

## Diagnóstico por citometría de flujo de la hemoglobinuria paroxística nocturna

Díaz-Domínguez G<sup>1</sup>, Marsán-Suárez V<sup>1</sup>, Fernández-Delgado ND<sup>1</sup>, Román-Torres R<sup>1</sup>, Lam-Díaz RM<sup>1</sup>, Rodríguez-Rodríguez CR<sup>2</sup>, Muñoz-Caldas L<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Hematología e Inmunología; <sup>2</sup>Hospital Clínico-Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”;

<sup>3</sup>Hospital Universitario Calixto García, La Habana, Cuba

Email: gaby@hemato.sld.cu

### RESUMEN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad genética adquirida ligada al cromosoma X, debida a la expansión clonal de células progenitoras hematopoyéticas que han adquirido una mutación somática en el gen PIG-A. Este gen codifica una proteína involucrada en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI), un glicolípido cuya función biológica es el anclaje de proteínas a la membrana celular. Los pacientes con deficiencias en la expresión de estas proteínas son susceptibles a episodios trombóticos y de hemólisis intravascular. Actualmente, la citometría de flujo (CMF) es el método de elección para la identificación de células deficitarias en GPI. El objetivo de esta investigación fue establecer el diagnóstico por CMF de pacientes con sospecha de HPN e identificar las poblaciones celulares que presenten clones afectados por la mutación. El inmunofenotipaje celular por CMF de sangre periférica se realizó con la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie que se encuentran normalmente anclados a las membranas de leucocitos y eritrocitos mediante GPI. Los datos obtenidos se analizaron en el programa informático Kaluza, en un citómetro GALLIOS, Beckman Coulter. De un total de 25 pacientes con sospecha de padecer HPN, 13 (52 %) resultaron positivos. De ellos, cinco pacientes (38,4 %) presentaron la forma clásica de la enfermedad. En seis enfermos (46,2 %) los clones HPN encontrados se asociaron con patologías medulares y dos se diagnosticaron con HPN subclínica. Se encontró que 51% del total de clones HPN identificados correspondieron a la población de granulocitos, siendo la más afectada por la

enfermedad. La CMF permite realizar el diagnóstico rápido y eficaz de pacientes con sospecha de padecer HPN y subclasificarlos en sus diferentes formas clínicas como posible factor pronóstico. Además, posibilita el estudio y la caracterización de las diferentes poblaciones de células involucradas a partir de la identificación de los clones celulares afectados.

**Palabras clave:** hemoglobinuria paroxística nocturna, glicosilfosfatidilinositol, clon HPN, proteínas dependientes de anclaje, citometría de flujo.

## INTRODUCCIÓN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal adquirida, no maligna, causada por una mutación somática en el gen PIG-A que se encuentra en el cromosoma X al final del brazo corto (Xp22.1). Este gen codifica una proteína involucrada en la síntesis del glicosil fosfatidil inositol (GPI), un glicolípido cuya función biológica es el anclaje de proteínas a la superficie de la membrana celular. Dicha mutación ocurre en la célula progenitora hematopoyética. Como resultado de este desorden genético se originan clones de células que carecen total o parcialmente de la expresión de proteínas que se encuentran normalmente unidas a la superficie de la membrana celular a través del GPI.<sup>1</sup>

La HPN se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica crónica intravascular, hemoglobinuria y es frecuentemente, asociada con pancitopenia debido a la insuficiencia medular que sufren estos pacientes. Esta enfermedad se caracteriza además, por la ocurrencia de episodios tromboembólicos recurrentes y de localización atípica (abdominal, visceral, cerebral, cutánea) los cuales ocurren en casi la mitad de los pacientes, incluso en aquellos que presentan trombocitopenia, siendo esta la causa fundamental de morbilidad de la enfermedad. Otras manifestaciones clínicas características de la HPN son: fatiga crónica, dolor abdominal moderado y severo, disfagia, disfunción eréctil e insuficiencia renal. Aunque la incidencia real de la HPN no es bien conocida, se estima la ocurrencia de 1,5 a 2,0 casos por millón de habitantes por año en la población mundial con una prevalencia de 15,9 casos por millón.<sup>2</sup>

Las proteínas de membrana ancladas a GPI CD55 y CD59 están involucradas directamente en la fisiopatología de la HPN. Estas dos moléculas intervienen en la regulación fisiológica de la lisis mediada por el sistema del complemento. La pérdida total o parcial de la expresión de ellas, hacen de los eritrocitos entidades susceptibles a la lisis mediada por complemento.<sup>3</sup>

Actualmente, la CMF es el método de elección para la identificación de células deficitarias en GPI, y es de gran utilidad en el diagnóstico, la clasificación y monitorización de pacientes con diferentes formas clínicas de HPN. El criterio diagnóstico que se tiene en cuenta en la actualidad para la confirmación de HPN por CMF, es que se demuestre el déficit de una o más proteínas dependientes de anclaje a la membrana por GPI en al menos dos líneas celulares.<sup>4</sup>

## OBJETIVOS

*General:* Establecer el diagnóstico por CMF en pacientes con sospecha de HPN. *Específicos:*

- Identificar las poblaciones celulares que presentan clones HPN.
- Subclasificar a los pacientes de acuerdo al tamaño del clon HPN y sus características clínicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras de sangre periférica (SP) provenientes de 25 pacientes con sospecha de padecer HPN en un periodo comprendido entre octubre del 2015 y enero del 2017. Todas las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Inmunología perteneciente al Instituto de Hematología e Inmunología.

