

Estudio multicéntrico argentino de detección y seguimiento de clones de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) por citometría de flujo multiparamétrica (CFM) de alta resolución

Argentinian multicenter trial of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clones detection and follow-up using high resolution multiparametric flow cytometry (MFC)

Halperin N¹, Altube A¹, Agriello E², Caride C¹, Galeano A³, Galeazzi S⁴, Pavón J⁴, López J⁴, Palazzi J⁴, Iommi P², Malusardi C³, Carelli D⁶, Rodríguez C⁷, Ledesma E⁸, Rodríguez C⁸, Correa J⁸, Ramis E⁶, Guevara R⁵, Novoa V⁵

¹Hospital de Clínicas "José de San Martín" (C.A.B.A.)

²Laboratorio de Especialidades Bioquímicas-Bahía Blanca

³FUNDALEU (C.A.B.A.)

⁴International Integral Clinical Trial-Rosario

⁵Hospital General de Agudos Dr. Carlos G. Durand (C.A.B.A.)

⁶Hospital Dr. Guillermo Rawson (San Juan)

⁷Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba (Córdoba)

⁸Laboratorio de Salud Pública de San Miguel de Tucumán.

nosihalperin@gmail.com

Fecha recepción: 30/06/2018

Fecha aprobación: 3/12/2018



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA

Volumen 22 n° 3: 250-254

Septiembre - Diciembre 2018

Palabras claves: hemoglobinuria paroxística nocturna, gen *PIGA*, citometría de flujo.

Keywords: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *PIGA* gene, flow cytometry.

Resumen

La HPN es una enfermedad clonal adquirida, no maligna, que se origina por mutación del gen *PIGA* en una célula progenitora hematopoyética, lo que determina la ausencia total o parcial de múltiples proteínas que se unen a la membrana a través del ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI). Nuevas estrategias de análisis y nuevas moléculas permiten una mayor sensibilidad en la detección de clones pequeños. Nuestro objetivo fue estudiar la incidencia de clones HPN por CFM en distintos centros del país y destacar la ventaja de protocolos estandarizados, con

nuevas moléculas, en la detección de clones HPN al diagnóstico. Para ello se analizaron 832 muestras de sangre periférica (SP) pertenecientes a pacientes de 8 laboratorios de distintos puntos geográficos, del año 2013 al 2017, que habían sido evaluados para la identificación de clones HPN por citometría de flujo. Los clones HPN fueron identificados y cuantificados en la población de neutrófilos y monocitos según la expresión de moléculas ancladas por GPI como CD14, CD66b, CD24, CD157, CD16 y FLAER y en los glóbulos rojos (GR) según la ex-

presión de CD59. Se evaluaron 832 muestras, en 189 (22,72%) se hallaron clones HPN. Los diagnósticos presuntivos fueron de: HPN en 279 muestras (33,53%), aplasia medular en 73 (8,77%), citopenias en 131 (15,75%), trombosis en lugares atípicos en 83 (9,98%), anemias en 170 (20,43%) y en 96 muestras no se especificó el diagnóstico (11,54%). Los clones más pequeños ($\leq 10\%$) representaron el 8,65% de las muestras (72/832) y fueron hallados con mayor frecuencia en pacientes con sospecha diagnóstica de aplasia medular (36,11%), citopenias (25,00%), y HPN (22,22%). Los clones medianos ($>10\%-\leq 50\%$), detectados en 3,85% de las muestras (32/832), tuvieron principalmente sospecha de HPN. Los clones $>50\%$, -10,22% de las muestras (85/832)- se encontraron fundamentalmente en HPN. Se observó un aumento en el número de pesquisas en pacientes con diferentes citopenias con respecto a años anteriores, con hallazgos de clones pequeños, gracias a los nuevos protocolos, que mostraron mayor sensibilidad y especificidad. En cuanto a la gestión del proceso de comunicación entre médico-bioquímico, se destaca una disminución en el porcentaje de pacientes que venían sin diagnóstico (41% al 2013, a 11,54% al 2017). Esto ayuda en la interpretación de los resultados y en el conocimiento de la enfermedad.

Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a non-malignant acquired clonal disease caused by a mutation in the *PIGA* gene of hematopoietic stem cells, which causes a total or partial absence of GPI anchored proteins in the cell membrane. New analytic strategies and new molecules allow an increased sensibility to detect of small PNH clones. Our aim was to study the incidence of PNH clones using MFC in different centres around the country and to highlight the advantages of standardized protocols using new molecules in the detection and diagnosis of PNH clones. To do this, 832 peripheral blood (PB) samples that had been scanned for PNH clones using flow cytometry (from 2013 until 2017) from 8 laboratories in different geographical areas of the country were analysed. PNH clones were identified and quantified in neutrophils and monocytes based on the partial or total expression absence of GPI anchored proteins such as CD14, CD66b, CD24, CD157, CD16 and FLAER, and in red blood

cells (RBC) based on the absence of CD59. PNH clones were found in 189 (22.72%) of the 832 samples tested. Clinical suspicions were: PNH in 279 samples (33.53%), marrow aplasia in 73 (8.77%), cytopenia in 131 (15.75%), thrombosis of atypical location in 83 (9.98%), anemia in 170 (20.43%) and 96 without diagnosis (11.54%). The smallest clones ($\leq 10\%$), detected in 8.65% of the samples (72/832), were found to have a larger incidence in patients with clinical suspicion of: bone marrow aplasia (36.11%), cytopenias (25.00%) and PNH (22.22%). Medium clones, $>10\%-\leq 50\%$, 3.85% of the samples (32/832), were found to have a larger incidence in samples with clinical suspicion of PNH. The clones $>50\%$, 10.22% of the samples (85/832), were found mostly in PNH. An increase in the number of positive results by detection of small clones was observed in patients with different cytopenias thanks to the new protocols, showing a higher sensibility and specificity. Regarding the management of the doctor-biochemist communication process, in the last 4 years a considerable improvement reporting patient information was observed. The percentage of patients without a diagnosis decreased drastically (from 41% in 2013 to 11.54% in 2017). This is of significant help in the interpretation of results and in gaining a better understanding of the disease.

Introducción

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad poco frecuente, no maligna, originada por un trastorno clonal adquirido de la célula precursora hematopoyética causado por una mutación somática en el gen fosfatidilinositolglucano clase A (*PIGA*). Este gen codifica una proteína involucrada en la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que sirve como anclaje a muchas proteínas de la membrana celular. La expresión parcial o ausencia de estas proteínas, unidas a la membrana celular a través del ancla GPI, provoca, entre otras cosas, un aumento de la sensibilidad a la destrucción celular mediada por el complemento^(1,2), causando la anemia hemolítica característica de esta enfermedad. La HPN es una enfermedad sistémica que puede involucrar a varios órganos, como hígado, riñón, pulmón, sistema nervioso central y/o corazón, y se caracteriza principalmente por hemólisis intravascular, trombosis y falla medular^(3,4). La citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es el método de elec-

ción para el diagnóstico de la enfermedad, ya que permite identificar y cuantificar clones HPN con alta sensibilidad, evaluando la expresión de las proteínas ancladas al GPI en poblaciones de neutrófilos, monocitos y glóbulos rojos aun en pacientes asintomáticos^(5,6). En la actualidad, varias guías internacionales recomiendan el estudio de clones HPN por citometría de flujo en pacientes que presentan hemólisis intravascular, trombosis en sitios inusuales, citopenias idiopáticas y pacientes con aplasia medular o con mielodisplasia hipoplásica^(3,7-9,13).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la prevalencia de clones HPN por CFM en nuestro país y destacar la ventaja de protocolos estandarizados, con nuevas moléculas, en la detección de clones HPN al diagnóstico.

Material y métodos

Se analizaron 832 muestras de sangre periférica (SP) pertenecientes a pacientes con criterios clínicos para HPN y que fueron evaluados en 8 laboratorios de distintos puntos geográficos del país desde el 2013 a la fecha. Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas en EDTA y estudiadas dentro de las 24 hs. En el estudio por CFM se utilizaron citómetros de 3, 4 u 8 canales (FACSCan, FACS Calibur, FACS CantoII de Becton Dickinson) y se analizaron los datos con los programas Paint-a-Gate o Infinicyt.

Para el estudio de glóbulos blancos (GB) se realizó una inmunomarcación directa con paneles de anticuerpos monoclonales que permiten la identificación de las poblaciones de neutrófilos y monocitos (CD45, CD15, CD33, CD64) combinados con an-

ticuerpos monoclonales que identifican moléculas ancladas por GPI (CD157, CD14, CD24, CD66b, CD16) y FLAER (molécula que se une directamente al GPI). Luego de una incubación de 15 minutos en oscuridad, los eritrocitos fueron lisados con FACS-Lysis. Previo a la adquisición, se realizó un lavado con PBS/Albúmina.

