

Hemoglobinuria paroxística nocturna: diagnóstico por citometría de flujo multiparamétrica

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria:
diagnosis by multiparametric flow cytometry

Torreguitart F.¹, Iommi P.¹, Sandoval M.³, Gaite A.⁴, Agriello E.^{1,2,3}

¹LEB Laboratorio, Bahía Blanca, Provincia de Bs. As., Argentina.

²Servicio de Hematología Hospital Dr. Penna, Bahía Blanca,
Provincia de Bs. As. Argentina.

³Cátedras de Hematología Clínica y Bioquímica Clínica II, Departamento de
Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca,
Provincia de Bs. As. Argentina.

⁴Hospital Pablo Soria, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

evangeagriello@hotmail.com

Fecha de recepción: 18/03/2016
Fecha de aprobación: 20/04/2016



LABORATORIO
EN HEMATOLOGÍA

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 n° 3: 354 - 357
Septiembre - Diciembre 2016

Palabras clave: HPN
GPI
FLAER
CD157

Keywords: PNH
GPI
FLAER
CD157

Resumen

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal adquirida causada por una mutación somática en el gen PIG-A (fosfatidilinositolglicano-clase A) localizado en el brazo corto del cromosoma X (Xp22.1). La mutación ocurre a nivel de la célula precursora hematopoyética, y el gen afectado codifica para una proteína involucrada en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI). El resultado de esta mutación es una deficiencia parcial o total en la expresión de proteínas normalmente ancladas a la superficie de la membrana celular vía GPI.

Las manifestaciones clásicas de la enfermedad son: anemia por hemólisis intravascular, episodios de hemoglobinuria, falla medular con citopenias periféricas y fenómenos tromboembólicos, con frecuencia en sitios inusuales.

Los distintos signos y síntomas que se presentan tienen gran impacto en la calidad de vida de los pacientes, por lo que un diagnóstico correcto es de vital importancia. Actualmente, la citometría de flujo multiparamétrica es la metodología de elección para detectar y seguir al paciente con HPN.

Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal disease caused by a somatic mutation in the PIG-A gene (phosphatidylinositol glycan-class A) located on the short arm of X chromosome (Xp22.1). The mutation occurs at a hematopoietic precursor cell, and the affected gene encodes a protein involved in the glycosyl phosphatidylinositol (GPI) synthesis. The result of this mutation is a partial or total deficiency in the expression of those proteins that are usually attached to the cellular membrane surface by the GPI anchor.

The classic manifestations of the disease include intravascular hemolytic anemia, episodes of hemoglobinuria, bone marrow failure with peripheral cytopenias and thromboembolic phenomena, often in unusual places.

The different signs and symptoms that experience these patients have great impact on their quality of life, hence a correct diagnosis is vital. Currently, multiparametric flow cytometry is the methodology of choice to detect and monitor patients with PNH.

Introducción

Actualmente, la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) se utiliza como método de diagnóstico y seguimiento de los pacientes que presentan distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad por presentar ventajas tales como precisión, rapidez y mayor sensibilidad respecto de las técnicas utilizadas tradicionalmente. Así pueden clasificarse distintos tipos celulares en función de la expresión de proteínas ancladas a membrana por GPI:

Tipo I: sin déficit, normal

Tipo II: déficit parcial

Tipo III: déficit total

El diagnóstico requiere demostrar el déficit de expresión de 2 ó más proteínas asociadas a GPI en 2 ó más líneas celulares hematopoyéticas distintas. Actualmente, la recomendación es evaluar en primer instancia, los neutrófilos y monocitos, y posterior-

mente eritrocitos^(2,3).

En el presente trabajo se presenta una estrategia de combinación de anticuerpos recomendable para lograr una alta sensibilidad en el diagnóstico de la enfermedad.

Fundamento

El estudio de las proteínas asociadas a GPI debe combinarse con marcadores que permitan la correcta identificación de las poblaciones celulares de interés.

