

Artigo / Article

Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna

Importance and advantages of flow cytometry in screening tests for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria diagnostic

Thaís M. Modesto¹
Maria Amélia B. Neves¹
Ana Elita de Brito¹
Rosane C. P. Araújo¹
Neyliane F. G. Santos¹
Maria do Carmo Valgueiro¹
Cíntia G. F. Machado^{1,2}

Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença clonal adquirida da célula tronco hematopoética em decorrência de uma mutação somática no gene PIG-A, causando inabilidade dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas de se protegerem contra lise mediada pelo sistema complemento. Assim, avaliamos a eficiência dos testes de triagem para HPN (teste de Ham e pesquisa dos antígenos CD55 e CD59 em coluna de gel) utilizando a citometria de fluxo (CMF), que é capaz de detectar e quantificar o clone HPN. Inicialmente, selecionamos 63 pacientes que foram testados pelo teste de Ham entre janeiro/2003 e dezembro/2004, na Fundação Hemope. Destes, 15 tiveram seus testes positivos para HPN. O critério de inclusão dos casos para avaliação por CMF foi a obtenção de resultados do teste em gel concordantes com o teste de Ham positivo. Dessa maneira, quatro pacientes foram incluídos no grupo de estudo. Foram adicionados a esse grupo dois casos que exibiam clínica exuberante da doença, mas tiveram os resultados discordantes, explicado pelo fato de que o teste em gel foi realizado após terapia transfusional recente, provocando a suspeita de falso resultado normal. Submetemos esses seis casos à CMF, os quais todos se mostraram verdadeiros portadores da doença através da confirmação da existência do clone HPN em eritrócitos e granulócitos, em expressões variáveis. Os resultados da CMF comprovaram a limitação dos testes de triagem além de demonstrarem a relevância da citometria em identificar variações de intensidade do clone, garantindo inclusive o diagnóstico preciso em pacientes previamente transfundidos. Rev. bras. hematol. hemoter. 2006;28(4):275-279.

Palavras-chave: Hemoglobinúria paroxística noturna; diagnóstico; teste de Ham; pesquisa dos antígenos CD55 e CD59 em coluna de gel; citometria de fluxo.

Introdução

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) caracteriza-se geneticamente pela mutação somática do gene PIG-A, localizado no cromossomo X, que tem incidência rara, sem predomínio de sexo e idade, ocorrendo particularmente no adulto jovem. Este defeito resulta na deficiência da biossíntese da molécula glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), responsável pela ancoragem e fixação de determinados antígenos na superfície da membrana celular externa de eritrócitos, leucócitos e

plaquetas. Portanto, em decorrência da deficiência da GPI, importantes antígenos reguladores do sistema complemento (SC) não se expressam na superfície das células de portadores de HPN, tornando-as excepcionalmente susceptíveis ao efeito lítico exercido pelo SC. Entre os antígenos mais conhecidos estão o DAF (Fator Acelerador da Degradação das Convertases do Complemento) e o MIRL (Inibidor da Lise de Membrana), denominados também como CD55 e CD59, respectivamente. Particularmente, o último é o maior responsável pela regulação da lise mediada pelo SC.¹⁻⁹

¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – Hemope.

²Universidade de Pernambuco – UPE.

Correspondência: Cíntia G. F. Machado
Rua Joaquim Nabuco, 171 - Graças
52011-000 – Recife-PE – Brasil
E-mail: cintiamac@terra.com.br

O diagnóstico da HPN é baseado em achados clínicos e testes laboratoriais que detectam as proteínas de membrana ligadas a GPI ou demonstram a presença de eritrócitos excepcionalmente sensíveis à ação hemolítica do SC.²⁻⁶

O teste de Ham, introduzido na década de 30, ainda é utilizado em alguns serviços como teste de triagem diagnóstica, mas é sabidamente pouco sensível por sua incapacidade de detectar pequenas populações de células HPN. Resultados falso-positivos podem ser exibidos em situações como a anemia diseritropoética congênita tipo II, também denominada multinuclearidade hereditária dos eritroblastos com positividade para teste do soro acidificado (Hempas); em contrapartida, estes pacientes têm o teste da sucrose (*sugar water test*) negativo.^{2,6}

