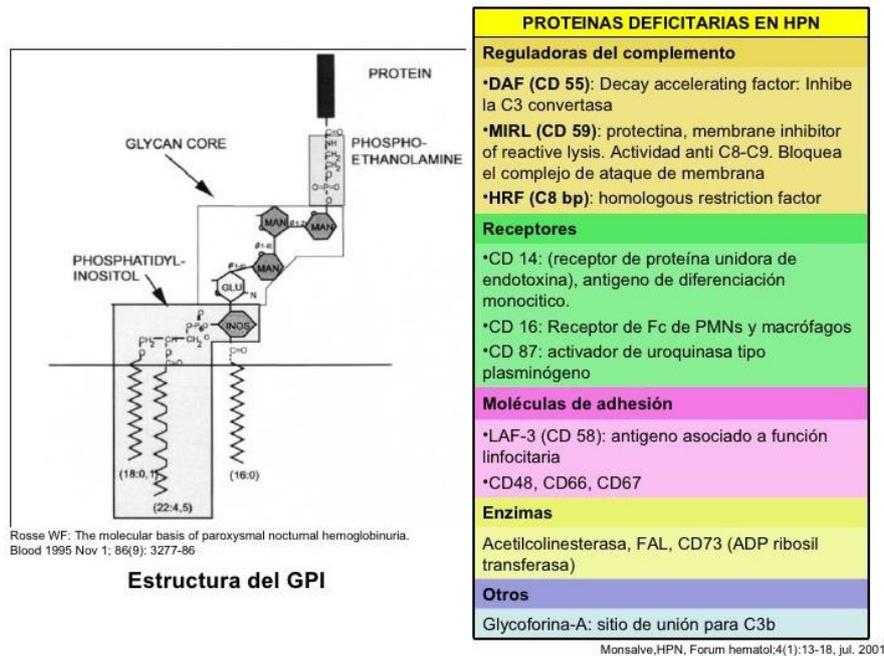


Figura 1. Estrutura da molécula de Glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e exemplos de proteínas ancoradas. Fonte: <https://pt.slideshare.net/Pupu/hemoglobinuria-paroxistica-nocturna?smtNoRedir=1>

- GENÉTICA DA HPN

O gene PIG-A humano, associado à gênese da HPN, está localizado no cromossomo X(Xp22.1) contendo 6 éxons e 5 íntrons com aproximadamente 17kb de extensão (Fig.2) (1,2,5). Este gene codifica uma proteína de 484 aminoácidos e peso molecular aproximado de 60 kD; Esta proteína localiza-se no retículo endoplasmático e é necessária para a atividade da alfa-1,6-N-acetilglucosaminiltransferase, enzima que participa da fase inicial da produção da molécula de Glicosilfosfatidilinositol- GPI (Fig.2) (5,6,7).

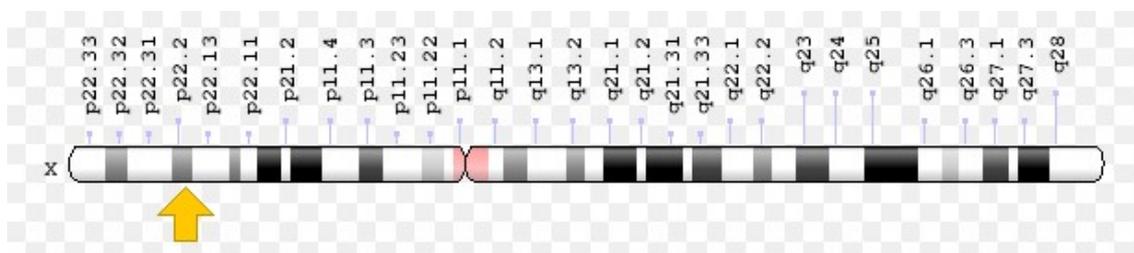


Figura 2. Localização cromossômica do gene PIG-A. Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIGA#location>

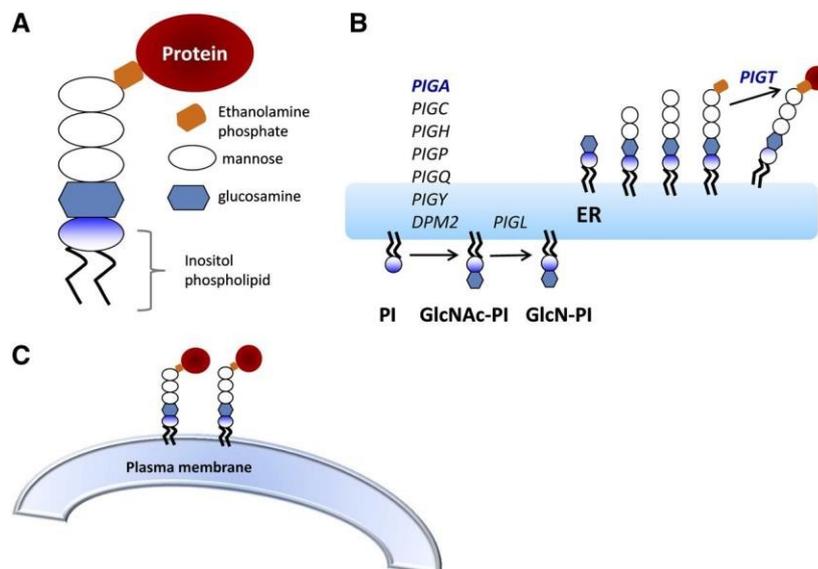


Figura 3. Biossíntese da molécula de GPI. (A) Estrutura central da ancora GPI. (B) A síntese inicia no retículo endoplasmático. PIG-A é uma das 7 subunidades envolvidas na etapa inicial da biossíntese da molécula GPI. (C) A molécula de GPI é transportada a membrana plasmática. Fonte: adaptado de BRODSKY, 2014.

Mutações neste gene, porém, resultam em bloqueio precoce da síntese das ancoras GPI, cuja função é manter aderidas à membrana plasmática, além de outras, as proteínas reguladoras do sistema complemento, dentre as quais destacamos o DAF (fator acelerador de degradação das convertases) e o MIRL (inibidor de lise reativa de membrana), também denominados CD55 e CD59, respectivamente. Desta forma, a ausência ou diminuição da expressão das proteínas CD55 e CD59 na superfície da membrana celular de leucócitos, hemácias e plaquetas torna-as vulneráveis a ação do sistema complemento o que leva ao surgimento de hemólise intravascular mediado pelo complemento, típica na HPN (1,2,3,4,5,6).

Atualmente mais de 180 mutações no gene PIG-A já foram identificadas em indivíduos portadores de HPN. A maioria destas mutações estão associadas a pequenas inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos neste gene, o que resulta em alteração da matriz de leitura (frameshift) do gene (PIG-A) ocasionando a terminação precoce da transcrição e conseqüentemente o bloqueio do processo normal de síntese da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (1,2,5,7).

- CLASSIFICAÇÃO E DIAGNOSTICO DA HPN

A classificação de portadores de HPN é estabelecida de acordo com as variadas manifestações clínicas da doença em três categorias: HPN Clássica; HPN associada a uma desordem medular (Anemia Aplástica); e HPN Sub-clínica. Na HPN Clássica, os pacientes apresentam evidencia clinica e laboratorial de hemólise intravascular, mas sem anormalidade medular; na HPN associada à desordem medular (Anemia Aplástica) os pacientes apresentam evidência clínica e laboratorial de hemólise com história conhecida ou não de falência medular; e na forma de HPN Sub-clínica não há evidência clínica e laboratorial de hemólise, mas com presença de síndromes de falência medular, particularmente anemia aplásica e anemia refratária (síndrome mielodisplásica).^(3,4).

Devido ao fato de a HPN ter sido reconhecida inicialmente como um tipo de anemia hemolítica, o foco inicial do diagnostico baseou-se então nas células vermelhas (hemácias) do sangue, o que levou ao desenvolvimento de exames que avaliam a hemólise dos eritrócitos quando estes eram submetidos a condições que normalmente não gerariam hemólise. Como exemplos, o teste da hemolisina acida (teste de Ham), onde a acidificação do plasma ativa o complemento e este hemolisava células sensíveis. Também o teste de lise por sacarose, no qual ha adição de sacarose ao soro, tinha como princípio a ativação da via clássica do complemento gerando hemólise de eritrócitos sensíveis. Atualmente a utilização da citometria de fluxo na análise de células do sangue periférico, com a utilização de um painel de anticorpos monoclonais específicos contra eritrócitos (CD235a, CD59), neutrófilos (FLAER, CD24, CD45, CD15) e monócitos (CD14, CD45, CD64, FLAER) tem se tornado o método de escolha no diagnostico de pacientes portadores de HPN. Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, e de rápida execução, capaz de determinar diretamente a porcentagem de células com expressão deficiente de moléculas de GPI na membrana. Estas células deficientes são denominadas de clones HPN e o seu tamanho determinado em forma de porcentagem(Fig.4)^(1,2,3,4,7,9,10,11).

