

Presença de clones de hemoglobinúria paroxística noturna em portadores de leucemia aguda do estado do Pará, Amazônia, Brasil

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with acute leukemia in Pará State, Brazilian Amazon

Lacy Cardoso de Brito Júnior¹, Fábio Rodrigues de Oliveira^{2,3}, Debora Alves Cardoso², Bruno Marcel Silva de Melo^{2,4}, Murilo Chermont Azevedo^{5,6}, Matheus Holanda Nascimento⁶, Debora Monteiro Carneiro⁶, Ana Paula Silveira Paixão⁶

¹ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Patologia Geral, Imunopatologia e Citologia, Belém, Pará, Brasil

² Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Curso de Especialização em Hematologia e Imunologia, Belém, Pará, Brasil

³ Universidade Federal do Amapá, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Controle de Qualidade e Bromatologia, Macapá, Amapá, Brasil

⁴ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Laboratório de Inflamação e Dor, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

⁵ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Belém, Pará, Brasil

⁶ Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo, Belém, Pará, Brasil

RESUMO

OBJETIVO: Evidenciar a melhor estratégia de escolha de anticorpos para caracterizar a presença de clones de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) em pacientes submetidos à investigação diagnóstica de leucemias agudas ou em acompanhamento terapêutico. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram analisadas 41 amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes portadores de leucemia aguda submetidos à investigação diagnóstica ou em acompanhamento terapêutico de dois hospitais oncológicos e públicos de Belém, de fevereiro a julho de 2015. **RESULTADOS:** Do total de amostras, 58,5% eram do gênero masculino, 41,5% estavam na faixa etária de 0–10 anos, 56,1% estavam em investigação diagnóstica e 43,9% em acompanhamento terapêutico. Dos casos em diagnóstico, 43,5% (10/23) eram de leucemia linfoblástica aguda de células B comum e 26,1% (6/23) de leucemia mieloide aguda. A presença de clones de HPN foi verificada em 9,8% (4/41) do total investigado, sendo 3/4 observados na investigação diagnóstica e 1/4 em paciente em acompanhamento terapêutico, sem recaída. A combinação dos anticorpos FLAER/CD59PE/CD45Per-Cy5 em blastos e linfócitos, FLAER/CD15PE/CD45Per-Cy5/CD24APC em granulócitos e FLAER/CD14PE/CD45Per-Cy5/CD64APC em monócitos mostrou-se como a melhor estratégia para caracterizar a presença de clones de HPN nesses pacientes, independente do tipo de amostra. **CONCLUSÃO:** A presença de clones de HPN em portadores de leucemias agudas não dependeu da ontogenia celular ou do estágio do paciente (diagnóstico ou acompanhamento terapêutico). A melhor estratégia de anticorpos para a identificação de clones HPN em blastos leucêmicos, independente da sua ontogenia, foi por meio da combinação de FLAER com CD45.

Palavras-chave: Hemoglobinúria Paroxística; Leucemia; Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To highlight the best antibody selection strategy to characterize the presence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clones in patients undergoing diagnostic investigation of acute leukemia or in therapeutic follow-up. **MATERIALS AND METHODS:** Forty-one peripheral blood and bone marrow samples from patients with acute leukemia who underwent diagnostic investigation or therapeutic follow-up at two oncological and public hospitals in Belém, Pará State, Brazil, from February to July 2015, were analyzed. **RESULTS:** A total of 58.5% were male, 41.5% were 0–10 years old, 56.1% were under diagnostic investigation, and 43.9% were under therapeutic follow-up. Among cases under diagnostic investigation, 43.5% (10/23) were B-cell acute lymphoblastic leukemia and 26.1% (6/23) acute myeloid leukemia. The presence of PNH clones was observed in 9.8% (4/41) of cases, being 3/4 under diagnostic investigation and 1/4 under therapeutic follow-up, without relapse. The combination of FLAER/CD59PE/CD45Per-Cy5 antibodies in blasts and lymphocytes, FLAER/CD15PE/CD45Per-Cy5/CD24APC in granulocytes, and FLAER/CD14PE/CD45Per-Cy5/CD64APC in monocytes proved to be the best strategy to characterize the presence of PNH clones in these patients, regardless of sample type. **CONCLUSION:** The presence of PNH clones in patients with acute leukemia did not depend on cell ontogeny or patient stage (diagnosis or therapeutic follow-up). The best antibody strategy for the identification of PNH clones in leukemic blasts, regardless of their ontogeny, was by combining FLAER with CD45.

