

Diagnóstico y seguimiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna por Citometría de Flujo

Introducción

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno clonal de células madre hematopoyéticas que se origina al adquirir una mutación en el gen *PIG-A*, cuyo producto es requerido para la biosíntesis de glicofosfatidilinositol (GPI), un glucolípido responsable de la unión de múltiples proteínas a la membrana plasmática de las células. La consecuencia de esta mutación es la reducción o ausencia de expresión de las proteínas ancladas mediante GPI en la progenie de las células madre hematopoyéticas afectadas.

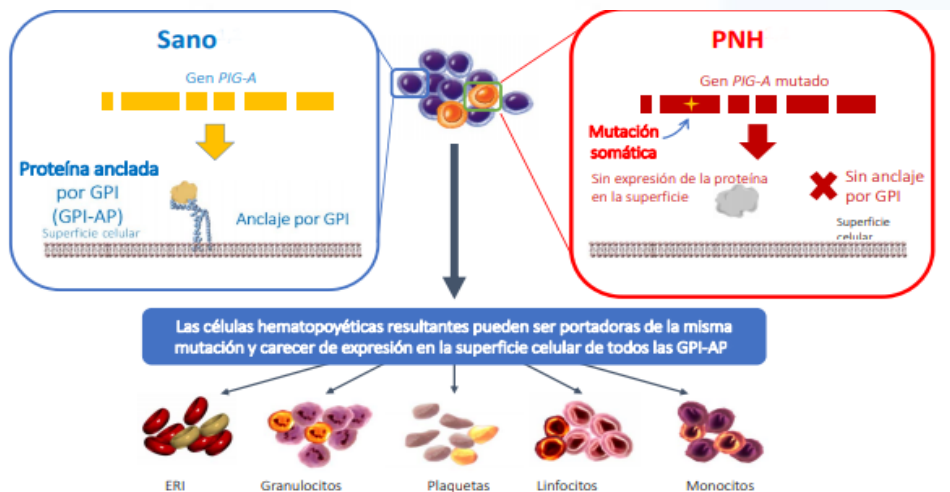


Fig 1. La mutación en el gen *PIG-A* impide la expresión en superficie de la proteína anclada por GPI.

Entre estas proteínas afectadas se encuentran CD55 y CD59, ambos inhibidores fisiológicos de la activación del complemento y cuya ausencia de expresión es fundamental para explicar la fisiopatología de la enfermedad, al provocar que los eritrocitos sean especialmente susceptibles a la **hemólisis intravascular** y extravascular.

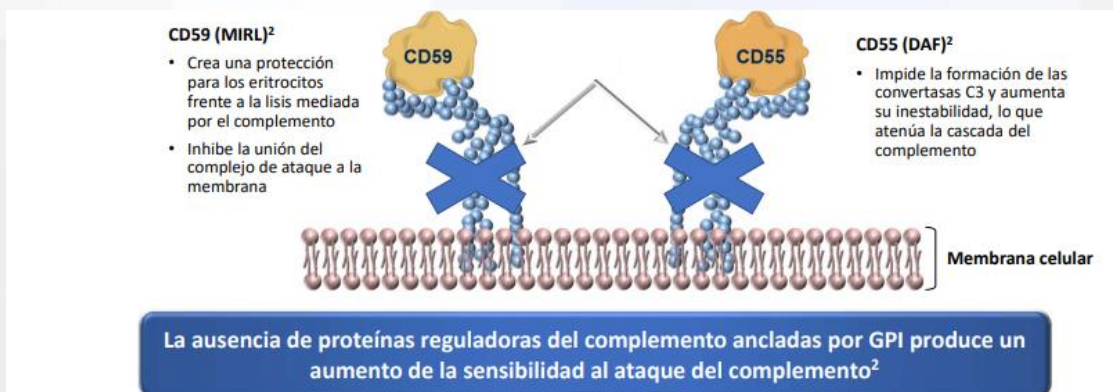


Fig 2. Acción de los inhibidores fisiológicos CD55 y CD59 sobre el sistema de complemento.