El inmunofenotipaje celular (IFC) para el diagnóstico de la HPN se desarrolló por la técnica de citometría de flujo, mediante el marcaje directo y múltiple con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie que se encuentran normalmente anclados a las membranas de leucocitos y eritrocitos por GPI. Para evaluar la expresión de los antígenos en los leucocitos se emplearon anticuerpos monoclonales específicos contra las proteínas de membrana CD16, CD24, CD55 y CD59 en la población de granulocitos-neutrófilos y CD14 y CD59 en los monocitos. El *gate* o ventana de dichas poblaciones fue realizado mediante un gráfico de puntos

con la utilización del CD45/side Scatter (SSC) y el CD15/SSC para los granulocitos y el CD64/SSC para los monocitos, lo cual permitió la separación de ellos del resto de las poblaciones celulares. El estudio en hematíes (identificados con glicoforina a) se realizó mediante la evaluación de la expresión de CD59.

Se tomaron 100  $\mu$ L de SP, se le añadieron los monoclonales y se incubaron durante 20 a 30 minutos, protegidas de luz y a temperatura ambiente. El lisado de los hematíes se llevó a cabo con cloruro de amonio durante 10 min, a temperatura ambiente. Para el estudio en los hematíes se omitió este paso. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con cloruro de sodio a 0,9 % y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm. Las células se fijaron con 300  $\mu$ L de formaldehído a 1% para conservar su viabilidad y luego fueron guardadas a 4°C hasta ser leídas en un citómetro *GALLIOS, Beckman Coulter*. Los datos obtenidos se analizaron con el empleo del programa informático *Kaluza*, versión 1.2.

Se determinaron los niveles de expresión de cada antígeno específico para las diferentes poblaciones celulares analizadas. Se consideraron positivos los clones celulares con pérdida parcial o total de la expresión de proteínas ancladas a GPI > 1 %. La expresión de CD59 sobre la población de eritrocitos se determinó mediante la intensidad de fluorescencia media (IFM). Los eritrocitos se clasificaron como: tipo I (elevada IFM del CD59, expresión normal del antígeno sobre células normales), tipo II (moderada IFM del CD59, células con deficiencia parcial en los niveles de expresión del antígeno) y tipo III (baja IFM del CD59, deficiencia completa en la expresión del antígeno). ¡Error! Marcador no definido.

## RESULTADOS

Del total de pacientes estudiados 60 % fueron de género femenino y la edad promedio fue de 45 años.

De los 25 pacientes con sospecha de padecer HPN, 13 (52 %) resultaron positivos. De ellos, cinco pacientes (38,4 %) presentaron la forma clásica de la enfermedad. En seis enfermos (46,2 %) los clones HPN encontrados se asociaron con patologías medulares y dos (15,4 %) se diagnosticaron con HPN subclínica.

Los clones HPN encontrados en las diferentes poblaciones de células analizadas según los niveles de expresión de las proteínas evaluadas se muestran en la siguiente tabla.



**Tabla.** Cuantificación de los clones HPN por cada población evaluada

Subclasificación HPN	Poblaciones de células		
	Granulocitos No. de clones HPN	Monocitos No. de clones HPN	Eritrocitos No. de clones HPN
HPN subclínica	2	2	1
HPN asociado con insuficiencias medulares	14	6	4
HPN clásica	10	7	4
Total	26 (52 %)	15 (30 %)	9 (18 %)

Los resultados obtenidos mostraron que en las poblaciones de granulocitos y monocitos se encontraron 26 (52 %) y 15 (30 %) clones afectados respectivamente, de un total de 50 clones HPN identificados. En los hematíes solo se observaron 9 (18 %) clones HPN, siete de ellos presentaron una deficiencia parcial en la expresión de CD59 y solo 2 mostraron deficiencia total en la expresión de dicha proteína. Se demostró que los granulocitos resultaron los más afectados por la enfermedad.

La variedad de HPN (clásica, asociada con insuficiencias medulares y subclínica), que mayor cantidad de clones afectados presentaron las poblaciones celulares estudiadas fue la HPN relacionada con patologías medulares, con 48 % del total de clones analizados. La HPN clásica y subclínica presentaron 42 % y 10 % respectivamente de estos clones.

## CONCLUSIONES

1. La CMF permite realizar el diagnóstico rápido y eficaz de pacientes con sospecha de padecer HPN y subclasificarlos en sus diferentes formas clínicas como posible factor pronóstico.

2. Posibilita el estudio y la caracterización fenotípica de las diferentes poblaciones de células involucradas, a partir de la identificación de los clones celulares afectados.
3. Se demuestra la importancia de la evaluación de las proteínas dependientes de anclaje a GPI no solo en hematíes, sino también en leucocitos.

## RECOMENDACIONES

1. Ampliar el estudio a pacientes con síndrome mielodisplástico y anemia aplástica.
2. Introducir la proaerolisina inactiva (FLAER) para optimizar el diagnóstico de HPN de alta sensibilidad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Galeano A, Sapia S, Spinelli O, Geraghty G, Ferreyra Y. Hemoglobinuria paroxística nocturna: diagnóstico y seguimiento por Citometría de Flujo. *Hematología* 2014; 18(1):67-9.
2. Sahin F, Comert M, Gokmen N, Yilmaz M, Oruc N, Gurgun A *et al.* Multidisciplinary clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria *Am J Blood Res* 2015;5(1):1-9.
3. Yang HS, Yang M, Li X, Tugulea S and Dong H. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in peripheral blood and bone marrow with six-color flow cytometry. *Biomarkers Med.* 2013;7(1):99–111.
4. Villegas A, Arrizabalaga B, Bonanad S, Colado E, Gaya A, González A *et al.* Consenso español para el diagnóstico y tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clin (Barc)* 2016;146(6):278.e1-278.e7