Identification of large PNH clone by flow cytometry.
Granulocytes (red) in peripheral blood derived from PNH clone are negative for GPI-linked proteins and FLAER.

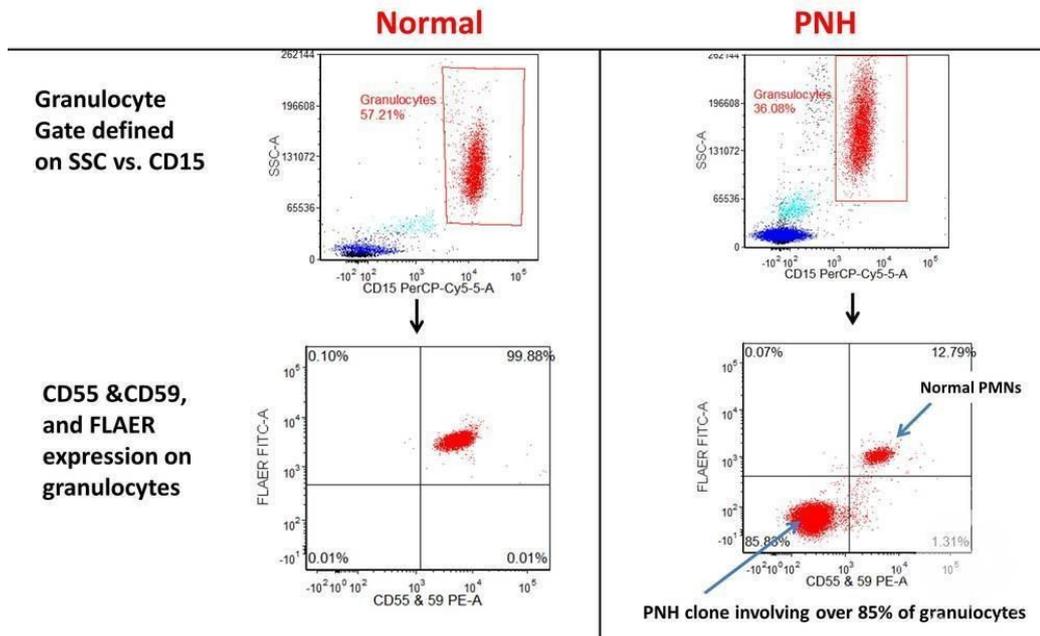


Figura 4. Identificação de clones HPN em granulócitos pela citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais CD55, CD59 e FLAER. Fonte: <https://imagebank.hematology.org/image/60121/paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria-pnh-flow-cytometry>

O FLAER (aerolisina fluorescente) é uma proteína de 52-kDa derivada da toxina bacteriana aerolisina, proveniente da bactéria *Aeromonas hydrophila*, e que se liga seletivamente e com alta afinidade a âncora da molécula GPI, resultando em aumento da sensibilidade e especificidade na detecção de células deficientes de GPI, mesmo estando estas células em pequena porcentagem. Gerando uma possibilidade de detecção de até uma célula derivada de um clone HPN dentre 10.000 células analisadas, tanto em pacientes normais como aqueles que apresentam algum tipo de desordem medular, principalmente anemia aplástica e síndrome mielodisplásica^(4,7).

- EXPANSÃO CLONAL DAS CÉLULAS HPN

O mecanismo exato que leva a expansão clonal das células HPN ainda é incerto. Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar esta expansão. A mais aceita é a hipótese dos “dois passos”, onde no primeiro ocorre a mutação somática no gene PIG-A, embora não sendo neste momento possível gerar expansão clonal; já no segundo passo, se faz necessário um ou mais fatores ambientais externos adicionais exercendo uma pressão seletiva em favor do clone HPN, como no caso de uma lesão medular o que por sua vez gera ativação de células T e NK. Existe evidencia experimental de que células deficientes de proteínas ancoradas pela GPI (clone HPN) sejam mais resistentes ao ataque por células NK e T, o que daria ao clone HPN uma vantagem adaptativa. O resultado seria uma medula óssea prejudicada com expansão de células PIG-A mutadas^(1,4,5). Porém estudos recentes forneceram uma nova perspectiva acerca do mecanismo patológico da expansão clonal na maioria dos pacientes HPN estudados. Tais estudos identificaram nestes pacientes, além da mutação do gene PIG-A, mutações somáticas em outros genes que frequentemente são associados ao crescimento e diferenciação celular e reguladores de apoptose, similares aos encontrados em neoplasias mieloides e que dessa forma estariam envolvidos na manutenção, expansão e evolução do clone HPN com possibilidade de transformação maligna (Fig.5) (12,13,14,15).

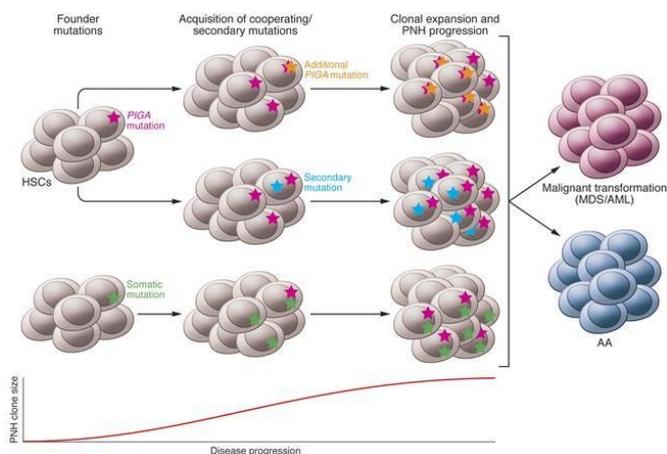


Figura 5. Arquitetura clonal e evolução de clones HPN. Fonte: Adaptado de LEE, S. & WAHAB, O. J Clin Invest: 2014;124(10):4227-4230

- LEUCEMIAS AGUDAS

As leucemias agudas (mieloides e linfoides) são doenças malignas de origem, na maioria das vezes, desconhecida, de evolução clínica rápida com infiltração extra-medular de baço, fígado e linfonodos, dependendo do tipo de leucemia aguda. Sendo estas doenças de características epidemiológicas, biológicas e clínicas próprias, e que tem como principais características laboratoriais o surgimento de células jovens (blásticas) no sangue periférico e na medula óssea, seguido de produção ineficiente de: glóbulos vermelhos, gerando anemia; de glóbulos brancos facilitando, infecções de repetição; e de plaquetas, possibilitando hemorragias. Com os blastos nestes casos apresentando expressão de marcadores fenotípicos linfóides e/ou mielóides, de imaturidade e/ou atípicos, além de alterações moleculares e citogenéticas^(16,17,18).

Até a década de 1970 as Leucemias agudas eram divididas em leucemias linfóides, não linfoides e monocíticas. Em 1976, foi lançada a classificação FAB baseada na morfologia dos blastos e nas reações enzimático-citoquímicas. Na década de 90 surgiu uma classificação subsidiada pela OMS e atualizada em 2008, que estratificou as doenças em diferentes categorias e as definiu de acordo com a combinação da morfologia, imunofenótipo, aspectos genéticos-moleculares e síndromes clínicas³⁸. Segundo a OMS 2008⁽¹⁶⁾, o diagnóstico das leucemias agudas deve ser feito baseado em achados clínicos, aspectos morfológicos, imunofenotípicos, moleculares e citogenéticos e pela presença maior ou igual a 20% de blastos na medula óssea ou sangue periférico. A depender destes critérios a LMA pode ser subdividida em vários subtipos cada uma delas com características clínico-laboratoriais e tratamento próprios. Enquanto as leucemias linfoblásticas agudas podem ser divididas conforme a ontogenia dos linfócitos B (Pro-B, B comum, Pré-B e B maduro) e T (Pré-T, T intermediárias e T maduras) também com características clínico-laboratoriais e tratamento próprios.

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA - LMA

As Leucemias Mieloides Agudas (LMA) são doenças de maior prevalência entre indivíduos adultos, geralmente após a quinta década de vida, e de menor frequência entre crianças, com apenas 15% dos casos. As LMAs frequentemente são o resultado de mutações, translocações, inversões e deleções de genes que regulam ciclo celular e a apoptose em células pluripotentes, ou progenitoras primárias, da medula óssea com consequente expressão de oncogenes associados à proliferação clonal anormal destas células progenitoras da linhagem mielóide. Tornando-as incapazes de atingir a diferenciação completa em função de bloqueio da diferenciação celular nas fases G0 ou G1 do ciclo, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais e gerando neutropenia, anemia, plaquetopenia e expansão da medula óssea pelo clone mielóide leucêmico^(16,17,19,20,22).