Catlab Informa

La hemólisis intravascular es la causa que contribuye principalmente a la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad, debido a que la hemoglobina liberada captura el óxido nítrico causando su depleción a nivel tisular, provocando una vasoconstricción periférica que contribuye a la aparición de su sintomatología clásica como espasmos esofágales, disfunción eréctil, insuficiencia renal o trombosis.

Clínicamente, la HPN se caracteriza por una hemólisis intravascular con tendencia a la anemia y trombosis, con un componente variable de insuficiencia medular. La trombosis es la complicación más frecuente y la principal causa de muerte de la HPN, seguida de otras complicaciones severas como hipertensión pulmonar e insuficiencia renal aguda. Actualmente, la HPN se considera como una enfermedad sistémica que puede implicar a diferentes órganos (como el hígado, riñón, SNC, pulmón y/o corazón), y en la que la hemoglobinuria puede no ser objetivable, pues tan solo se presenta al inicio de la enfermedad en el 26% de los casos, y en el 62% en aquellos con un largo curso evolutivo de la enfermedad.

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna **se encuentra asociada a otras patologías hematológicas caracterizadas por el fracaso medular**, como la Anemia Aplásica (AA) adquirida o heredada, o el síndrome mielodisplásico (SMD). Por tanto, es recomendable descartar la presencia de un clon de HPN en aquellos casos caracterizados por una citopenia sin explicación, en los que la anemia aplásica o el síndrome mielodisplásico formen parte del diagnóstico diferencial. Las clonas de HPN en pacientes con diagnóstico de SMD suelen presentar un tamaño inferior a aquellas presentes en HPN clásico o AA, detectándose en un rango entre el 0.02% y 2.41% de la población analizada. La hipótesis actual que explica el mayor tamaño de las clonas de HPN en AA defiende que el ataque autoinmune hacia los progenitores hematopoyéticos, característico de esta enfermedad, tiene como preferencia los progenitores normales sobre los afectados por la mutación de HPN. Esta selección explicaría por qué el 40% de los HPN evoluciona desde una Anemia Aplásica.

En función de la sintomatología o la presencia de fracaso medular, el International PNH Interest Group (IPIG) clasifica los clones de HPN en tres grupos: HPN clásico, que incluye pacientes con eventos hemolíticos o trombóticos sin fallo medular, HPN asociado a síndromes de fallo medular, tales como anemia aplásica o síndrome mielodisplásico, y HPN subclínico, en la que los pacientes presentan pequeñas clonas de HPN sin presentar clínica ni alteraciones analíticas asociadas a hemólisis y/o trombosis. Si bien esta clasificación ofrece unas pautas de actuación en el tratamiento inicial del paciente, el manejo del mismo dependerá de su situación clínica, que puede no reflejar por completo ninguna de estas tres categorías.

Actualmente, se calcula que la incidencia de la enfermedad en España es de 2.5 casos al año por cada millón de habitantes. Si excluimos aquellos casos con diagnóstico previo de fallo medular (Anemia aplásica, síndrome mielodisplásico), la cifra se reduce a 0.6 casos al año por cada millón de habitantes. Afecta predominantemente a pacientes al inicio de la treintena sin diferencias entre sexos, si bien en las mujeres embarazadas puede aumentar el riesgo trombótico significativamente. La enfermedad presenta una expectativa de vida acortada respecto a la

Catlab Informa

población general, con una **estimación de supervivencia desde el diagnóstico de 10 a 15 años**. No obstante, la reciente incorporación al tratamiento de **Eculizumab**, un anticuerpo monoclonal que actúa bloqueando la proteína C5 del complemento, ha producido un aumento significativo de la esperanza y la calidad de vida en los últimos años.