Keywords: Paroxysmal Hemoglobinuria; Leukemia; Flow Cytometry.

Correspondência / Correspondence:

Lacy Cardoso de Brito Junior
Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Patologia Geral, Imunopatologia e Citologia
Av. Augusto Corrêa, 01. Bairro: Guamá. CEP: 66075-900 – Belém, Pará, Brasil – Tel.: +55 (91) 3201-7102
E-mail: E-mail: lcdbrito@ufpa.br / lcdbrito@bol.com.br

INTRODUÇÃO

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma desordem clonal de células-tronco hematopoiéticas rara, que surge principalmente pela mutação somática do gene glicosilfosfatidilinositol (GPI – *glycophosphatidylinositol*) classe A (PIGA) e resulta no bloqueio precoce da síntese da âncora de GPI, responsável por manter aderidas à membrana plasmática dezenas de proteínas com funções específicas^{1,2,3}. A deficiência de GPI leva à ausência de ligação das proteínas normalmente ancoradas a ela, como o inibidor da lise reativa da membrana (CD59) e o fator acelerador do decaimento (CD55), que regulam a atividade lítica do complemento^{3,4}, gerando alterações clínicas associadas à hemólise intravascular crônica, falência medular e trombose^{4,5,6}.

Essas alterações têm sido também associadas ao surgimento de certo grau de instabilidade ao DNA das células comprometidas e à gênese de várias doenças hematológicas, como anemia aplásica, síndromes mielodisplásicas e alguns tipos de leucemias agudas^{1,2,4,5,6,7}.

Estudos recentes têm fornecido novas perspectivas acerca do mecanismo patogênico da expansão clonal dos pacientes portadores de HPN. Tais estudos têm mostrado que, nesses pacientes, além da mutação do gene *PIGA*, também são observadas mutações somáticas em outros genes que frequentemente estão associados ao crescimento, à diferenciação celular e à regulação do processo de apoptose, de forma similar ao que é observado na gênese das neoplasias hematológicas. Tais resultados sugerem que essas mutações associadas à HPN poderiam estar envolvidas na manutenção, expansão e evolução do clone HPN e, possivelmente, na transformação maligna de leucemias^{4,6,7,8,9}.

Assim, o objetivo deste estudo foi evidenciar a presença de clones de HPN em pacientes submetidos ao diagnóstico para leucemias agudas e/ou em acompanhamento terapêutico, após o início do tratamento, mesmo sem sinais de hemólise, trombose ou qualquer outra alteração associada à presença de clones de HPN, buscando estabelecer qual a melhor estratégia de anticorpos para caracterizar a presença desses clones em portadores de leucemias agudas.

MATERIAIS E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Estudo prospectivo de série de casos com 41 pacientes, ambos os gêneros, atendidos no Hospital Ophir Loyola e no Hospital Oncológico Infantil Dr. Octávio Lobo, em Belém, estado do Pará, Brasil, entre fevereiro e julho de 2015, para diagnóstico de leucemia aguda ou em acompanhamento terapêutico. Para esses pacientes, mesmo sem sinais de hemólise, trombose ou qualquer outra alteração associada à HPN, foi realizada a pesquisa de clones de HPN em amostras de medula óssea e sangue periférico, as quais foram encaminhadas a um laboratório particular de Belém.

Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pública Estadual Hospital de Clínica Gaspar Vianna, parecer nº 732.668, em 22 de maio de 2014.

IMUNOFENOTIPAGEM

Foram confeccionados esfregaços para análise morfológica e posterior processamento das amostras para diagnóstico das leucemias pela adição de 100 µL de amostra em tubos cônicos, acrescido de 7 µL de diferentes combinações de anticorpos monoclonais comerciais – pan-hematopoiético: CD34, CD45, HLA-DR; linfócitos B: CD19, CD10, CD20, CD22, CD79a, TdT, IgG1, IgG1, IgM, anti-kappa e anti-lambda; linfócitos T e NK: CD5, CD7, CD2, CD1a, CD3, CD4, CD8, CD56; ou mieloides: CD13, CD33, CD117, CD61, CD14, CD64, CD11b, Glicoforina A, CD42a, MPO – marcados com FITC, PE, Percyp e APC, mais lise e/ou permeabilização, incubação no escuro, centrifugações e lavagens, com aquisição e análise de 10.000 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 de HPN em pacientes na fase de investigação diagnóstica, foi utilizada a população de blastos leucêmicos e hemácias; já para os pacientes em acompanhamento terapêutico, foram estudadas as populações de blastos leucêmicos e hemácias ou de granulócitos, monócitos, linfócitos e hemácias, nos casos de pacientes livres de doença. O processamento das amostras seguiu o mesmo protocolo nos dois casos. Inicialmente, para os primeiros 10 pacientes foi feita a combinação dos anticorpos CD55FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5 (leucócitos) e CD235FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5 (hemácias). E, diante dos resultados obtidos, os autores modificaram o painel para a combinação FLAER/CD59PE/CD45Per-Cy5 (blastos), mais os painéis propostos por Borowitz et al.¹⁰, FLAER/CD15PE/CD45Per-Cy5/CD24APC (granulócitos), FLAER/CD14PE/CD45Per-Cy5/CD64APC (monócitos) e CD235FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5 (hemácias), com aquisição e análise de 250.000 eventos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foram aplicados métodos descritivos de frequência, por meio do software BioEstat v5.0.

RESULTADOS

Do total analisado, 23/41 (56,1%) pacientes estavam em fase de investigação diagnóstica para leucemia aguda e foram submetidos à pesquisa de HPN, e 18/41 (43,9%) pacientes já se encontravam em acompanhamento terapêutico, quando então foram submetidos à pesquisa de HPN.

As características mais prevalentes na população estudada foram: o gênero masculino foi o mais frequente (24/41; 58,5%); a maioria dos indivíduos encontrava-se na faixa etária de 0–10 anos (17/41; 41,5%) e acima dos 25 anos de idade (13/41; 31,7%).

Entre os pacientes em fase de diagnóstico (23/41; 56,1%), as doenças com maior número de casos foram a leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células pré-pré-B (B comum) (10/23; 43,5%) e a leucemia mieloide aguda (LMA) (6/23; 26,1%). Em relação aos pacientes em acompanhamento terapêutico (18/41; 43,9%), a maioria, 12/18 (66,7%), encontrava-se em remissão para a doença de base (Tabela 1).

Quanto aos pacientes que apresentaram clones de HPN em blastos leucêmicos, observou-se que 3/41 (7,4%) estavam em fase de investigação diagnóstica para leucemias agudas. Desses, 2/3 (66,7%) eram portadores LMA e 1/3 (33,3%) eram portadores de LLA pré-T. Já para pacientes em acompanhamento terapêutico sem recaída, observou-se a presença de clones de HPN, em granulócitos e monócitos, em apenas 1/41 (2,4%) paciente portador de LLA pré-pré-B (B comum).