O mecanismo exato que leva estas células progenitoras mielóides a perderem o controle da proliferação e/ou diferenciação celular permanece incerto, porém, a heterogeneidade gerada por estas alterações associa-se diretamente ao surgimento de oito subtipos de LMA de comportamentos biológicos, respostas e tratamentos diferentes^(17,23).

As classificações hoje aceitas para os diversos subtipos de LMAs baseiam-se em critérios estabelecidos pela OMS (2008), a partir de características morfológicas e citoquímicas, imunológicas (imunofenotipagem) e citogenéticas associadas aos tipos de células mieloides envolvidas (granulocíticas, monocíticas, eritrocitárias e megacariocíticas)^(16,17).

Nas LMAs, a determinação do perfil citogenético e molecular é de extrema importância para correlação terapêutica e sobrevivência destes pacientes. Assim, as LMAs associadas às translocações $t(8;21)(q22;q22)$ e $inv(16)(p13q22)$, ou $t(16;16)(p13;q22)$, ocorrem predominantemente em indivíduos jovens e geralmente são acompanhados por uma resposta terapêutica relativamente favorável. Efeito semelhante também é observado na Leucemia Promielocítica Aguda (LMA-M3) com $t(15;17)(q22;q12)$, de ocorrência em qualquer faixa etária, porém, com predomínio em pacientes adultos de meia idade, e que tem particular sensibilidade ao tratamento com ácido all-trans-retinóico^(16,17,22,24,25,26,27).

Já a LMA-M0/M1, não-categorizada ou minimamente diferenciada, por sua vez, representa um exemplo contrário na relação alteração citogenética e o prognóstico do paciente. Constituindo-se por aproximadamente 5% dos casos de LMA, em sua maioria em pacientes adultos (ZAGO *et al.*, 2004), mostra-se frequentemente associada a cariótipos desfavoráveis, associados a deleção de braços longos dos cromossomos -5q e -7q, e maior resistência a drogas, o que oferece mau prognóstico ao paciente, baixa remissão, freqüência de recaídas precoces e baixa sobrevida se comparada a outros tipos de LMA ^(17,25,26).

O diagnóstico citogenético e molecular das LMAs, assim, apresenta-se como uma importante ferramenta no tratamento e prognóstico destes pacientes. Muito embora sejam pré-requisitos antes da investigação citogenética, os diagnósticos de triagem: como o hemograma e o exame físico; à análise morfológica e imunofenotípica, por citometria de fluxo, dos subtipos de LMA a partir de aspirados de medula óssea^(22,27,28,29).

LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA - LLA

As Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA), por sua vez, podem ocorrer tanto em crianças como em adultos sendo que a maior freqüência dos casos (80%) ocorre em crianças com idade entre zero e 15 anos. Com a etiologia da doença ainda sendo, na maioria das vezes, pouco evidente. Fatores de risco químicos e ambientais, infecções virais e fatores genéticos predispõe às LLAs. Anormalidades genéticas como a mutação do gene p53 e mutação do gene *AML1*, têm sido associados a um aumento no risco de desenvolvimento da LLA. Ocasionalmente produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais e gerando neutropenia, anemia e plaquetopenia, além de acúmulo de clones linfóides leucêmicos na medula óssea^(16,17,22).

As LLAs segundo a OMS⁽¹⁶⁾ são classificadas a partir de critérios morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e citoquímicos dos linfoblastos leucêmicos, sendo possível detectar com bastante precisão além da linhagem celular o nível de diferenciação em que se encontram as células leucêmicas. Desta forma as LLAs encontram-se divididas em: Leucemia Linfoblástica de

células precursoras B e Leucemia Linfoblástica de células precursoras T. Sendo que, nestes casos, o nível de diferenciação das células e as alterações citogenéticas são aspectos determinantes para o tratamento e prognóstico do paciente.

As Leucemias Linfoblásticas de células precursoras B, assim, conforme o estágio de diferenciação imunofenotípica das células precursoras B (ontogenia linfóide) podem ser subclassificados em: pro-B, pré-pré-B ou B comum, pré-B e B maduro. Sendo que a leucemia linfoblástica de precursor B do tipo pro-B representa cerca de 20% dos casos pediátricos e 10% dos casos de adultos; o tipo B comum representa em média 65% dos casos em crianças e 50% em adultos; o tipo pré-B correspondendo a aproximadamente 15% dos casos em crianças e 10% dos casos em adultos; e o subtipo B maduro sendo o mais raro tanto em crianças como em adultos, de prognóstico desfavorável, com blastos característicos do subtipo L3 (FAB) e com translocações cromossômicas associadas ao linfoma de Burkitt^(17,22,27).

Já as Leucemias Linfoblásticas de células precursoras T constituem 15% dos casos de LLA na infância, sendo mais comum em adolescentes, e representando cerca de 25% dos casos em adultos. Os blastos da LLA de células precursoras T podem ser subclassificadas em três subgrupos de acordo com o grau de diferenciação das células T (ontogenia linfóide): pré-T, T-intermediário e maduro⁽¹⁶⁾.

- INSTABILIDADE GENÉTICA VERSUS HIPERMUTABILIDADE VERSUS HPN VERSUS LEUCEMIAS

Organismos complexos desenvolveram sistemas altamente eficientes para proteger seus genomas do acúmulo de mutações no DNA, entretanto, tais mecanismos não são invioláveis e as células muitas vezes vão lentamente acumulando mutações com o passar do tempo, mesmo na ausência de agentes mutagênicos identificáveis. Assim, a mudança de um padrão normal para um padrão de célula cancerígena requer a aquisição de múltiplas mutações somáticas que coletivamente resultam no fenótipo maligno⁽³⁰⁾.

O aumento do dano no DNA, ou mesmo o reparo ineficaz do DNA, pode levar a um estado celular denominado de Instabilidade Genética que por sua vez tem sido associado a um grande impacto na patogênese das leucemias ⁽³¹⁾. Assim, tem sido proposto que esta instabilidade genética é essencial para explicar a multiplicidade de mutações freqüentemente vistas em malignidades (hipermutabilidade) ⁽³²⁾.

Como já comentado anteriormente os principais subtipos de LLA e LMA envolvem uma grande variedade de alterações genéticas, incluindo mutações de ponto, deleções e principalmente alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais altamente consistentes e específicas, tais como hiperploidia e translocações, envolvendo genes que, uma vez alterados qualitativa ou quantitativamente, atuam como fatores de iniciação e progressão neoplásica. ^(33,34).

No contexto das LLAs pediátricas, por exemplo, as lesões genéticas (translocações, rearranjos MLL, hiperploidia e hipoploidia) de seus subtipos geneticamente distintos são importantes na iniciação da leucemia, mas sozinhas são insuficientes para gerar um fenótipo leucêmico completo, indicando serem necessárias outras lesões oncogênicas ⁽³⁵⁾.

O fenótipo HPN, por exemplo, surge após mutações somáticas espontâneas no gene PIG-A, e uma variedade de mutações tem sido reportadas, principalmente associadas a substituições de base e pequenas deleções e inserções que levam a uma mudança de base de leitura (frameshift) ⁽³⁶⁾.

ARATEN et AL ⁽³²⁾ avaliaram um modelo para verificar se havia indícios de hipermutabilidade em blastos leucêmicos, utilizando o gene PIG-A como gene sentinela para mutações somáticas espontâneas, e estudando a presença de clones HPN em blastos de crianças com leucemia linfóide aguda para determinar a taxa de mutação somática adquirida nestas células, e relataram haver duas populações de células leucêmicas (blastos linfóides) em relação a frequência do fenótipo HPN, o que associaram ao estado de hipermutabilidade destas células.

O gene PIG-A, como já comentado, está bem caracterizado na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), porém sua utilização em pacientes com leucemia aguda, como possível fator diagnóstico e/ou prognóstico ainda é incerta e requer mais estudos. A vantagem da pesquisa de mutações neste gene em pacientes leucêmicos estaria relacionada primeiro a sua inativação no fenótipo HPN, que já é amplamente detectado através da citometria de fluxo, metodologia que também é muito utilizada na caracterização imunológica das leucemias (imunofenotipagem), fornecendo dessa maneira um possível modelo de avaliação do estado de hipermutabilidade genética nos pacientes leucêmicos, e ainda por ser possível utilizar este gene como sentinela para mutações somáticas espontâneas.