Citometría de flujo en Hemoglobinuria Paroxística Nocturna

La citometría de flujo es el método de elección para la identificación de células deficitarias en GPI, de utilidad en el diagnóstico, clasificación y monitorización de pacientes con diferentes formas clínicas de hemoglobinuria paroxística nocturna. Esta técnica nos permite el marcaje, mediante anticuerpos monoclonales ligados a moléculas fluorescentes, de proteínas ligadas a la superficie celular mediante GPI en células del sistema hematopoyético y cuya ausencia de expresión, parcial o total, permitirá identificar la presencia de un clon de HPN.

Para un diagnóstico certero de HPN y la identificación de un déficit de GPI, es necesario la identificación del defecto de expresión en al menos dos marcadores GPI-ligados diferentes. Las series hematopoyéticas frecuentemente analizadas son neutrófilos, monocitos y **serie roja**, si bien esta última **no refleja un tamaño del clon fiable**, dado que los eritrocitos del HPN son especialmente sensibles a la lisis del complemento.

La muestra óptima para la detección de clones de HPN es 5mL de **sangre periférica** en un contenedor con anticoagulante, preferiblemente **EDTA**. Esta muestra debe ser procesada en fresco debido a la labilidad de los eritrocitos, o bien antes de 48h si es conservada a 4°C. La detección de clones en muestra de médula ósea también es posible, pero no preferible, pues la presencia de células inmaduras mono-mielocíticas que expresan antígenos ligados a GPI a bajos niveles, puede conllevar la identificación errónea de clones de HPN.

A la hora de solicitar un estudio de **diagnóstico** de HPN por citometría de flujo, la guía clínica de HPN de la SEHH recomienda descartar la presencia de un clon de HPN ante la presencia de una o más de las siguientes manifestaciones:

| | |
|---|---|
| Anemia hemolítica con prueba de Coombs negativa | Hemoglobinuria |
| Trombosis no explicada, venosa o arterial, en pacientes que cumplan alguna de las siguientes premisas: I. Jóvenes II. Trombosis en localizaciones inusuales III. Evidencia de Hemólisis IV. Cualquier tipo de citopenia | Disfagia intermitente o dolor abdominal de etiología desconocida con evidencia de hemólisis |
| | Aplasia medular (al diagnóstico y anualmente) |
| | Síndrome mielodisplásico hipoplásico |
| | Citopenias idiopáticas mantenidas de significado incierto |

Catlab Informa

Identificación de células deficitarias en GPI

La elaboración de una estrategia de detección con una selección de marcadores específicos de línea, ligados y no ligados a GPI, es clave para la correcta identificación de poblaciones clonales de HPN en las distintas series hematopoyéticas. En Catlab, la selección de marcadores y calibración de la técnica sigue la guía de consenso establecida por la European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) y la Italian Society for Clinical Cell Analysis (ISCCA). A continuación, se expone un resumen de los marcadores utilizados en nuestro laboratorio:

| Tipo de muestra | Sangre periférica |
|---|---|
| 1 ^{er} paso. Selección de poblaciones de estudio | Serie blanca: CD15 (Neutrófilos), CD64 (Monocitos) |
| | Serie roja: CD235a (Eritrocitos) |
| 2 ^o paso. Expresión de marcadores GPI (Identificación de clones) | Serie blanca: FLAER (Neutrófilos y Monocitos) CD157 (Neutrófilos y Monocitos) CD24 (Neutrófilos) CD14 (Monocitos) |
| | Serie roja: CD59 (Eritrocitos) |

Serie blanca

La clasificación de monocitos y neutrófilos se realiza a partir de la señal del Side Scatter (relacionado con la complejidad citoplasmática) y el marcador pan-leucocitario CD45, seguida de los marcadores específicos de línea **no ligados a GPI** CD15 (Neutrófilos) y CD64 (monocitos), que permiten identificar las poblaciones independientemente de la presencia o ausencia del clon de HPN.