A pesquisa nos eritrócitos de CD55 e CD59 em coluna de gel ou gel teste, mais recentemente introduzida, baseia-se na identificação dos eritrócitos anormais por aglutinação em microcolunas de gel contendo anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59. Os resultados, que são interpretados em relação à presença ou ausência dos antígenos, podem oferecer uma estimativa da deficiência da expressão dos antígenos, classificando-a em parcial ou completa. Embora seja um teste de boa especificidade, deve ser feita a confirmação por citometria de fluxo (CMF).^{2,9}

De fato, os dois testes clássicos possuem limitações evidentes pelo motivo de pesquisar somente em eritrócitos GPI-deficientes e, conseqüentemente, permitirem apenas uma estimativa do tamanho do clone HPN.³

A CMF utiliza também anticorpos monoclonais, entretanto de forma mais sensível, específica e precisa para o diagnóstico de HPN. Suas vantagens sobre os outros métodos são: analisar também o defeito em granulócitos e plaquetas, quantificar o número de células GPI-deficientes em proporção, avaliar a evolução da doença baseada na quantificação de células HPN e detectar clones em doentes com anemia aplástica (AA). Os anticorpos monoclonais específicos mais utilizados no diagnóstico da HPN são os anti-CD55 e anti-CD59, suficientes para fechar o diagnóstico. No entanto, a deficiência de GPI pode também ser detectada utilizando anti-CD58, anti-CD14, anti-CD24, anti-CD48, anti-CD16 e outros.^{1,2,4,9-10}

Com base nestes conhecimentos, desenvolveu-se na Fundação Hemope um trabalho prospectivo com o objetivo de utilizar a CMF para reavaliar os casos suspeitos de HPN, identificados pelos testes de triagem.

Casuística e métodos

Retrospectivamente, foram avaliados os prontuários de 63 pacientes que realizaram o teste de Ham por suspeita de HPN, no período compreendido entre janeiro de 2003 a dezembro de 2004, na Fundação Hemope. Dos 63 casos revisados, 15 exibiram teste de Ham positivo e 4/15 não evoluíram na pesquisa por motivo de confirmação de outro diagnóstico

antes do início desse estudo, óbitos e paciente não localizado, como representado na tabela 1. Os 48 casos restantes não apresentaram confirmação para a suspeita da doença através do teste de Ham e por esse motivo foram excluídos da pesquisa.

Tabela 1
Descrição dos casos positivos ao teste de Ham (n=15) e sua evolução na casuística do trabalho

Nº Caso	Sexo	Idade	Resultado da associação dos testes de Ham e de Gel	Participação no estudo/ Motivo
14	F	75 anos	Concordante	Não localizada
15	F	34 anos	Discrepante	Sim Terapia transfusional
16	M	NI	Discrepante	Não Outro diagnóstico
19	M	41 anos	Discrepante	Não Outro diagnóstico
23	M	52 anos	Gel teste não realizado	Não Óbito
31	F	30 anos	Gel teste não realizado	Não Óbito
35	F	19 anos	Concordante	Sim
38	M	43 anos	Discrepante	Não Outro diagnóstico
39	M	39 anos	Discrepante	Sim Terapia transfusional
44	F	41 anos	Concordante	Não Não localizada
50	F	NI	Gel teste não realizado	Não Não localizada
54	M	63 anos	Concordante	Sim
57	M	30 anos	Concordante	Sim
60	M	38 anos	Concordante	Sim
63	F	14 anos	Gel teste não realizado	Não Outro diagnóstico

F= feminino; M= masculino; NI= Dado não informado.