6. BIBLIOGRAFIA

1. BESSELER, M. & HIKEN, J. The Pathophysiology of Disease in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria., American Society of Hematology. 2008
2. ARRUDA, MMAS; RODRIGUES, CA; YAMAMOTO, M; FIGUEIREDO, MS. Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. Rev Assoc Med Bras 2010; 56(2): 214-21.
3. PARKER, C. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood, 106: 3699-3709. 2005.
4. DEVALET, B. et al. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. Europe Jornal of Hematology, 95: 190-198. 2015
5. ROSTI, V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Hematologica, 85: 82-87. 2000
6. BRODSKY, R.A. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Stem Cells and Clonality. American Society of Hematology. 2008
7. MADKAIKAR, M. et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. Europe Jornal of Hematology, 83: 503-511. 2009
8. HU, R. et al. *PIG-A* mutations in normal hematopoiesis. American Society of Hematology. v(105). 2005
9. BRODSKY R, MUKHINA G, LI S, NELSON K, CHIURAZZI P, BUCKLEY J, BOROWITZ M: Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. Am J Clin Pathol 2000, 114:459–466.
10. SUTHERLAND DR, KEENEY M, ILLINGWORTH A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. Cytometry Part B 2012; 82B: 195-208.
11. CORREIA, R. et al. Avanços técnicos no diagnóstico e no monitoramento de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo. Einstein. 2016;14:366-373.
12. ARATEN DJ, BESSLER M, MCKENZIE S, CASTRO-MALASPINA H, CHILDS BH, BOULAD F, KARADIMITRIS A, NOTARO R, LUZZATTO L: Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. Leukemia, 16: 2243-2248, 2002.
13. SHEN, W. et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. J Clin Invest. 2014;124(10):4529-4538.
14. SCHUBERT, J. & ROTH, A. Update on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : on the long way to understand the principles of the disease. Europe Jornal of Hematology, 94: 464-473. 2015.

15. LEE, S. & WAHAB, O. The mutational landscape of of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria revealed: new insights into clonal dominance. *J Clin Invest*: 2014;124(10):4227-4230
16. BRUNNING, R.D. et al. Acute myeloid leukemia. In: JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H. VARDIMAN; J.W. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, IARC Press, 2008
17. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. (Eds.). *Hematologia: Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu, 2004.
18. TALLMAN MS. Relevance of pathologic classifications and diagnosis of acute myeloid leukemia to clinical trials and clinical practice. *Cancer Treat Res*.121:45-67. 2004.
19. NORONHA, EP; MARINHO, HT; THOMAZ, EBAF; SILVA, CA; VERAS, GLR; OLIVEIRA, RAG. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. *São Paulo Med J*. 2011; 129(6):392-401.
20. PUUMALA, SE; ROSS, JA, APLENC, R; SPECTOR, LG. Epidemiology of Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:728–733.
21. BORATO MV, CUNHA KCCMS, RAMOS G, MURAO M. Leucemia mielóide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. *J Pediatr*.489-96. 2003.
22. QUIXABEIRA, VBL & SADDI, VA. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. *RBAC*. 40(3). p. 199-202, 2008
23. RIZZATTI, E.G.; ZAGO, M.A. Aplicações da biologia molecular às leucemias agudas. *Serv Monogr Esc Bras Hemat*. n.9, p.1-14, 2002.
24. REGO, Eduardo M. As bases moleculares da leucemia mieloide aguda. *Rev.Bras.Hematologia Hemoter.*, vol.24,no3,p.160-165,2002.
25. PELLOSO, et al. Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. **Rev. Assoc. Med. Bras. (1992)**;49(2):150-155. 2003.
26. SILVA, GRAZIELE C. DA; PILGER, DIOGO A; CASTRO, SIMONE M. DE; WAGNER, SANDRINE C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **J. bras. patol. med. lab**;42(2):77-84. 2006.
27. EMERENCIANO, M. et al. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v.50, n.3, p.183-189, 2004.
28. PADRÓN, YC et al. Inmunofenotipaje celular en el diagnostico de la leucemia mieloide aguda. *Revista Cubana de Hematologia Inmunologia e Hemoterapia*, v.21 n.3. 2005.
29. BENE MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett*. 98:9-21. 2005.

30. GROVE, C. & VASSILIOU, S. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer?. *Disease Models & Mechanisms*, 2014 (7), 941-951.
31. POPP, H. & BOHLANDER, S. Genetic instability in Inherited and Sporadic Leukemias. *Genes, Chromosomes & Cancer* 49:1071-1081. 2010.
32. ARATEN, DJ; SANDERS, KJ; ANSCHER, D; ZAMECHEK, L; HUNGER, SP; IBRAHIM, S. Leukemic Blasts with the Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Phenotype in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *AJP*. 2012, Vol. 181, No. 5, 1862-1869
33. GREAVES, M. & WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nature Reviews*. 2003 v(3).
34. FETT-CONTE, A. et al. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto- SP. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000;22(3), 374-386.
35. MULLIGHAN CG, GOORHA S, RADTKE I, MILLER CB, COUSTAN-SMITH E, DALTON JD, GIRTMAN K, MATHEW S, MA J, POUNDS SB, SU X, PUI CH, RELLING MV, EVANS WE, SHURTLEFF SA, DOWNING JR: Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007, 446: 758–764.
36. MORTAZAVI, Y. 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*, 101: 2833-2841. 2003.
37. BRITO JUNIOR, LC; OLIVEIRA CARDOSO, MS; ROCHA, EG; ANIJAR, H; CUNHA, M; SARAIVA, JCP. Frequency of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients attended in Belém, Pará, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(1), 35-37.
38. CHAUFFAILLE MC, YAMOMOTO M. Classificação das Leucemias Agudas. Em ZAGO, M.A.; FALCÃO,R.P.; PASQUINI, R. (Eds.). *Tratado de Hematologia*, capítulo 38, pag. 335, São Paulo: Atheneu, 2013.

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES OU RESPONSÁVEL LEGAL POR PACIENTE MENOR DE IDADE.**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada “Determinação da Presença de Clones de Hemoglobinúria Paroxística Noturna em Portadores de Leucemia Aguda como Fator de Risco para a Gênese da LLA e LMA”, a qual buscará levantar dados pessoais, da presença de pequeno grupo de células com alterações para outra doença que é a Hemoglobinúria Paroxística Noturna e clínicos (febre, dor óssea, baço ou fígado aumentados, etc) associados a pacientes que estão em fase de determinação diagnóstica para leucemia aguda (leucemia mielode aguda ou leucemia linfóide água) e internados no Hospital Ophir Loyola.

A obtenção destes dados pessoais, genéticos e clínicos nos ajudará a entender melhor por que alguns pacientes portadores de leucemia aguda tem melhor resposta ao tratamento que outros. Possibilitando a adoção de novos tratamentos no futuro.

Este trabalho é coordenado pelo Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior e tem a participação dos médicos hematologistas do Hospital Ophir Loyola que já prestam atendimento a você.

O pesquisador acima citados se comprometem em guardar sigilo médico em relação a todos os seus dados, incluindo a reserva absoluta de sua identidade pessoal. Informamos ainda a você que os dados obtidos durante este projeto serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pelos pesquisadores durante 5 (cinco) anos, e após este período totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96).

Informamos ainda a você que sua participação nesta pesquisa é voluntária e que você terá a liberdade de retirar o seu consentimento a mesma, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a sua vida pessoal e nem ao seu atendimento na FHCGV. E que caso surjam outras dúvidas ou novas perguntas você poderá entrar em contato com o Prof Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior, telefone 88916729, email: lcdbrito@bol.com.br e endereço: Tv. Alferes Costa s/n Bairro Pedreira – Belém Pará

EU _____, CPF _____, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo ou permitir que o menor _____ sob a minha tutela (responsabilidade) participe do estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.
- De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim.
- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora: Prof Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior, telefone 88916729, email: lcdbrito@bol.com.br e endereço: Tv. Alferes Costa s/n Bairro Pedreira – Belém Pará.
- **Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com a Dra Adriana Lameira Coordenadora-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas pelo telefone 4005-2676, endereço T v. Alferes Costa s /n, 1 ° andar.**

Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Belém, ___ de _____ de 20__.

**Assinatura do Paciente ou
Responsável legal por menor de idade**

**Assinatura da pesquisadora
Prof Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior**

PRESENÇA DE CLONES DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOTURNA EM PORTADORES DE LEUCEMIAS AGUDAS.

EDUARDO DOS SANTOS MARTINS FILHO¹, LACY CARDOSO DE BRITO JUNIOR²

1Biomédico. Mestrando do Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Análise Clínicas pela Universidade Federal do Pará (UFPA) – Belém-PA.

2Biomédico. Doutor. Professor Associado III do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Responsável técnico pelo Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia e Citologia da UFPA.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia e Citologia da UFPA em parceria com o Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo.