Quanto à análise da estratégia de combinação de anticorpos, para caracterizar a presença de clones de HPN em blastos e linfócitos de pacientes em fase de diagnóstico, a combinação dos anticorpos FLAER/CD59PE/CD45Per-Cy5 mostrou-se melhor para caracterizar esses clones (3/41; 7,3%), em comparação à combinação CD55FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5, onde nenhum caso positivo foi observado para a presença

desses clones quando essa combinação foi testada em 10 pacientes.

Também para os pacientes em acompanhamento terapêutico, sem a presença de blastos na amostra, a combinação dos anticorpos FLAER/CD15PE/CD45Per-Cy5/CD24APC para granulócitos e FLAER/CD14PE/CD45Per-Cy5/CD64APC para monócitos mostrou melhores resultados para caracterizar a presença de clones HPN nesses grupamentos celulares (1/41; 2,4%) do que a combinação CD55FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5, para a qual não foi observada a presença desses clones de HPN quando essa combinação foi testada em 10 pacientes. Já a pesquisa de clones HPN em hemácias, utilizando a combinação de anticorpos CD235FITC/CD59PE/CD45Per-Cy5, não se mostrou eficaz em qualquer das situações investigadas.

DISCUSSÃO

Vários estudos têm associado a desordem clonal de células tronco-hematopoiéticas com a presença de mutação do gene *PIGA*^{1,2,3}. Ainda, sugerem o surgimento de certo grau de instabilidade ao DNA em células comprometidas na HPN com a gênese de várias doenças hematológicas, como forma de evolução rara da HPN para leucemia aguda^{1,2,4,5,6,7,11}.

Tabela 1 – Caracterização epidemiológica dos pacientes submetidos à investigação diagnóstica para leucemia aguda ou em acompanhamento terapêutico e que foram pesquisados em relação à presença de clones de HPN, no período de fevereiro a julho de 2015

Caracterização epidemiológica	Investigação diagnóstica		Em acompanhamento terapêutico		Total (N = 41)	
	N	%	N	%	N	%
Faixa etária (anos)						
0–10	11	64,7	6	35,3	17	41,5
11–17	4	44,4	5	55,6	9	21,9
18–25	1	50,0	1	50,0	2	4,9
> 25	7	53,8	6	46,2	13	31,7
Gênero						
Masculino	14	58,3	10	41,7	24	58,5
Feminino	9	52,9	8	47,1	17	41,5
Pesquisa de HPN						
Normal	20	54,1	17	45,9	37	90,2
Deficiente	3	75,0	1	25,0	4	9,8
Tipo de leucemia aguda						
LLA pré-pré-B	10	71,4	4	28,6	14	34,2
LMA	6	85,7	1	14,3	7	17,1
LLA pré-T	2	100,0	–	–	2	4,9
LLA pró-T	–	–	1	100,0	1	2,4
LLA T cortical	1	100,0	–	–	1	2,4
Bilinhagem B e T	2	100,0	–	–	2	4,9
Bilinhagem B e mieloide	1	100,0	–	–	1	2,4
Ausência de blastos na amostra	1	7,7	12	92,3	13	31,7

Fonte: Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo.

N: valores absolutos; %: valores relativos; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia mieloide aguda; HPN: hemoglobinúria paroxística noturna. Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

Para Araten e Luzzatto¹² e Araten et al.¹³, a presença de mutação no gene *PIGA* gera clones de HPN em células-tronco hematopoiéticas; porém, isso não garante vantagem de replicação ou expansão clonal a essas células, quando comparadas a células normais, diferentemente do que se acreditava. Contudo, ainda segundo os mesmos autores, quando é observada a expansão clonal em células que sofreram mutações no gene *PIGA*, essa ocorre de maneira extrínseca à mutação nesse gene, isto é, sendo frequentemente associada a mutações adicionais em um ou mais genes na mesma população celular. Como já relatado por Inoue et al.¹⁴, mutações no gene *PIGA* estão associadas a mutações em outros genes, como *HMGA2*, *JAK2V617F* e *N-RAS*¹⁵, e, mais recentemente, foi demonstrado que estariam ainda associadas ao *BCR-ABL*¹⁶.