Do grupo de interesse, ou seja, os casos com teste de Ham positivo, restaram 11 pacientes, dos quais 6/11 (grupo A) corresponderam à suspeita de HPN através de gel teste deficiente de antígenos, enquanto 5/11 (grupo B) obtiveram resultado normal na pesquisa em gel, discordando do teste de Ham. Posteriormente, identificou-se neste último grupo falseamento do resultado em dois casos (2/5), por se tratarem de pacientes que realizaram o teste em gel após transfusão sanguínea recente, mas considerados fortes suspeitos de HPN por apresentarem clínica exuberante da doença, necessitando uma avaliação mais precisa pela CMF. Nos três casos restantes (3/5) considerou-se que o teste de Ham foi falso-positivo, pois se confirmaram diagnósticos diferentes de HPN (leucemia mielóide crônica, anemia hemolítica auto-imune e deficiência de proteína C) justificando a retirada da pesquisa.

Dessa forma, foram resgatados quatro casos do grupo A (com os resultados do teste de Ham e do gel teste compatíveis) e dois casos do grupo B (com os resultados do teste de Ham e do gel teste discrepantes) para reavaliação por CMF. Este perfil geral da amostra está ilustrado na figura 1.

Foram coletadas amostras de sangue periférico (5 ml) dos pacientes em tubos para hemograma tipo "vacutainer"

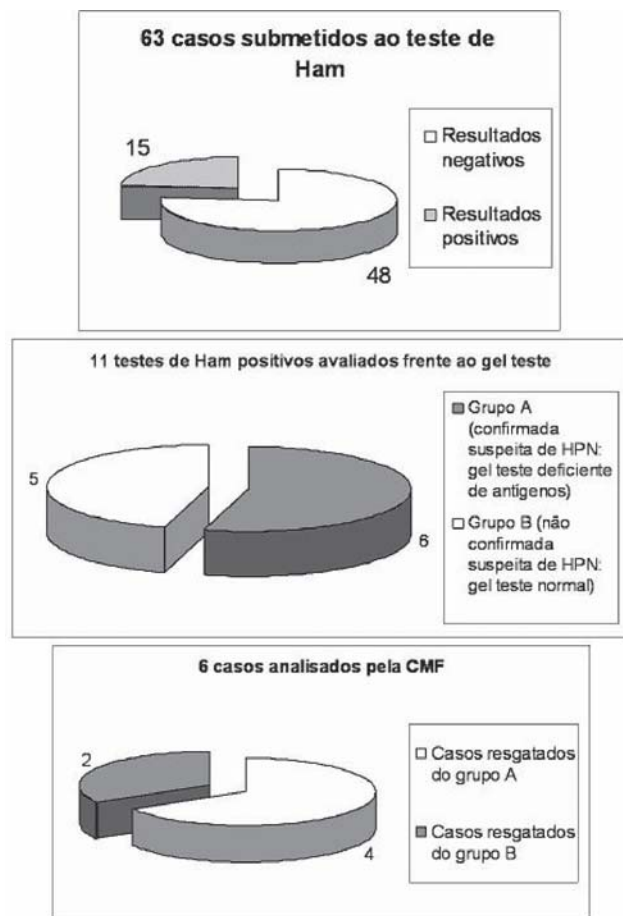


Figura 1. Gráficos representando o perfil geral da amostra.

(Benton Dickson, BD) contendo EDTA, para identificação dos antígenos por CMF. Utilizaram-se tubos para uso em citômetro (Falcon, 5 ml) para o procedimento da técnica. Foram empregados os anticorpos monoclonais anti-CD55 e anti-CD59, respectivamente clone IA10 e clone p282 (H19) da BD Pharmingen, ambos conjugados com o fluorocromo ficoeritrina (PE), conforme o quadro 1.

As hemácias e os granulócitos foram avaliados separadamente, ou seja, cinco tubos para cada análise. Foram identificados um tubo para controle negativo, dois para controle normal (ambos contendo amostra de doador saudável) e dois para amostra do paciente. No caso da avaliação de hemácias, em cada tubo adicionaram-se 50 µL de sangue total, 95 µL de solução tamponada com fosfato (PBS) para diluição e aplicaram-se 10 µL de cada anticorpo monoclonal específico (gamma 1/PE para controle negativo, anti-CD55/PE ou anti-CD59/PE nos tubos de controle normal e nos tubos da amostra do paciente). Todos os tubos foram incubados no escuro, por 30 minutos, à temperatura ambiente, depois foram centrifugados a 700 xg por dois minutos; após decantar o sobrenadante, acrescentaram-se 3 ml de PBS para ressuspensão das células. Para avaliação dos granulócitos, as etapas foram as seguintes: 100 µL de