Correspondência: *Dr Lacy Cardoso de Brito Júnior*

Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências Biológicas - Laboratório de Patologia Geral -Imunopatologia e Citologia

Av. Augusto Corrêan°1 – Bairro Guamá

66075-900 – Belém-PA – Brasil

Tel.:55 91 3201 71 02

E-mail: lcdbrito@ufpa.br ou lcdbrito@bol.com.br

Resumo

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) surge após mutações somáticas espontâneas no gene PIG-A. Tais mutações estariam relacionadas um estado de hipermutabilidade genética que, por sua vez, poderia estar associado ao processo de gênese de doenças hematológicas malignas, como as leucemias agudas. Objetiva-se determinar a frequência de clones de HPN em pacientes portadores de leucemia aguda ao diagnóstico e ou durante a pesquisa de doença residual mínima (DRM). Foram estudados 47 pacientes, ambos os gêneros, com idade entre 2 e 62 anos, atendidos em dois hospitais oncológicos de Belém – Pará, no período de dezembro de 2015 a dezembro de 2016, para diagnóstico inicial de leucemias agudas e/ou submetidos a até quatro pesquisas de DRM, com pesquisa de clones de HPN, por citometria de fluxo. Os resultados demonstram que o gênero masculino 63,83% (30/47) e a população pediátrica 61,7% (29/47) foram os mais frequentes neste estudo. A leucemia linfoblástica aguda de células Pré-Pré-B (18/47) e a leucemia mielóide aguda (14/47) foram as mais frequentes. Em 57,1% (24/42), independente do tipo de leucemia, foi observada a presença de clones HPN ao diagnóstico. Em 40,4% (19/47) dos pacientes foi observada a presença de clones de HPN ao diagnóstico e/ou em pelo menos uma das pesquisas de DRM principalmente em pacientes portadores de LLA de células Pré-Pré-B e de LMA. Conclui-se que a presença de clones de HPN foi evidenciada em pacientes portadores de leucemias agudas, independente do tipo, tanto ao diagnóstico como em diversas pesquisas de DRM, com ou sem recaída. Contudo, sem estabelecer relação de causa e efeito, isto é, todos os pacientes que apresentaram clone de HPN ao diagnóstico mantiveram o clone em alguma das pesquisas de DRM, porém, vários pacientes que foram positivos na pesquisa de alguma DRM não apresentavam o clone de HPN ao diagnóstico.

Palavras-Chave: Imunofenotipagem, HPN, Leucemias Agudas.

Abstract

The Paroxysmal nocturnal Hemoglobinuria (PNH) arises after spontaneous somatic mutations on PIG-A gene. These mutations would be related to a state of genetic hypermutability that, in turn, would be associated with the genesis process of malignancy hematological diseases, like acute leukemia.

OBJECTIVE. To determine the frequency of PNH clones on patients with acute leukemia at initial diagnosis time or during the Minimal Disease Research (MDR). **METHODS.** 47 patients were investigated, both sex, age between 2 and 62 years, from oncologic hospitals in Belem-Pará, Brazil, over a period of one year from December 2015 to December 2016, for initial diagnosis of acute leukemia and/or investigate until four DRM research, with PNH clone research by flow cytometry. **RESULTS.** The male gender 63,83% (30/47) and the pediatric population 61,7% (29/47) were the most frequent at this study. The Pre-Pre-B acute lymphoid leukemia (18/47) and the acute myeloid leukemia (14/47) were the most frequent. In 57,1% (24/42) independently of type of leukemia, were observed the presence of PNH clones at diagnosis. In 40,4% (19/47) of the patients were observed the presence of PNH clones at the diagnosis time and/or at least in one of the MDR research, mainly in patients with Pre-Pre-B Acute Lymphoid Leukemia and Acute Myeloid Leukemia. **CONCLUSION.** The presence of PNH clones were observed in patients with acute leukemia's, independently of type, both at diagnosis and at MDR research, with or without relapse. However, with no association between cause and effect, that is, all the patients who have had PNH clone at the diagnosis time still keep it at in any of the MDR research, but, a lot of them who were positive at the MDR do not present the PNH clone at diagnosis time.

Key words: Immunophenotyping, PNH, Acute Leukemia's.

Introdução

A hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) é um tipo raro de anemia hemolítica crônica, caracterizada por manifestações clínicas extremamente variáveis, decorrente da hemólise intravascular, eventos trombóticos e falência medular, associado ainda a trombocitopenia, leucopenia ou ambos^{1,2,7}. Contudo, a trombofilia é a principal causa de morbi-mortalidade na HPN^{1,2,3,5,7}.

A patogênese da HPN está associada à expansão clonal não maligna de uma ou mais células derivadas das células tronco hematopoiéticas a partir de mutação(ões) somática(s) adquirida(s) no gene PIG-A, localizado no cromossomo X(Xp22.1), cujo produto é necessário para a síntese da molécula Glicosilfosfatidil-Inositol (GPI) que serve de ancora para outras várias proteínas com funções específicas e em especial as que desempenham importante papel em relação ao controle do sistema complemento^{5,6,7}.

Estudos recentes, porém, tem associado também o surgimento destas mutações somáticas no gene PIG-A com outras doenças hematológicas, em especial às síndromes de insuficiência medular, como anemia aplástica e síndromes mielodisplásicas^{1,2,3,4,5,6}.

Atualmente mais de 180 mutações no gene PIG-A já foram identificadas em indivíduos portadores de HPN. A maioria destas mutações estão associadas a pequenas inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos neste gene, o que resulta em alteração da matriz de leitura (frameshift) do gene (PIG-A) ocasionando a terminação precoce da transcrição e conseqüentemente o bloqueio do processo normal de síntese da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI)^{1,2,5,7}.

O mecanismo exato que leva a expansão clonal das células HPN ainda é incerto. Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar esta expansão. A mais aceita é a hipótese dos "dois passos", onde no primeiro ocorre a mutação somática no gene PIG-A, embora não sendo neste momento possível gerar expansão clonal; e no segundo passo, se faz necessário um ou mais fatores ambientais externos adicionais exercendo uma pressão seletiva

em favor do clone HPN, como no caso de uma lesão medular, o que, por sua vez, gera ativação de células T e NK. Evidência experimental tem mostrado que células deficientes de proteínas ancoradas pela GPI sejam mais resistentes ao ataque por células NK e T, o que daria ao clone HPN uma vantagem adaptativa que tem como resultado uma medula óssea prejudicada com expansão de células PIG-A mutadas^{1,4,5}.

Estudos recentes, porém tem fornecido novas perspectivas acerca do mecanismo patológico da expansão clonal dos pacientes portadores de HPN. Tais estudos tem mostrado que nestes pacientes, além da mutação do gene PIG-A, também são observadas mutações somáticas em outros genes que frequentemente estão associados ao crescimento, diferenciação celular e regulação da apoptose, de forma similar ao que é observado na gênese de neoplasias mielóides. Sugerindo que estas mutações associadas à HPN poderiam, de alguma forma, estar envolvidos na manutenção, expansão e evolução do clone HPN e possivelmente na transformação maligna de leucemias^{12,13,14,15}.

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a frequência de clones de HPN, por citometria de fluxo, em pacientes portadores de leucemia aguda (LLA B ou T, LMA, ou Bilinhagem) ao diagnóstico ou durante a investigação de doença residual mínima (DRM).

Material e Métodos

Amostras Biológicas. Estudo prospectivo com 47 pacientes, ambos os gêneros, atendidos no Hospital Ophir Loyola (HOL) e Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo (HOIOL) no período de dezembro de 2015 a dezembro de 2016, para diagnóstico inicial e diferencial de leucemias agudas e/ou acompanhamento terapêutico por pesquisa de DRM, e que foram submetidos à pesquisa de clones de HPN nas várias fases de evolução da doença.

As amostras analisadas foram de aspirado de medula óssea (MO), coletadas em tubo de hemólise com EDTA e encaminhadas à temperatura ambiente junto com

a suspeita e dados clínicos do paciente para o setor de citometria de fluxo de um laboratório particular de Belém.

Aspectos éticos. O presente projeto foi aprovado em comitê de ética sob o registro CEP/FPEHCGV 732.668, de 22/05/2014.

Critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídos pacientes de ambos os gêneros, de qualquer faixa etária, atendidos nos hospitais HOL e HOIOL com suspeita de leucemia aguda ou já em tratamento para leucemia aguda, no período de dezembro de 2015 a dezembro de 2016, que aceitarem participar do estudo e assinaram, ou os seus responsáveis assinaram, o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Como critérios de aceitação para a pesquisa de HPN foram considerados clones com percentual superior a 1% independente da população estudada. Foram excluídos todos os pacientes que não se enquadravam nestes critérios.

Desenho experimental. Os pacientes em questão foram analisados para a presença de clones de HPN por citometria de fluxo conforme a situação em que se encontravam no início do estudo, isto é, diagnóstico inicial (42/47) ou já em uma das pesquisas para DRM (05/47). 19 pacientes do estudo foram acompanhados para no mínimo uma e/ou até no máximo quatro pesquisas de DRM após o início do tratamento quimioterápico.