Catlab Informa

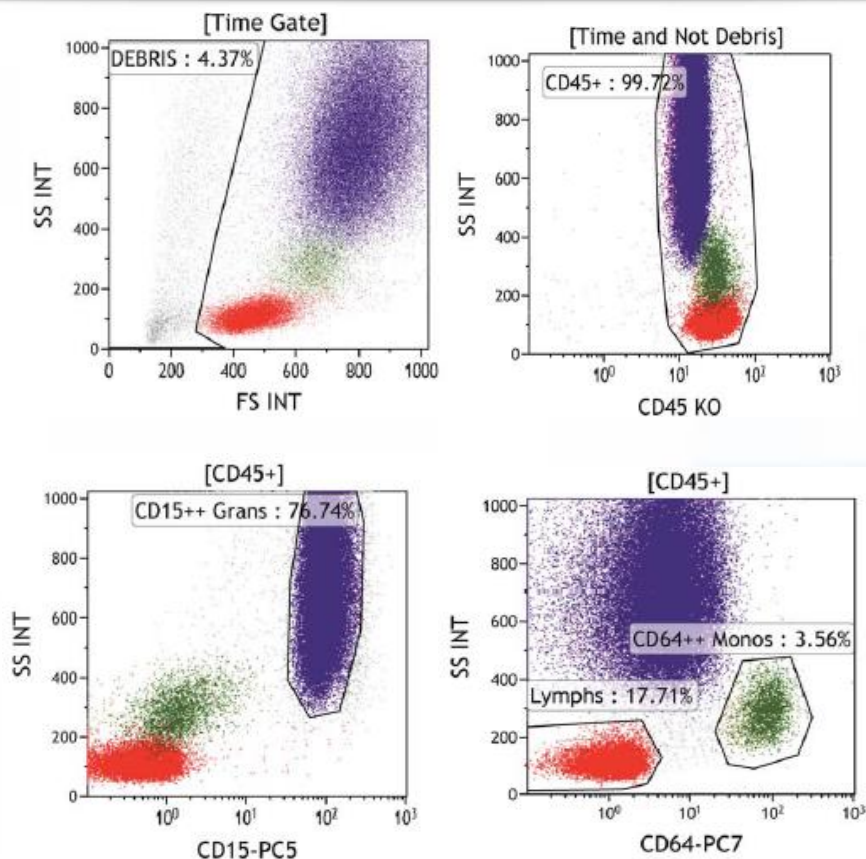


Fig 3. Criterio de selección de poblaciones de neutrófilos y monocitos. Los singletes son seleccionados a partir de SSC vs FSC. Posteriormente se seleccionan las poblaciones leucocitarias CD45+. La población de neutrófilos estará definida por expresión intensa de CD15 y SSC elevado, y la población de monocitos estará definida por una expresión intensa de CD64.

Para la identificación de las clonas de HPN, las guías clínicas actuales apoyan la necesidad de identificar en la serie blanca la ausencia de dos marcadores GPI-ligados o la ausencia de un marcador GPI-ligado y **FLAER**. FLAER es un marcador incorporado recientemente para el diagnóstico por citometría de flujo, compuesto de una variante inactiva de la proteína aerolysina, que se une a las proteínas de superficie ligadas a GPI, permitiendo identificar la ausencia de las mismas en leucocitos y plaquetas, pero no en la serie roja.

En Catlab, para la identificación de clones en granulocitos se utilizan los marcadores GPI-ligados FLAER y CD157, un marcador GPI-ligado específico de neutrófilos (CD24) y un marcador GPI-ligado específico de monocitos (CD14).

Neutrófilos y monocitos son subpoblaciones celulares con una vida media corta, por lo que el grado de afectación del clon en las mismas suele ser mayor. La determinación del tamaño del clon en estos granulocitos ofrece una representación real del mismo y frecuentemente presenta una buena correlación entre monocitos y neutrófilos. Además, **el tamaño del clon** en estas poblaciones es un **valor relevante para el riesgo de trombosis** en pacientes con HPN clásicas.