Quadro 1
Painel de anticorpos monoclonais utilizado para imunofenotipagem de eritrócitos e granulócitos na pesquisa de HPN

Amostra	Células	Anticorpos monoclonais
Tubo 01	Eritrócitos	Gama 1/PE
Tubo 02	Granulócitos	Gama 1/PE
Tubo 03	Eritrócitos	AntiCD55/PE
Tubo 04	Granulócitos	AntiCD55/PE
Tubo 05	Eritrócitos	AntiCD59/PE
Tubo 06	Granulócitos	AntiCD59/PE
Tubo 07	Eritrócitos	AntiCD55/PE
Tubo 08	Granulócitos	AntiCD55/PE
Tubo 09	Eritrócitos	AntiCD59/PE
Tubo 10	Granulócitos	AntiCD59/PE

sangue total foram distribuídos em cada tubo identificado; após aplicação dos anticorpos e incubação no escuro, que se procedeu da mesma forma que para as hemácias, os eritrócitos foram lisados por dez minutos com solução de lise (FACS Lysing Solution) na proporção de 1:10 com água destilada; posteriormente à primeira centrifugação, lavou-se com 1 ml de PBS, centrifugando-se a 700 xg por dois minutos e, finalmente, 1ml de PBS foi adicionado para ressuspensão celular.

As células em suspensão foram posteriormente analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, BD, San Jose, C.A) através do software CellQuest (Becton-Dickinson, BD), inicialmente avaliadas em um gráfico de dispersão de pontos (*dot plot*) em relação ao seu tamanho, FSC (Forward Scatter) e complexidade citoplasmática, SSC (Side Scatter), delimitando uma região denominada R1 com as células de interesse (eritrócitos ou granulócitos), conforme ilustra os gráficos na figura 2.

Posteriormente, foram realizadas aquisições seqüenciadas das células marcadas. A exemplificação dos resultados da CMF obtidos em *dot plots* encontra-se demonstrada na figura 3.

Resultados

Os resultados da avaliação pela CMF estão demonstrados no quadro 2 e comparados àqueles obtidos com a pesquisa em gel.

Segundo o quadro 2, comparando os eritrócitos dos casos 15 e 39, verificou-se na CMF deficiência dos dois antígenos pesquisados. Em se tratando do caso 35, a CMF confirmou as variações de intensidade da deficiência em eritrócitos já sugerida pelo gel teste.

A imunofenotipagem nos eritrócitos nos casos restantes, 54,57 e 60, revelou proporção maior de clone HPN e menor de clone normal na pesquisa de anti-CD55 e de anti-

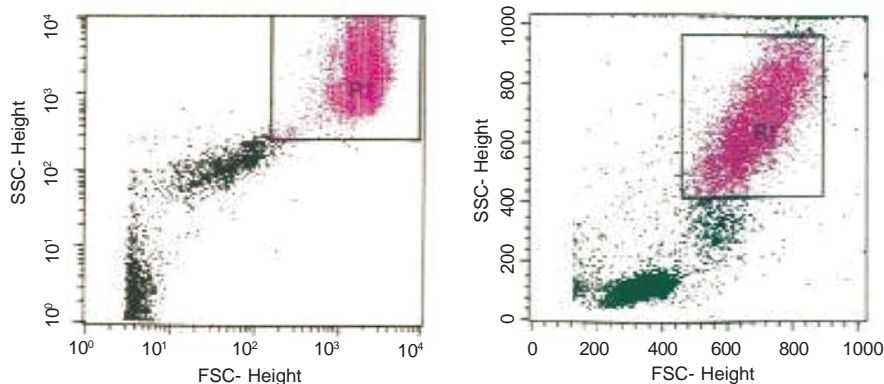


Figura 2. Gráfico em dot plots FSC x SSC em citometria de fluxo de eritrócitos (adquiridos em logarítimo) situado na esquerda e de granulócitos (adquiridos em linearidade) situado na direita, ambos delimitados na área R1.