Una vez seleccionadas, se evalúan marcadores que resultan de utilidad como CD16, CD24, CD157 y FLAER en neutrófilos, y CD14, CD157 y FLAER en monocitos. Al comprobar la existencia del clon HPN en las poblaciones anteriores, se estudia en segunda instancia, la expresión de CD59 en eritrocitos^(2,3) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Anticuerpos para la identificación de poblaciones y evaluación de proteínas unidas vía el anclaje GPI

Anticuerpo	Clon recomendado	Población evaluada	Función
CD64/CD45 ó CD33/CD45	No determinante	Monocitos	selección
CD15/CD45	No determinante	Neutrófilos	selección
FLAER Alexa 488		Neutrófilos y monocitos	GPI
CD157 PE	SY11B5	Neutrófilos y monocitos	GPI
CD16 FITC	3G8	Neutrófilos	GPI
CD24 PE	ALB9	Neutrófilos	GPI
CD14 PE	MoP9	Monocitos	GPI
CD235a FITC	KC16	Eritrocitos	selección
CD59 PE	MEM-43	Eritrocitos	GPI

En los últimos años se ha avanzado significativamente en el conocimiento de los mejores marcadores a fin de aumentar la sensibilidad y la especificidad en la búsqueda de clones, cayendo en desuso algunos anticuerpos tradicionales (CD55, CD66b, etc.). Actualmente, la mejor propuesta es la combinación de FLAER y CD157. El FLAER es un derivado fluorescente de la toxina bacteriana aerolisina, que es capaz de unirse directamente a GPI de distintas poblaciones leucocitarias, excepto en eritrocitos. Por otro lado, el CD157 tiene la ventaja de permitir la evaluación simultánea de dos poblaciones, neutrófilos y monocitos. La inclusión de estos anticuerpos ha logrado mejorar significativamente la sensibilidad de la técnica, permitiendo la clara identificación de pequeños clones^(1,3,4).

Muestra y poblaciones de interés

La muestra de elección es sangre periférica anticoagulada con EDTA procesada dentro de las 24 horas de extraída.

Dado que la expresión de moléculas asociadas a GPI se modifica a lo largo de la maduración celular, la búsqueda de estos clones en médula ósea debe evitarse, precisamente por la presencia de formas mieloides en distintos estadios de diferenciación.

Los granulocitos neutrófilos y monocitos son poblaciones representativas en sangre periférica y las que suelen mostrar un mayor grado de afectación por su vida media corta. En cambio, los eritrocitos

generalmente muestran un menor tamaño de clon en relación a los leucocitos, como consecuencia del proceso de hemólisis y probables transfusiones⁽²⁾.

Caso clínico

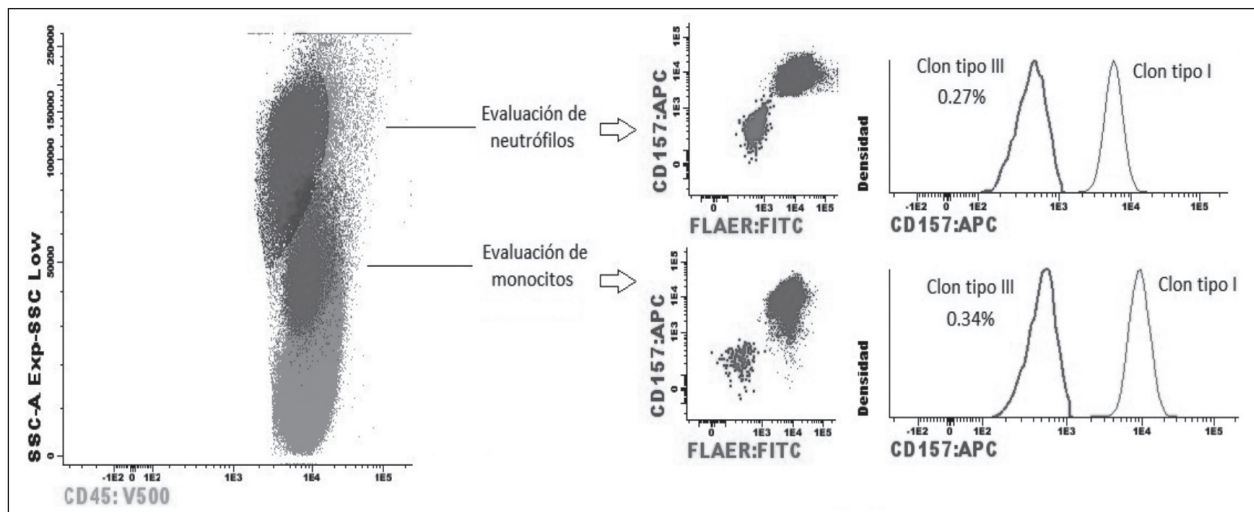
Mujer de 30 años que consultó al Servicio de Hematología por presentar malestar general, astenia y pancitopenia. Los resultados de laboratorio al momento fueron: leucocitos: 2300/mm³ (neutrófilos: 13%, linfocitos: 86%, monocitos: 1%), hemoglobina: 6.3 g/dL, hematocrito: 19%, plaquetas: 26.000/mm³, reticulocitos: 2.1%, VSG: 50 mm/h, hierro: 125 ug/dL, transferrina: 265 ug/dL, saturación de transferrina 47%, LDH: 340 UI/L, bilirrubina total: 0.36 mg/dL, bilirrubina indirecta: 0.15 mg/dL, bilirrubina directa: 0.21 mg/dL, prueba de Coombs directa: negativa, serologías para VIH, VHB, VHC: negativas, anticuerpos anti-ADN: negativo, anticuerpos anti-AR: negativo.