Para Traulsen et al.¹⁷ e Dingli et al.¹⁸, essa segunda mutação em uma célula tronco hematopoiética no gene *PIGA* forneceria uma vantagem de adequação necessária para a expansão clonal; contudo, a ocorrência desse fenômeno parece ser a exceção e não a regra. Estudos recentes, porém, têm sugerido que essas mutações adicionais são tipicamente vistas na síndrome mielodisplásica ou na leucemia¹⁹.

Mon Père et al.²⁰ apresentaram um modelo estocástico de dinâmica de células-tronco hematopoiéticas em relação às mutações no gene *PIGA* e à probabilidade dessas levarem ao fenótipo HPN. Esses resultados permitiram estimar a incidência da doença em uma população, o tamanho médio do clone e a probabilidade de extinção do mesmo, com resultados semelhantes aos observados na prática clínica. Nesse mesmo estudo, os autores mostraram, matematicamente, que o tamanho do clone aumenta não só a probabilidade de expansão clonal para as células que sofreram mutação, mas também é determinante para a apresentação clínica da doença, isto é, formas de HPN clínica, subclínica ou probabilidade de extinção do clone.

Os resultados do presente estudo mostram, ainda de forma preliminar, que pacientes portadores de leucemias agudas podem apresentar clones de HPN "silencioso", sem que fosse possível, para o momento, caracterizar qual o papel desses clones de HPN nesses pacientes, e mesmo se esses clones mantêm sua atividade depois de iniciada a quimioterapia. Contudo, em um estudo ainda em andamento (dados não publicados), já é possível dizer que alguns pacientes que apresentam clones HPN ao diagnóstico, em blastos, mantêm a atividade desses clones em granulócitos e monócitos, mesmo após iniciada a quimioterapia, demonstrando que, no futuro, será necessário definir se, para esses pacientes, além da quimioterapia tradicional, será necessário também introduzir tratamento específico para o clone HPN.

Para Lanza et al.¹¹, em seu relato de caso de paciente masculino, 62 anos de idade, inicialmente diagnosticado com síndrome mielodisplásica, que durante o curso da doença apresentou clone grande de HPN e evolução para neoplásica rara (linfoma difuso de grandes células B), os autores revelaram

ter sido obrigatório o tratamento desse paciente com Eculizumab em associação à quimioterapia para o linfoma, visando evitar os riscos de trombose e melhorar a qualidade de vida do mesmo.

A hipótese da presença de um clone "silencioso" de HPN, em pacientes com leucemias agudas, pode ser sustentada pelas perspectivas fornecidas acerca do mecanismo patológico da expansão clonal dos pacientes portadores de HPN. Nesses pacientes, além da mutação do gene *PIGA*, também são observadas mutações somáticas em outros genes que frequentemente estão associados ao crescimento, à diferenciação celular e à regulação de apoptose, de forma similar ao que é observado na gênese das leucemias, como já mencionado. Assim, essas mutações ligadas à HPN poderiam estar associadas à transformação leucêmica nesses pacientes^{6,7,8,9}.

Quanto à melhor combinação de anticorpos para a identificação de clones de HPN, tanto em blastos leucêmicos, independente da sua ontogenia, quanto em granulócitos, monócitos, linfócitos e hemácias, foi observado que os anticorpos CD55 e CD59 não foram bons marcadores para mostrar a presença de clones de HPN. Quanto ao tipo de célula a ser investigada, ficou claro, através dos painéis testados, que a presença de clones de HPN é mostrada com maior precisão em granulócitos e monócitos¹⁰; porém, é possível também evidenciar a presença desses clones em blastos leucêmicos com a mesma precisão; e ainda que as hemácias talvez não sejam células adequadas para caracterizar a presença desses clones.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível mostrar, ainda que preliminarmente, a presença de clones de HPN em pacientes portadores de leucemias agudas (LMA, LLA pré-T e LLA de células B comum), independente da ontogenia celular, ao diagnóstico ou em acompanhamento terapêutico. A melhor estratégia de escolha de anticorpos para a identificação de clones HPN em blastos leucêmicos, independente da sua ontogenia, foi a combinação dos anticorpos FLAER e CD45. As hemácias não se mostraram adequadas para caracterizar a presença desses clones nos pacientes analisados.