Catlab Informa

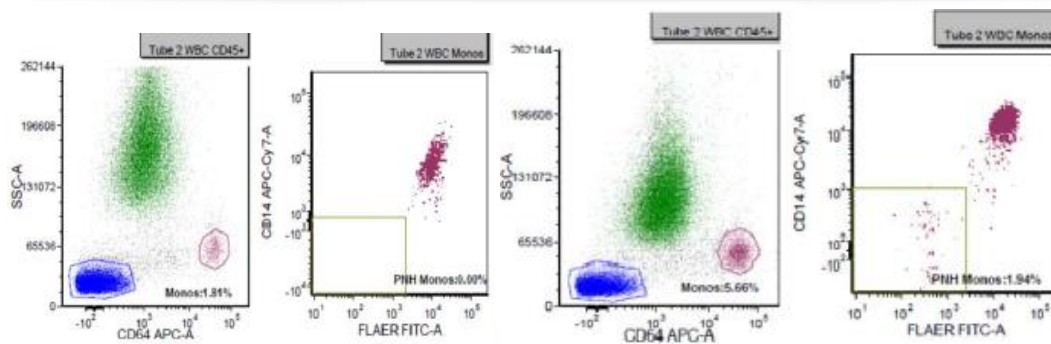


Fig 4. A la izquierda, población de monocitos en paciente sano. A la derecha, paciente diagnosticado de HPN en la que se observa una población de monocitos con pérdida de expresión de los marcadores GPI-ligados CD14 y FLAER.

Una sensibilidad adecuada es un requerimiento indispensable para poder descartar la presencia de clones de HPN durante el diagnóstico diferencial. La ESCCA recomienda alcanzar, en la medida de lo posible, un límite de cuantificación inferior al 0.01%, interpretando con cautela aquellos resultados positivos bajo este límite. Se ha reportado la existencia de clones con mutación del *PIG-A* en pacientes sanos, detectados con sensibilidades de 0.002%, que pueden corresponder a la presencia transitoria de unidades formadoras de colonias sin capacidad de autorrenovación.

Serie roja

La determinación del clon de HPN en serie roja presenta un mayor desafío técnico respecto a su equivalente en serie blanca. El estudio de HPN de la serie roja requiere de una configuración particular de voltajes y compensación de fluorescencias, ajustadas a una población frecuentemente eliminada en la mayoría de procesos preanalíticos de estudios inmunofenotípicos clásicos.

La selección de la población de eritrocitos se realiza mediante la expresión del marcador no ligado a GPI CD235a, una sialo-glicoproteína cargada negativamente cuya frecuente tendencia a formar agregados eritrocitarios se encuentra ampliamente descrita en la bibliografía. La correcta titulación y dilución de este anticuerpo resulta un requisito indispensable para evitar la aparición de agregados en el análisis (Ver figura 5).

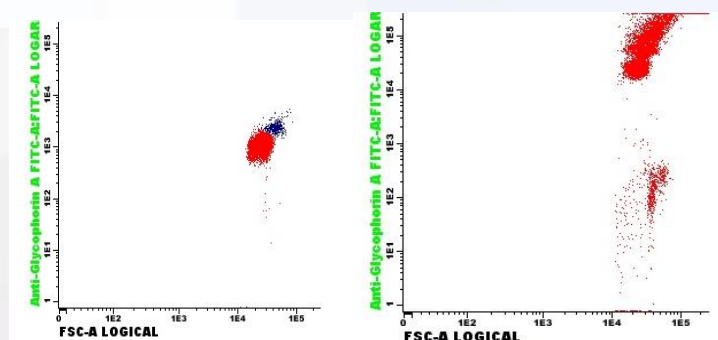


Fig 5. A la izquierda marcaje con una dilución 1/800 de CD235a-FITC: se observan singletes de serie roja con escasa presencia de agregados eritrocitarios (4%). A la derecha marcaje con una dilución 1/20 de CD235a-FITC, se observan abundantes agregados plaquetarios con una señal significativamente más intensa en FITC.