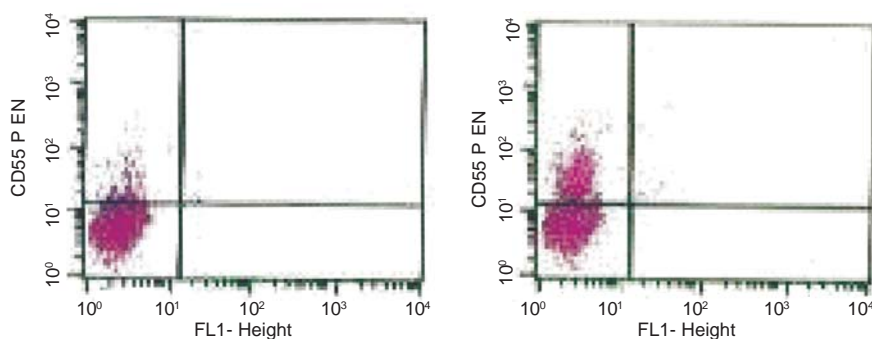


Figura 3. Gráficos em dot plots exemplificando detecção de expressão de antiCD55/PE situado na esquerda e de antiCD59/PE em granulócitos.

Quadro 2

Resultados da deficiência dos antígenos CD55 e CD59 dos seis casos suspeitos de HPN pelo teste de Ham positivo, detectada pelo gel teste e pela citometria de fluxo.

Caso	Gel Teste		Pesquisa por Citometria de Fluxo			
	Deficiência de CD55	Deficiência de CD59	Deficiência de CD55		Deficiência de CD59	
			Eritrócitos	Granulócitos	Eritrócitos	Granulócitos
15	Não	Não	76%	79%	46%	78%
35	Total	Parcial	94%	97%	62%	91%
39	Não	Não	16%	44%	12%	9%
54	Parcial	Parcial	72%	80%	61%	77%
54	Parcial	Parcial	72%	80%	61%	77%
60	Parcial	Parcial	74%	43%	55%	32%

CD59, confirmando o resultado da pesquisa em gel. Ademais, nenhum dos pacientes exibiu deficiência em apenas um dos antígenos, tanto no teste em gel quanto na CMF.

Discussão

Os resultados da análise por CMF dos casos 15 e 39 comprovaram que a terapia transfusional antes da aplicação do teste em gel pode resultar na não detecção de defici-

ência de antígeno. Nestes casos, as hemácias testadas no gel teste podem ter sido do doador e não do paciente; dessa forma, apenas a citometria avaliou corretamente o clone HPN, quantificando a deficiência também em granulócitos, células não afetadas pelo status transfusional.^{1-3,6,9} Além disso, o caso 39 também foi transfundido trinta dias antes da realização da CMF, o que explicou o menor clone HPN detectado em eritrócitos neste caso. Apesar disso, o diagnóstico pôde se firmar em ambos pelo fato de que possuíam deficiência também em granulócitos.

Em relação ao desempenho dos dois testes de triagem (teste de Ham e gel teste), os três resultados falso-positivos do teste de Ham colocaram em dúvida a boa especificidade do teste, difundida na literatura^{1,2,9} induzindo a suspeita de falha na execução da técnica. Com base nesta suspeita, foi possível a repetição do teste de Ham em apenas um caso, o qual passou a negativo, fortalecendo a hipótese de falha técnica.

Apesar de não ter sido um dos objetivos do trabalho, é relevante comentar a proposta do atual trabalho de Parker et al,¹⁰ que determina uma classificação da HPN por análise de parâmetros hemolíticos (com ou sem evidência clínica de hemólise intravascular) e de medula óssea (presença ou ausência de anormalidade definida) em três subcategorias: HPN clássica, HPN associada a uma desordem de medula óssea específica e HPN subclínica (HPN-sc). Segundo Parker et al,¹⁰ a CMF detecta comumente na HPN clássica grandes populações de células hematopoiéticas GPI-deficientes, enquanto na HPN-sc detecta uma percentagem mínima de clone HPN, caracteristicamente.