APOIO FINANCEIRO

Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram não ter havido qualquer tipo de conflitos de interesses durante a realização do estudo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram com a idealização do estudo, a análise e a interpretação dos dados e com a redação do manuscrito, aprovando a versão final publicada. Declaram-se responsáveis pelo conteúdo integral do artigo, garantindo sua precisão e integridade.



REFERÊNCIAS

- 1 Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: stem cells and clonality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008 Jan;2008(1):111-5.
- 2 Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur J Haematol*. 2009 Dec;83(6):503-11.
- 3 Mortazavi Y, Merk B, McIntosh J, Marsh JCW, Schrezenmeier H, Rutherford TR. 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 Apr;101(7):2833-41.
- 4 Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014 Oct;124(18):2804-11.
- 5 Devallet B, Mullier F, Chatelain B, Dogné JM, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol*. 2015 Sep;95(3):190-8.
- 6 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. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1862-9.
- 7 Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014 Oct;124(10):4529-38.
- 8 Schubert J, Roth A. Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: on the long way to understand the principles of the disease. *Eur J Haematol*. 2015 Jun;94(6):464-73.
- 9 Lee SC, Abdel-Wahab O. The mutational landscape of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria revealed: new insights into clonal dominance. *J Clin Invest*. 2014 Oct;124(10):4227-30.
- 10 Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010 Jul;78(4):211-30.
- 11 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 Sep;95(9):1555-7.
- 12 Araten DJ, Luzzatto L. The mutation rate in *PIG-A* is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2006 Jul;108(2):734-6.
- 13 Araten DJ, Bessler M, McKenzie S, Castro-Malaspina H, Childs BH, Boulad F, et al. Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. *Leukemia*. 2002 Nov;16(11):2243-8.
- 14 Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, et al. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2006 Dec;108(13):4232-6.
- 15 Mortazavi Y, Tooze JA, Gordon-Smith EC, Rutherford TR. N-RAS gene mutation in patients with aplastic anemia and aplastic anemia/ paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during evolution to clonal disease. *Blood*. 2000 Jan;95(2):646-50.
- 16 Katagiri T, Tominaga R, Kataoka K, Maeda A, Gomyo H, Mizuno I, et al. A cure for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using molecular targeted therapy specific to a driver mutation. *Blood*. 2015;126(23):1215a.
- 17 Traulsen A, Pacheco JM, Dingli D. On the origin of multiple mutant clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Stem Cells*. 2007 Dec;25(12):3081-4.
- 18 Dingli D, Pacheco JM, Traulsen A. Multiple mutant clones in blood rarely coexist. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2008 Feb;77(2 Pt 1):021915.
- 19 Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014 Oct;124(10):4529-38.
- 20 Mon Père N, Lenaerts T, Pacheco JM, Dingli D. Evolutionary dynamics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *PLoS Comput Biol*. 2018 Jun;14(6):e1006133.

Recebido em / Received: 12/3/2018

Aceito em / Accepted: 19/2/2019

Como citar este artigo / How to cite this article:

Brito Júnior LC, Oliveira FR, Cardoso DA, Melo BMS, Nascimento MH, Carneiro DM, et al. Presença de clones de hemoglobinúria paroxística noturna em portadores de leucemia aguda do estado do Pará, Amazônia, Brasil, Brasil. *Rev Pan Amaz Saude*. 2019;10:e201900021. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-6223201900021>