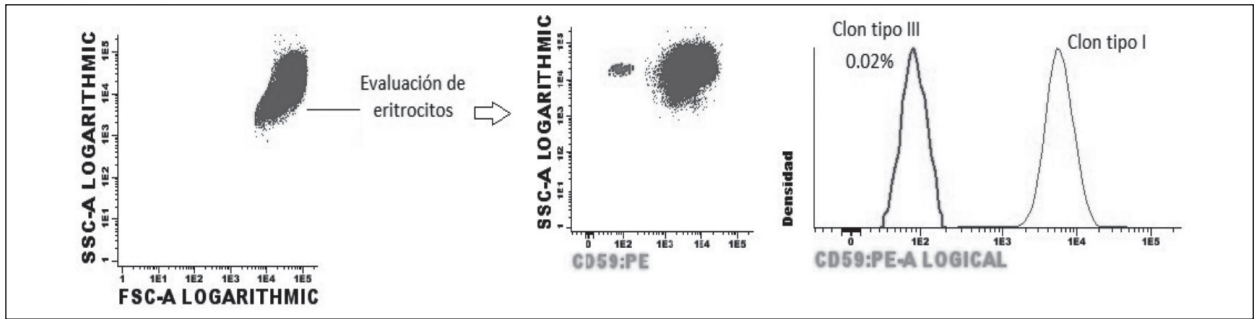
La biopsia de médula ósea mostró marcada hipocelearidad con hipoplasia mieloide y megacariocítica junto a diseritropoyesis con rasgos hipoplásicos.

La pancitopenia junto a una médula aplásica sugiere la búsqueda de clones HPN.

Finalmente, como se observa en la **Figura 1**, la combinación de FLAER y CD157 en la búsqueda de clones HPN por citometría de flujo detectó pequeños clones (<1%) con alta sensibilidad representados en neutrófilos, monocitos y eritrocitos que deberán ser controlados en el tiempo.

Figura 1. Estrategia de análisis de clones HPN. Evaluación de CD157 y FLAER en neutrófilos y monocitos, y CD59 en eritrocitos





Conclusión

La HPN es una enfermedad poco frecuente pero que impacta seriamente en la calidad y esperanza de vida de los pacientes, razones más que suficientes para aplicar metodologías que permitan un diagnóstico certero ante la sospecha de enfermedad. Con el avance en el conocimiento de las distintas proteínas dependientes del anclaje GPI, se vuelve imprescindible el uso de determinados anticuerpos como FLAER y CD157, puesto que permiten alcanzar una alta sensibilidad y especificidad logrando identificar casos de pequeños clones.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés

Bibliografía

1. Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA y col. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Clinical Cytometry Society. Cytometry B Clin Cytom. 2010;78:211-30.
2. Fletcher M, Sutherland DR, Whitby L y col. Standardizing Leucocyte PNH clone detection: An international study. Cytometry Part B. 2014;86B: 311–318.
3. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2012;82:195-208.
4. Sutherland DR, Acton E, Keeney M, Davis BH, Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. Cytometry B Clin Cytom. 2014;86:44-55.