Catlab Informa

La identificación de clones de HPN en serie roja se realiza mediante la expresión del marcador GPI-ligado CD59, cuya ausencia de expresión parcial (HPN tipo II), o absoluta (HPN tipo III), determina el tipo de clon de HPN y el tamaño relativo de los mismos.

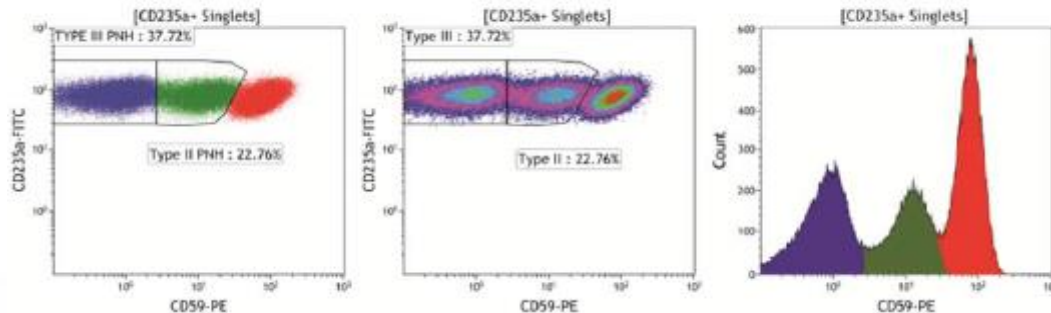


Figura 6. Ejemplo de clon de HPN en serie roja en la que observa la presencia de dos poblaciones patológicas. En verde, una población de HPN tipo II con pérdida parcial de expresión de CD59; en morado, población de HPN tipo III con pérdida total de expresión de CD59.

Por tanto, la serie roja provee de información adicional en el estudio de HPN al resultar significativamente más útil que el análisis de granulocitos para demostrar la deficiencia parcial de antígenos GPI-ligados. Si bien no existe un punto de corte específico que pueda determinar cuándo los pacientes de HPN serán sintomáticos, aquellos pacientes con >20% de eritrocitos tipo III son más propensos a manifestar signos y síntomas asociados a hemólisis intravascular. De forma contraria, pacientes con grandes poblaciones de HPN tipo II, y en ausencia de poblaciones significativas de HPN tipo III, suelen manifestar un menor grado de hemólisis, en ocasiones caracterizada por reticulocitosis y una LDH moderadamente elevada.

Respecto a la sensibilidad adecuada para el análisis de la serie roja, la ESCCA sostiene mantener una sensibilidad con un límite de cuantificación inferior al 0.01%, si bien considera una sensibilidad aceptable la adquisición de 100.000 eventos CD235a+. No obstante, ante la detección de posibles eventos de HPN tipo II-III, la ESCCA aconseja adquirir al menos 1.000.000 de eventos CD235a+.

Hemoglobinuria paroxística nocturna: Ejemplos de casos clínicos

Caso 1. Paciente de 68 años con pancitopenia tratada con azacitidina con diagnóstico de síndrome mielodisplásico (SMD). Se definió como síndrome mielodisplásico refractario tras tratamiento, al haber transcurrido un tiempo prolongado sin mejora del recuento hematológico. Se realizó un test de HPN por citometría de flujo con el siguiente resultado.

Catlab Informa

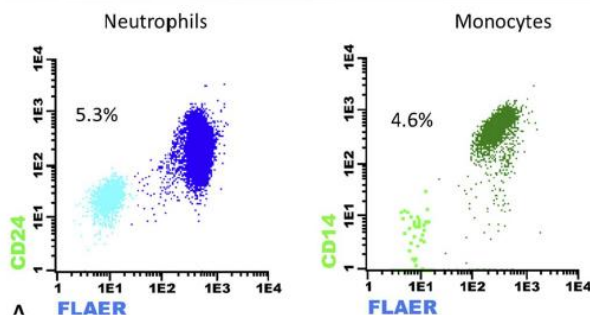


Figura 7. Clon de HPN en serie blanca, en lo que se observa una pequeña población sin expresión de marcadores GPI

En serie blanca se detectó un clon de HPN del 5.3% de neutrófilos (FLAER-, CD24-) y 4.6% de monocitos (FLAER-, CD14-). En serie roja el clon observado era del 0.3%. La médula ósea de la paciente era hipocelular para su edad.