Los glóbulos rojos (GR) se evaluaron por inmunomarcación directa utilizando un panel de anticuerpos monoclonales. Glicoforina A FITC (CD235A) para identificar la población de GR y CD59PE (clon MEM-43) para evaluar el clon HPN. Luego de la incubación de 15 minutos en oscuridad, se realizaron dos lavados con PBS, sin albúmina, previo a la adquisición.

Para considerar positivo el hallazgo de un clon HPN se tomaron criterios internacionales⁽¹³⁾: hallazgo de 2 o más poblaciones con ausencia total o parcial de 2 o más moléculas ancladas por GPI, o ausencia total o parcial de expresión de FLAER.

Resultados

De las 832 muestras estudiadas, 189 presentaron clones HPN, con una prevalencia del 22,72%. Las sospechas diagnósticas, según los datos enviados por los médicos en la solicitud de estudio, fueron: 279 HPN (33,53%), 73 aplasia medular (8,77%), 131 citopenias (15,75%), 83 trombosis en lugares atípicos (9,98%), 170 anemias (20,43%), 96 sin diagnóstico (11,54%). La evaluación del tamaño del clon (≤ 10 , $>10-\leq 50$ y >50) con las diferentes sospechas diagnósticas registradas se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1

Rangos	Aplasias	Citopenias	Anemias	HPN	SD	Trombosis	Total
≤ 10	26 (36,11%)	18 (25,00%)	7 (9,72%)	16 (22,22%)	3 (4,17%)	2 (2,78%)	72 (8,65%)
$>10-\leq 50$	4 (12,50%)	3 (9,38%)	4 (12,50%)	19 (59,38%)	2 (6,24%)	0 (0%)	32(3,85%)
>50	7 (8,24%)	5 (5,88%)	8 (9,40%)	58 (68,24%)	6 (7,06%)	1 (1,18%)	85(10,22%)

SD: sin diagnóstico

Prevalencia de clones $<10\%$

Los clones HPN más pequeños ($\leq 10\%$) se registraron en el 8,65% de las muestras (72/832) y fueron hallados, con mayor frecuencia, en pacientes con sospecha diagnóstica de aplasia medular (36,11%), citopenias (25,00%) y HPN (22,22%) (**Figura 1**).

Prevalencia de clones >10 y ≤ 50 %

Clones HPN con un tamaño entre 10% y 50% se

identificaron en el 3,85% de las muestras (32/832). Fueron más frecuentes en las muestras de pacientes con sospecha de HPN (59,38%) (**Figura 2**).

Prevalencia de clones $>50\%$

Los clones HPN de mayor tamaño ($>50\%$) se identificaron en un 10,22% de las muestras evaluadas (85/832). El 68,24% de las muestras correspondieron a pacientes con HPN (**Figura 3**).