Imunofenotipagem. Todas as amostras foram submetidas à confecção de esfregaço para análise da morfologia celular. O processamento das amostras foi feito pela adição de 100µl de amostra (MO) em tubos Falcon, próprios para citometria de fluxo, identificados e acrescido de 7µl de diferentes combinações de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos FITC, PE, Percyp e APC, mais solução de lise e ou permeabilização, incubação no escuro, centrifugações e lavagens, para posterior aquisição e análise de 10.000 eventos em Citometro de

Fluxo FACS Calibur, com Cell Quest Pro (Becton Dickinson, San Jose, CA) para 4 cores.

O diagnóstico diferencial das leucemias agudas e seus subtipos contemplou a seguinte combinação de anticorpos comerciais: (1) Pan-hematopoiético: CD34, CD45, HLA-DR; (2) Linfócitos B: CD19, CD10, CD20, CD22, CD79a, TdT, IgG1, IgM, anti-kappa e anti-lambda; (3) Linfócitos T e NK: CD5, CD7, CD2, CD3, CD4, CD8, CD56; (4) Células Mielóides: CD13, CD33, CD117, CD61, CD14, CD15, CD16, CD11, Glicoforina A, CD42a, MPO.

Para a identificação dos clones de HPN foram estudadas populações celulares diferentes conforme a situação do paciente. Para os pacientes em diagnóstico inicial, a população estudada foi de blastos leucêmicos; já para os pacientes em pesquisa de DRM foram estudadas populações de blastos leucêmicos, nos casos de recaída, ou de granulócitos, monócitos e linfócitos nos casos livres de doença. O processamento das amostras seguiu o mesmo protocolo anteriormente descrito, sendo utilizado em, todos os casos, os anticorpos: FLAER, CD45 Per-Cy5 e CD59 PE, com aquisição e análise de 250.000 eventos em Citometro de Fluxo FACS Calibur, com Cell Quest Pro (Becton Dickinson, San Jose, CA) para 4 cores.

Análise estatística. Foram adotados apenas métodos descritivos para as análises dos dados através do software BioEstat versão 5.0.

Resultados

Na Tabela 1 esta representada a distribuição da frequência de leucemias agudas para o total de pacientes analisados. Nela se observa que a leucemia linfoblástica aguda de células Pré-Pré-B (18/47) e a leucemia mielóide aguda (14/47) foram as mais frequentes neste estudo, independente da faixa etária ou gênero.

Tabela 1: Distribuição da frequência de tipos de leucemias agudas para o total de pacientes estudados.

Diagnóstico Inicial	(n) Amostral	Porcentagem
LLA PRE-PRE-B	18	38,4%
LLA PRE-B	5	10,2%
LMA	14	29,9%
LLA-T	3	6,5%
BILINHAGEM	2	4,4%
SEM DIAGNOSTICO INICIAL	5	10,6%
TOTAL	47	100%

Quanto ao gênero observou-se que 30/47 (63,83%) indivíduos eram do gênero masculino e 17/47 (36,17%) do gênero feminino. Em sua maioria, 61,7% (29/47), os pacientes deste estudo encontravam-se na faixa etária de Zero a 17 anos. Foi analisado o total de casos 42/47 (89,3%) que tiveram o diagnóstico inicial realizado no período deste estudo e simultaneamente quanto à presença de clones HPN em blastos. Destes, 24/42 (57,1%) independente de tipo de leucemia apresentaram clones HPN ao diagnóstico. Em relação ao tipo de leucemia (quadro 1), 11/14 (78,5%) com diagnóstico de LMA apresentaram clones HPN, 1/4 (25%) com diagnóstico de LLA T apresentaram clones HPN, 8/17 (47%) com diagnóstico de LLA PRE PRE B apresentaram clones HPN, 2/2 (100%) com diagnóstico de leucemia Bilinhagem apresentaram clones HPN e 2/5 (40%) com diagnóstico de LLA PRE B apresentaram clones HPN.

Quadro 1: Presença do fenótipo HPN (>1%) no diagnóstico inicial em blastos de acordo com o tipo de leucemia

Tipo de Leucemia	Nº de pacientes M/F	Média de idade(anos) MIN-MAX	%CLONE(media) MIN-MAX	Nº de pacientes +	% pacientes HPN +
LMA	14	37,4	56,30	11	78,5
	11M/3F	7 a 79	3,06 - 99,36%		
LLA T	4	13	21,45	1	25
	3M/1F	5 a 19	85,81%		
LLA PRE PRE B	17	15,25	10,04	8	47
	10M/7F	2 a 69	1,22 - 99,22%		
BILINHAGEM	2	22,5	52,84	2	100
	1M/1F	13 a 32	8,68 - 97%		
LLA PRE B	5	22,4	19,23	2	40
	3M/2F	3 a 76	5,6 - 90,33%		

Legenda: M – Masculino; F – Feminino; MIN – Mínimo; MAX – Máximo.

Em seguida foi analisado o total de casos (19/47) que tiveram no diagnóstico e/ou em pelo menos uma das pesquisas de DRM a presença de clones de HPN (quadro 2). Destes 11/19 (57,9%) eram do gênero masculino e 08/19 (42,1%) do gênero feminino.

Quadro 2: Presença do fenótipo HPN (>1%) ao longo das pesquisas de Doença Residual Mínima (DRM) em pelo menos uma linhagem leucocitária.

PACIENTE	SEXO	IDADE	DIAGNOSTICO	HPN	1ª DRM		2ª DRM		3ª DRM		4ª DRM	
					RECAIDA	HPN	RECAIDA	HPN	RECAIDA	HPN	RECAIDA	HPN
1	M	16	LLA PRE PRE B	N	N	N	N	P	SD	SD	SD	SD
2	F	7	LLA PRE PRE B	N	N	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
3	M	3	LLA PRE PRE B	N	N	P	N	P	SD	SD	SD	SD
4	M	7	LLA PRE PRE B	N	N	N	N	P	SD	SD	SD	SD
5	M	9	LLA PRE PRE B	P	N	P	N	P	SD	SD	SD	SD
6	M	14	LLA PRE PRE B	P	P	P	N	P	SD	SD	SD	SD
7	F	7	LLA PRE PRE B CD33 +	P	N	P	N	P	SD	SD	SD	SD
8	F	13	LLA PRE PRE B*	SD	N	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
9	M	3	LLA PRE B	N	N	P	N	P	N	P	SD	SD
10	F	5	LLA PRE B	N	N	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
11	M	7	LMA	P	N	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
12	F	13	LMA	P	N	P	N	P	N	P	SD	SD
13	M	8	LMA*	SD	N	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
14	M	62	LMA	N	P	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
15	M	13	LLA T	N	N	P	N	P	SD	SD	SD	SD
16	M	19	LLA T	N	N	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
17	F	15	LLA T	P	N	P	SD	SD	SD	SD	SD	SD
18	F	2	LLA *	SD	P	P	P	P	P	P	P	P
19	F	4	LLA*	SD	N	N	N	P	SD	SD	SD	SD

Legenda: N – Negativa; P – Positiva; SD – Sem Dados; * - Não foi realizada pesquisa de HPN ao diagnóstico.

Deste total foi observado que com exceção de dois pacientes (14 e 16) todos os demais 89,5% (17/19) que foram positivos para presença de clones de HPN eram também da faixa pediátrica (zero - 17 anos), e ainda que ao diagnóstico a maior frequência de pacientes portadores de clone de HPN foi observada em leucemias agudas dos tipos LLA de células Pré-Pré-B (03/19 – 15,8%) e de LMA (02/19 – 10,5%).

Quando esta análise da presença de clones de HPN foi estendida para pacientes submetidos à pesquisa da 1ª DRM, após 15 dias do início do tratamento quimioterápico, observou-se que 42,1% (08/19) dos pacientes realizaram apenas uma única pesquisa de DRM no período do estudo. Com a maior frequência de casos positivos para a presença de clones de HPN nestes

pacientes também tendo sido encontrada entre os pacientes do gênero masculino portadores de LLA de células Pré-Pré-B (05/19 - 26,3%) e de LMA (04/19 - 21,1%).

Para a presença de clones de HPN em pacientes submetidos a 2ª pesquisa de DRM (11/19 - 57,9%), após 30 dias do início do tratamento quimioterápico, observou-se que a maior frequência de casos positivos foi encontrada entre os pacientes do gênero masculino portadores de LLA de células Pré-Pré-B (06/19 - 31,6%). Dois pacientes (9 e 12) realizaram até a 3ª pesquisa de DRM, com apenas uma recaída em um paciente (12), porém, de forma não correlata entre a recaída e a presença de clone de HPN. Nos dois casos houve a persistência da presença de clones de HPN nas três pesquisas de DRM.

Apenas um paciente (18) realizou quatro pesquisas de DRM durante o curso da doença com três recaídas e com a presença de clones HPN em três destas pesquisas de DRM, porém, de forma não correlata também entre as recaídas e a presença de clones de HPN.