En pacientes mayores o ancianos, el SMD es más frecuente que la anemia aplásica, pero el tamaño del clon de HPN era inusualmente alto para un

SMD. La presencia de un tamaño de clon elevado en granulocitos reforzó la sospecha de una posible anemia aplásica, por lo que se cambió el tratamiento de azacitidina por terapia inmunosupresiva y su recuento hematológico en sangre periférica se recuperó casi a niveles normales.

Caso 2. Paciente de 16 años con pancitopenia y un clon de HPN en serie roja de 0.58% (0.48% HPN Tipo III, 0.10% HPN Tipo II) al diagnóstico, tras una transfusión de sangre. En los granulocitos se halló un clon de 15.6% para neutrófilos y 10.6% para monocitos. No se encontraron evidencias de hemólisis, por lo que el paciente fue diagnosticado con anemia aplásica severa.

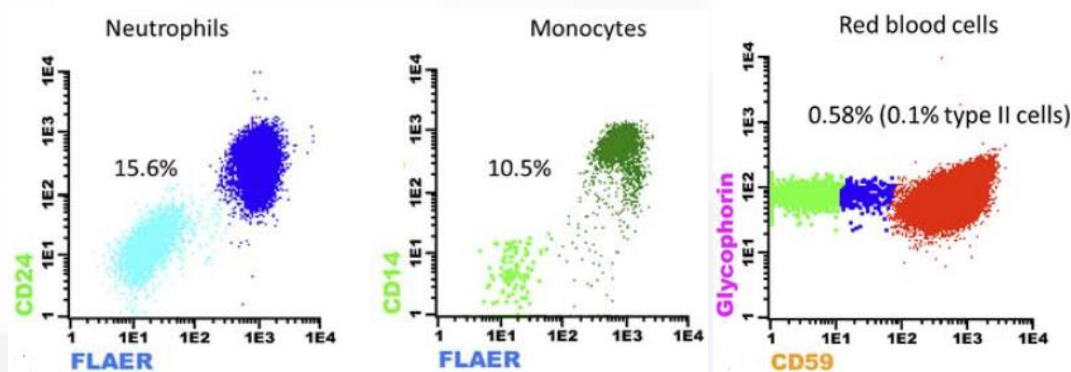


Figura 8. Clon de HPN en serie blanca y serie roja al diagnóstico del paciente.

Al carecer de un donante compatible, se realizó tratamiento con terapia inmunosupresiva logrando una respuesta hematológica completa con médula normocelular a los 6 meses, momento en el que el clon de HPN representaba un 1.4% de los neutrófilos y un 1.2% de monocitos. El clon de HPN se monitorizó cada 6 meses.