Existem relatos de detecção na HPN-sc de até mesmo 0,18% de células deficientes.

Conclusões

A sensibilidade do teste de Ham foi comprovada diante do gel teste. Por outro lado, foi menos específico, positivando diante de outras situações não-HPN, achado pouco divulgado na literatura pesquisada e atribuído à pro-

vável falha técnica. A pesquisa em gel mostrou-se sensível e específica, sendo os falso-negativos relacionados à análise realizada após transfusão de sangue. Esses resultados dos testes de triagem sugerem que o gel teste pode ser incluído no protocolo de triagem diagnóstica de HPN, obedecendo aos critérios relativos à transfusão sanguínea.

Com relação à CMF, os resultados deste trabalho validam dados da literatura que a apontam como o padrão ouro na identificação de clone HPN, permitindo a quantificação dos clones, o que não é possível com o teste em gel.

Assim, é interessante aperfeiçoar a metodologia da CMF voltada para o diagnóstico da HPN, de modo a obtermos os perfis clínico-laboratoriais que estão descritos na literatura recente.¹⁰

Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal disease of the hematopoietic stem cell caused by a somatic mutation in the PIG-A gene, resulting in the inability of erythrocytes, granulocytes and platelets to protect themselves against complement system mediated lysis. Thus, PNH screening tests (Ham's test and CD55 e CD59 proteins investigation through gel column agglutination) were evaluated using flow cytometry, a test useful to detect and measure the PNH clone. Initially, 63 patients evaluated using the Ham's test between January 2003 and December 2004 from the Hemo Foundation were selected. From these, 15 cases were positive for PNH. The inclusion criterion for cytometry evaluation was a positive Ham's test. Thus, four patients were included in the study group. Furthermore, two cases with clinical symptoms of the disease but with negative results for PNH were included in this group. Negative results were explained by the gel test being performed after blood transfusion, giving a suspicion of false negative results. These six cases were submitted to flow cytometry with all cases proving to be positive for the disease as the PNH clone was confirmed, to different degrees, in both erythrocytes and granulocytes. The flow cytometry results proved the limitation of screening tests as well as showing the importance of cytometry in the identification of the intense variations of clone guaranteeing precise diagnosis in previously transfused patients. Rev. bras. hematol. hemoter. 2006;28(4):275-279.

Key words: Paroxysmal hemoglobinuria; diagnostic; Ham's test, CD55 e CD59 proteins investigation through gel column agglutination; flow cytometry.

- Anemia. American Society of Hematology 2004;48-54.
5. Sharon EH, WF Rosse. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 1996;87 June 15 (12);5.332-5.340.
 6. Moromizato DT *et al.* Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN): diagnóstico laboratorial. Rev Bras Hematol Hemoter 2003;25(2): 14.
 7. Hillmen P *et al.* Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. EMBO J. 1994 Jan 1;13(1):110-117.
 8. Linardi CCG *et al.* Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN): características clínicas e laboratoriais em 34 pacientes. Rev Bras Hematol Hemoter 2003;25(2):15.
 9. Márquez JD, Carvalho C. Hemoglobinúria Paroxística Noturna. Rev Med Transf 2001;8:21-26.
 10. Parker C *et al.* Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinúria. Blood 2005;106(12):3.699-3.709.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 29/03/2006
Aceito após modificações: 02/05/2006

Referências Bibliográficas

1. Araújo CJ *et al.* Hemoglobinúria Paroxística Noturna: relato de dois casos. Rev Bras Hematol Hemoter 2002;24(4):286-290.
2. Pasquini R. Hemoglobinúria Paroxística Noturna. In: Zago MA, Falcão, Passetto R, Pasquini R(org). Hematologia Fundamentos e Práticas. 1ª Edição, Editora Atheneu, 2001; capítulo 17: 163-168.
3. Queirós ML *et al.* Importância da citometria de fluxo no diagnóstico de Hemoglobinúria Paroxística Nocturna. Rev Med Transf 2000; 4:37-43.
4. Rosse WF, Hillmen P, Schreiber AD. Immune-Mediated Hemolytic