Quanto ao tamanho dos clones de HPN observados na primeira pesquisa de DRM verificou-se que: em granulócitos foi de 2,36 - 70,9%, com média de 15,9%; em monócitos foi de 7,24 - 89,4% com média de 29,6%; e em linfócitos foi de 2,8 - 62,7% com média de 16,4%. Nos pacientes que realizaram a segunda pesquisa de DRM e que foram positivos para a presença de clones de HPN observou-se que o tamanho dos clones foi de: em granulócitos 1,38 - 50,9%, com média de 13,6%; em monócitos de 11,6 - 75,7%, com média de 38,2%; e em linfócitos de 3,3 - 81,3%, com média de 21,2%.

Já nos pacientes que realizaram a terceira pesquisa de DRM e que foram positivos para a presença de clones de HPN observou-se que o tamanho dos clones foi de: em granulócitos 3,97 - 10,1%, com média de 7,0%; em monócitos de 40,3 - 64,6% com média de 52,4%; e em linfócitos de 14,2 - 12,4% com média de 13,3%. No único paciente que realizou a quarta pesquisa de DRM o tamanho do clone de HPN foi de 4,7% em granulócitos e de 28,3% em monócito.

Discussão

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil a incidência de casos de leucemias para o ano de 2016 era decerca de 5.540 (5,63) novos casos em homens e de 4.530 (4,38) novos casos de leucemia em mulheres por 100.000 habitantes/ano. Para a região norte do Brasil (INCA, 2016) eram estimados cerca de 310 (3,81) novos casos de leucemia em homens e de 250 (3,01) novos casos de leucemia em mulheres por 100.000 habitantes. Com a maiores estimativas de casos de leucemias estando associadas ao Estado do Pará, com 140 (3,41) novos casos de leucemia em homens e de 120 (3,03) novos casos de leucemia em mulheres por 100.000 habitantes anualmente.

Brito Junior et al³⁸ avaliaram a frequência de leucemias entre os anos de 2005 e 2009 na cidade de Belém-Pará, e observaram que dos 278 casos de leucemias analisados, 70/278 (25,2%) eram de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), 146/278 (52,5%) de Leucemia Linfoblástica de Aguda e 62/278 (22,3%) de Síndromes Linfoproliferativas Crônicas. Em outros estudos Brito Junior et al⁽³⁷⁾, também avaliaram a frequência de HPN em 30 pacientes no período de novembro de 2008 a julho de 2009 na cidade de Belém-Pará, e observaram que 09/30 casos foram positivos para esta patologia.

Diante da estimativa nacional para o ano de 2016, e dos dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, buscamos verificar se existia alguma relação entre a frequência de leucemias agudas e a presença de clones de HPN em portadores de leucemias agudas atendidos em Belém do Pará. Deste modo, foi observado que em pacientes portadores de leucemias agudas e/ou mesmo em acompanhamento terapêutico para a pesquisa de DRM é possível observarmos clones de HPN.

Estes dados, porém, ainda requerem cuidados quanto a sua interpretação e importância clínica, principalmente por que não existe, nos pacientes estudados, uma relação direta entre o risco de recaída da doença de base com a presença de clones de HPN na pesquisa de DRM. Tampouco existe relação entre a presença de clones de HPN no diagnóstico inicial do paciente e a sua persistência no decorrer do curso da doença. Sendo necessárias novas

pesquisas que busquem explicar esta possível associação, ainda também muito incipiente na literatura.

Uma possível explicação para a presença de clones de HPN em pacientes portadores de leucemias agudas ao diagnóstico e/ou na pesquisa de DRM poderia estar associada a falhas nos sistemas de proteção do genoma celular, genes de reparo, com acúmulo de mutações no DNA ao longo do tempo, mesmo na ausência de agentes mutagênicos identificáveis³⁰.

O aumento do dano no DNA, ou mesmo o reparo ineficaz do DNA, poderia levar a um estado celular denominado de Instabilidade Genética que por sua vez tem sido associado a um grande impacto na patogênese das leucemias^{31,32}.

Estudos recentes forneceram uma nova perspectiva acerca do mecanismo patológico da expansão clonal na maioria dos pacientes HPN estudados. Nestes foram identificados pacientes que além da mutação do gene PIG-A, apresentavam também mutações somáticas em outros genes que frequentemente são associados ao crescimento e diferenciação celular, e reguladores de apoptose, similares aos encontrados em neoplasias mielóides. E que dessa forma estes genes estariam envolvidos na manutenção, expansão e evolução do clone HPN com possibilidade de transformação maligna^{12,13,14,15}.

Neste estudo, 11/14 (78,5%) pacientes com diagnóstico de LMA apresentaram clones HPN ao diagnóstico nos blastos mielóides, com média de idade de 37,4 anos, não havendo na literatura trabalhos relacionado tal associação. Porém, Poppet Bohlander³¹ relataram que a transição do estágio de pré-leucemia para franca leucemia requer tempo e está frequentemente associada a um estado de instabilidade genética, acompanhada por alterações genéticas prejudiciais ao sistema de reparo de DNA favorecendo dessa forma, o acúmulo de mutações somáticas espontâneas e o desenvolvimento de LMA.

Em nossos estudos, 11/26 (42,3%) pacientes com diagnóstico de LLA independentemente da ontogenia linfóide, apresentaram clones HPN ao diagnóstico nos blastos com média de idade de 16,8 anos. Araten et al³² em seus estudos utilizaram um modelo de verificação no qual observaram haver

indícios de hipermutabilidade em blastos leucêmicos utilizando o gene PIG-A como gene sentinela para mutações somáticas espontâneas, pela presença de clones HPN em blastos de crianças com leucemia linfoblástica aguda para determinar a taxa de mutação somática adquirida nestas células. E relataram haver dentro destes pacientes duas populações distintas de células leucêmicas (blastos linfóides) em relação ao fenótipo HPN, uma representando aproximadamente metade das amostras, com a taxa de mutação próxima ao grupo controle, e a outra metade, apresentando uma taxa de mutação cerca de 50 vezes maior que o grupo controle, o que associaram ao estado de hipermutabilidade destas células, e correlacionaram, hipoteticamente, com o número de mutações patogênicas necessárias para o surgimento dessas leucemias.

Em nossos estudos não foi observada uma relação de causa e efeito visto que apenas 06/19 (31,6%) pacientes já apresentavam clone de HPN ao diagnóstico e mantiveram estes clones em alguma das pesquisas de DRM. Para 08/19 (42,1%) pacientes, os clones de HPN só foram identificados após o primeiro ou algum outro ciclo de quimioterapia. Fato que pode sugerir que o uso de um determinado esquema quimioterápico, ou uma droga específica, também possa levar ao estado de hipermutabilidade, podendo então, dessa forma gerar clones com fenótipo HPN.

Em nossos estudos com 19/47 (40,4%) nos pacientes portadores de leucemias agudas que apresentaram clone para HPN ao diagnóstico e/ou durante a pesquisa de DRM, independente do tamanho do clone, foi observado que a maior frequência desta associação esteve presente em casos de LLA de células Pré-Pré-B. Esta frequência, porém, é ainda maior se os casos de LLA forem agrupados independentemente da ontogenia linfóide. Corroborando com os estudos de outros autores^{31,32}.

Quanto a faixa etária, a maioria dos pacientes portadores de leucemias agudas que apresentaram clone para HPN ao diagnóstico e/ou durante a pesquisa de DRM (19/47), pertenciam a faixa etária pediátrica, que normalmente já apresenta maior incidência de LLA^{16,17,22}, não sendo possível assim afirmar que esta associação também ocorre em indivíduos adultos, visto que a presença de

clones de HPN em associação a LMA foi observada em apenas um paciente (14).

Li, Azaad e Li (2017), contudo, mostraram através de um relato de caso de uma evolução rara de um paciente adulto, masculino, 52 anos, portador de HPN, para uma leucemia mielóide crônica (LMC). Sugerindo que existe a possibilidade de um link para a expansão celular neste caso, e que esta expansão pode incluir os blastos da LMC, sendo estas células induzidas e originárias das células do clone HPN³⁹.

Visweshwar, Jaglal, Booth, Griffin e Laber (2016), também através de relato de um caso raro, mostraram a evolução de um paciente adulto, masculino, 49 anos, portador de HPN para uma leucemia de grandeslinfócitos granulares. Sugerindo que existe a possibilidade de expansão celular em relação aos linfócitos T CD8+, e que esta expansão pode ser originada das células do clone HPN⁴⁰.