Catlab Informa

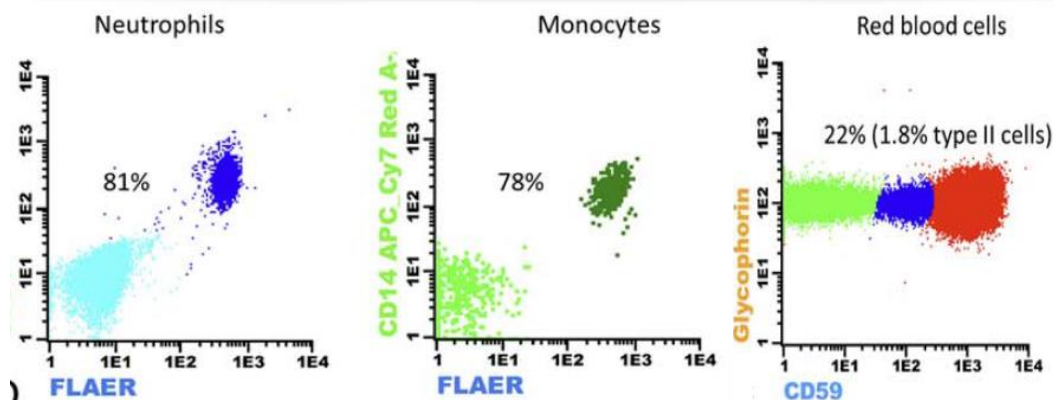


Figura 9. Clon de HPN en serie blanca y serie roja tras 2 años al diagnóstico, en la que se observa un mayor tamaño que en el diagnóstico, en la figura 8.

A los 18 meses el paciente volvió a presentar pancitopenia por lo que se reanudó la terapia inmunosupresiva. A los dos años se realizó la determinación de HPN, detectándose un clon de HPN en serie roja de 22% y en serie blanca de 82% para neutrófilos y 79% para monocitos. El elevado tamaño del clon era superior al esperado en una recidiva de anemia aplásica severa y, al hallarse una LDH elevada y una médula ósea hiperclular, se consideró una posible conversión a HPN. El paciente fue tratado con Eculizumab, que logró resolver la anemia y alcanzar una remisión completa de HPN a los 9 meses.

Conclusiones

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna es una enfermedad sistémica con una clínica muy diversa, en algunos casos sin hemoglobinuria objetivable, y puede estar asociada a otras patologías con fracaso medular, por lo que resulta imprescindible tenerla presente en el diagnóstico diferencial de otras enfermedades que puedan cursar con sintomatología similar. La citometría de flujo es la técnica de elección para el diagnóstico, clasificación y monitorización de pacientes con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Por tanto, la solicitud de este estudio puede resultar esencial para estos pacientes, ya que el tratamiento con Eculizumab ha demostrado ser eficaz mejorando la hemólisis, la anemia y la calidad de vida del paciente, además de disminuir la tasa de eventos trombóticos.

Carlos Lázaro

Facultativo de citometría de flujo

Tel. 93.748.56.00 – ext. 35041 / 626.18.46.51

Judith Vidal

Responsable de citometría de flujo

Tel. 93.748.56.00 – ext. 35041 / 616.26.48.91

www.catlab.cat

Catlab Informa

Bibliografía

Robert A. Brodsky; How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009; 113 (26): 6522–6527. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-195966>

Grupo de trabajo en HPN de la SEHH. Consenso Español para diagnóstico y tratamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, 2014. https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/documentos/guias/Guias_HPNC_2014.pdf

Morado M, Freire Sandes A, Colado E, et al. Diagnostic screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Prospective multicentric evaluation of the current medical indications. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017;92(5):361-370. doi:10.1002/cyto.b.21480

Dezern AE, Borowitz MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 - clinical utility. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(1):16-22. doi:10.1002/cyto.b.21608

Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 - reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(1):23-48. doi:10.1002/cyto.b.21610

Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR, Wagner-Ballon O, DelVecchio L. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 3 - data analysis, reporting and case studies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(1):49-66. doi:10.1002/cyto.b.21609

Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(4):211-230. doi:10.1002/cyto.b.20525

Wong SA, Dalal BI, Leitch HA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing in patients with myelodysplastic syndrome in clinical practice-frequency and indications. *Curr Oncol.* 2018;25(5):e391-e397. doi:10.3747/co.25.4018

Sociedad Ibérica de Citometría. *I Curso de actualización en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna [Internet].* [Consultado en 4 enero 2021]. Disponible en: <http://citometria.org/index.php/es/congresos-y-cursos/212-i-curso-de-actualizacion-en-la-hemoglobinuria-paroxistica-nocturna>