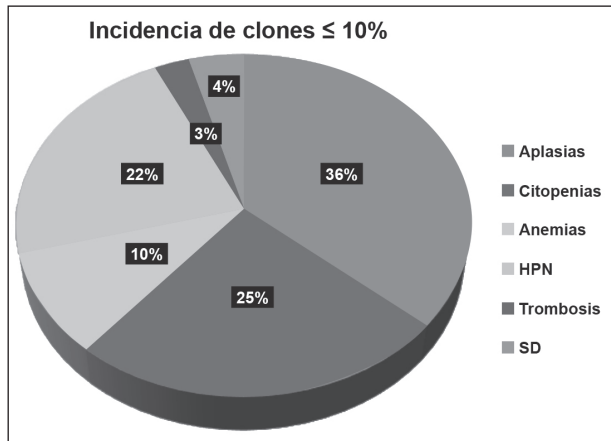


Figura 1

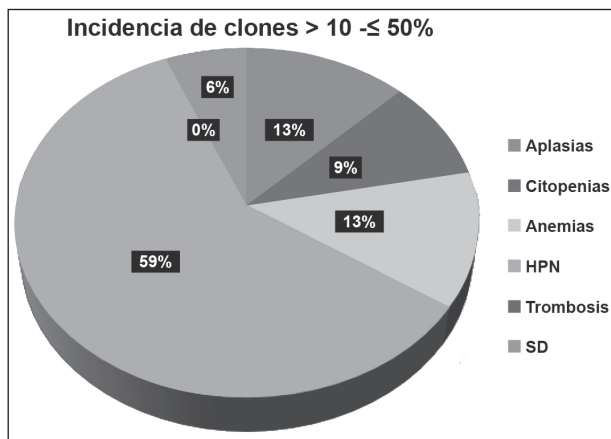


Figura 2

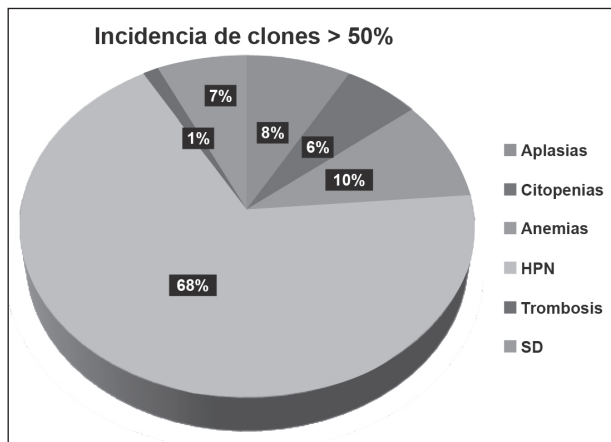


Figura 3

Discusión

La HPN es una enfermedad clonal poco frecuente con manifestaciones clínicas variadas y multisistémicas. Algunos individuos pueden presentar síntomas leves, sin embargo otros pacientes tienen un gran deterioro en su calidad de vida y/o compromisos graves que pueden causarle la muerte. En los úl-

timos años se han desarrollado importantes avances, tanto en el manejo terapéutico de esta enfermedad con el bloqueo del complemento (que disminuyen el riesgo de complicaciones graves y mejoran la calidad de vida⁽¹⁰⁾), como a nivel diagnóstico y de seguimiento con el aporte de la citometría de flujo multiparamétrica⁽¹³⁾ que permite el uso de técnicas de alta sensibilidad para la identificación de clones muy pequeños en pacientes asintomáticos o con patologías hematológicas asociadas como la anemia aplásica y la mielodisplasia^(11,12).

En nuestro estudio la prevalencia de clones HPN positivos fue del 22,72%. Nosotros observamos un aumento en el número de pesquisas en pacientes con diferentes citopenias, con hallazgos de clones pequeños, gracias a los nuevos protocolos estandarizados y a la incorporación de nuevas moléculas como CD157 (ectoenzima que pertenece a la familia de CD38) y FLAER (variante de la proaerolisina conjugada con fluorescencia con capacidad de unión a GPI) que muestran una mayor sensibilidad y especificidad. En cuanto a la gestión del proceso de comunicación entre médico y bioquímico, se destaca una mejora en el suministro de datos en estos últimos 4 años, ya que se vio una disminución en el porcentaje de pacientes que venían sin diagnóstico (41% al 2013, 11,54% al 2017). Esto ayuda en la interpretación de los resultados y en el conocimiento de la enfermedad.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés

Bibliografía

1. Morado M, Subirá D, López M. Hemoglobinuria paroxística nocturna: nuevos tratamientos y recomendaciones generales para su diagnóstico. Med Clin. 2010; 134(8):369-374.
2. Brodsky R. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2009; 113: 6522-6527.
3. Urbano- Ispizua A, Gaya A, Colado E y col. Diagnóstico y tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna. Med Clin (Barc). 2011; 136 (3): 121- 127.

4. Devalet B, Mullier F, Chatelain B, Dogné JM, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur. J. Haematol.* 2015. <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejh.12543/epdf>.
5. Hernández- Campo PM, Almeida J y Orfao A. Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clin (Barc)*. 2008; 131(16): 617- 630.
6. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of Flow Cytometry to the diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry*. 2000; 42:223–233.
7. Guía Clínica HPN. Consenso Español para el diagnóstico y tratamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Actualización 2014. http://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/documentos/guias/Guias_HP_N_2014.pdf
8. Parker C, Omine M, Richards S. y col. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106(12): 3699- 3709.
9. Borowitz M, Craig F, DiGiuseppe J. y col. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B*. 2010; 78B: 211- 230.
10. Roth A and Dühssen U. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of eculizumab. *European Journal Haematology*. 2011; 87: 473- 479.
11. 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.
12. Sutherland DR, Illingworth A, Keeney M, and Richards SJ. High-sensitivity detection of PNH red blood cells, red cell precursors, and white blood cells. *Curr. Protoc. Cytom.* 2015; 72:6.37.1-6.37.29.
13. Sutherland DR, Ortiz F, Quest G, Illingworth A, Benko M, Nayyar R, Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jan 30.