Lanza et al (2016) também em um relato de caso de paciente adulto, masculino, 62 anos, com diagnóstico de síndrome mielodisplásica (SMD) que, no curso da doença, apresentou clone de HPN grande e evolução neoplásica rara para um linfoma difuso de grandes células B em íleo. Neste caso os autores relatam que foram obrigados a tratar o paciente com Eculizumab e seções de quimioterapia para tratar o linfoma, evitar os riscos de trombose e melhorar a qualidade de vida do paciente⁴¹.

Pelo que é descrito na literatura^{12,13,14,15} e pelo que foi observado em nossos resultados fica claro que o mecanismo exato que leva a expansão clonal das células HPN em doença hematológicas ainda é incerto^{1,4,5}. Como também ainda é incerto como a mutação do gene PIG-A e ou mutações somáticas em outros genes, podem estar associados ao crescimento, diferenciação e expansão celular e contribuir, então, para o surgimento de neoplasias hematológicas e evolução do clone HPN.

Conclusão

A presença de clones de HPN foi evidenciada em pacientes portadores de leucemias agudas, independente do tipo, tanto ao diagnóstico como em diversas pesquisas de DRM, com ou sem recaída. Contudo, sem estabelecer relação de causa e efeito, isto é, todos os pacientes que apresentaram clone de HPN ao diagnóstico mantiveram o clone em alguma das pesquisas de DRM, porém, vários pacientes que foram positivos na pesquisa de alguma DRM não apresentavam o clone de HPN ao diagnóstico. Este fato pode sugerir que o uso de um esquema quimioterápico específico, ou de uma das drogas deste, pode gerar um estado de hipermutabilidade, levando, dessa forma, ao surgimento do clone HPN após o início do tratamento. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para evidenciar este fenômeno e para fundamentar a possibilidade de utilização da pesquisa de clone HPN como estratégia diagnóstica e ou prognóstica nos pacientes com leucemias agudas.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Laboratório Paulo Azevedo, aos funcionários do setor de Citometria de Fluxo, a Ana Paula Paixão, Débora Carneiro e Matheus Holanda pelo suporte durante o curso deste estudo.

Referências

1. BESSELER, M. & HIKEN, J. **The Pathophysiology of Disease in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria**. American Society of Hematology. 2008
2. ARRUDA, M M A S; RODRIGUES, C A; YAMAMOTO, M; FIGUEIREDO, M S. Hemoglobinúria paroxística noturna: da fisiopatologia ao tratamento. **Rev Assoc Med Bras** 2010; 56(2): 214-21.
3. PARKER, C. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, 106: 3699-3709. 2005.
4. DEVALET, B. et al. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. **Europe Jornal of Hematology**, 95: 190-198. 2015

5. ROSTI, V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Hematologica**, 85: 82-87. 2000
6. BRODSKY, R. A. **Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Stem Cells and Clonality**. American Society of Hematology. 2008
7. MADKAIKAR, M. et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. **Europe Jornal of Hematology**, 83: 503-511. 2009
8. HU, R. et al. *PIG-A* mutations in normal hematopoiesis. **American Society of Hematology**. v(105). 2005
9. BRODSKY R, MUKHINA G, LI S, NELSON K, CHIURAZZI P, BUCKLEY J, BOROWITZ M: Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. **Am J Clin Pathol** 2000, 114:459-466.
10. SUTHERLAND DR, KEENEY M, ILLINGWORTH A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. **Cytometry Part B** 2012; 82B: 195-208.
11. CORREIA, R. et al. Avanços técnicos no diagnóstico e no monitoramento de hemoglobinúria paroxística noturna por citometria de fluxo. *Einstein*. 2016;14:366-373.
12. ARATEN D J, BESSLER M, MCKENZIE S, CASTRO-MALASPINA H, CHILDS B H, BOULAD F, KARADIMITRIS A, NOTARO R , LUZZATTO L: Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. **Leukemia**, 16: 2243-2248, 2002.
13. SHEN, W. et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **J Clin Invest**. 2014; 124(10): 4529-4538.
14. SCHUBERT, J. & ROTH, A. Update on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : on the long way to understand the principles of the disease. **Europe Jornal of Hematology**, 94: 464-473. 2015.
15. LEE, S. & WAHAB, O. The mutational landscape of of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria revealed: new insights into clonal dominance. *J Clin Invest*: 2014;124(10):4227-4230
16. BRUNNING, R. D. et al. Acute myeloid leukemia. In: JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H. VARDIMAN; J. W. (Eds.): **World Health Organization Classification of Tumoursof Haemopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, IARC Press, 2008
17. ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. (Eds.). **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

18. TALLMAN M S. Relevance of pathologic classifications and diagnosis of acute myeloid leukemia to clinical trials and clinical practice. **Cancer Treat Res.** 121:45-67. 2004.
19. NORONHA, E P; MARINHO, H T; THOMAZ, E B A F; SILVA, C A; VERAS, G L R; OLIVEIRA, R A G. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. **São Paulo Med J.** 2011; 129(6):392-401.
20. PUUMALA, S E; ROSS, J A, APLENC, R; SPECTOR, LG. Epidemiology of Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Pediatr Blood Cancer** 2013;60:728-733.
21. BORATO M V, CUNHA K C C M S, RAMOS G, MURAO M. Leucemia mielóide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição. **J Pediatr.** 489-96. 2003.
22. QUIXABEIRA, V B L & SADDI, V A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **RBAC.** 40(3). p. 199-202, 2008
23. RIZZATTI, E. G.; ZAGO, M. A. Aplicações da biologia molecular às leucemias agudas. **Serv Monogr Esc Bras Hemat.** n.9, p.1-14, 2002.
24. REGO, Eduardo M. As bases moleculares da leucemia mielóide aguda. **Rev. Bras. Hematologia Hemoter.**, vol.24,no3,p.160-165,2002.
25. PELLOSO, et al. Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. **Rev. Assoc. Med. Bras. (1992);** 49(2):150-155. 2003.
26. SILVA, GRAZIELE C. DA; PILGER, DIOGO A; CASTRO, SIMONE M. DE; WAGNER, SANDRINE C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **J. bras. patol. med. lab;** 42(2):77-84. 2006.
27. EMERENCIANO, M. et al. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.50, n.3, p.183-189, 2004.
28. PADRÓN, YC et al. Imunofenotipaje celular enel diagnostico de la leucemia mielóide aguda. **Revista Cubana de Hematologia Inmunologia e Hemoterapia,** v.21 n.3. 2005.
29. BENE MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunol Lett.** 98:9-21. 2005.
30. GROVE, C. & VASSILIOU, S. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer?. **Disease Models & Mechanisms,** 2014 (7), 941-951.
31. POPP, H. & BOHLANDER, S. Genetic instability in Inherited and Sporadic Leukemias. **Genes, Chromosomes & Cancer** 49:1071-1081. 2010.

32. ARATEN, D J; SANDERS, K J; ANSCHER, D; ZAMECHEK, L; HUNGER, S P; IBRAHIM, S. Leukemic Blasts with the Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Phenotype in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **AJP**. 2012, Vol. 181, No. 5, 1862-1869
33. GREAVES, M. & WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature Reviews**. 2003 v(3).
34. FETT-CONTE, A. et al. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto- SP. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2000;22(3), 374-386.
35. MULLIGHAN C G, GOORHA S, RADTKE I, MILLER CB, COUSTAN-SMITH E, DALTON J D, GIRTMAN K, MATHEW S, MA J, POUNDS S B, SU X, PUI C H, RELLING M V, EVANS W E, SHURTLEFF S A, DOWNING JR: Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature** 2007, 446: 758-764.
36. MORTAZAVI, Y. 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**, 101: 2833-2841. 2003.
37. BRITO JUNIOR, LC; OLIVEIRA CARDOSO, MS; ROCHA, EG; ANIJAR, H; CUNHA, M; SARAIVA, JCP. Frequency of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients attended in Belém, Pará, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2011; 33(1), 35-37.
38. BRITO JUNIOR, LC; LEVY, I E; FRANCES, L T V M; WANDERLEY, A V; CARNEIRO, R C M; BENTES, A Q. Frequency of acute myeloid leukemia in children attended in Belém, Pará. from August 2005 to May 2009. **J Bras Patol Med Lab**. 2015;51(2), 72-76.
39. Li, J; Azaad, MA; Li, Y. Possible Evolution of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria into Chronic Myeloid Leukemia: A Rare Transformation. **Open Journal of Blood Diseases**, 2017, 7, 29-35.
40. Visweshwar, N; Jaglal, M; Booth, C; Griffin, P; Laber, D. AOHE: manuscript AOHE-D-16-00564 paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoimmune hemolytic anemia following eculizumab therapy—with large granular lymphocytic leukemia. **Ann Hematol** (2016) 95:1747-1749
41. Lanza, F; Lazzari, MC; Brambilla, P; Di Martino, G; Spedini, P. An unusual association of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, myelodysplastic syndrome, and diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma in a Caucasian man. **Ann Hematol** (2016) 95:1555-1557