

## REVISIÓN

# Citometría de flujo multiparamétrica para el diagnóstico y monitoreo de poblaciones deficientes en glicosilfosfatidil inositol

Nuñez, N.A.; Novoa, V.; Guevara, R.; Carballo, O.G.

Laboratorio de Inmunología, Unidad de Inmunología e Histocompatibilidad; Hospital Carlos G. Durand. CABA, Argentina.

**Contacto:** Nuñez, N.A.; nerinunez@fibertel.com.ar

## RESUMEN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno clonal severo, poco frecuente, no maligno y adquirido de la célula madre hematopoyética, causado por una anomalía de la membrana eritrocitaria como resultado de una mutación somática clonal de un gen: el fosfatidilinositol glucano clase A (PIG-A) situado en el brazo corto del cromosoma X. Se han identificado una serie de proteínas reguladoras del complemento, entre las que se destacan: el factor acelerador de la degradación (CD55) y el factor inhibidor de la lisis reactiva de la membrana (CD59) deficientes en esta enfermedad. La HPN se clasifica en: clásica, asociada a otro trastorno medular y subclínica. Esta enfermedad está caracterizada por una hemólisis intravascular crónica mediada por complemento resultando en anemia, mayor riesgo de trombosis y citopenias por falla medular. Las manifestaciones clínicas pueden ser muy variadas dependiendo del tamaño del clon HPN. Algunos pacientes con clones HPN muy pequeños pueden no presentar síntomas. La HPN está frecuentemente asociada con anemia aplásica y mielodisplasia hipoplásica. Actualmente la citometría de flujo multiparamétrica constituye la técnica de elección para el diagnóstico y monitoreo de esta enfermedad. Se han realizado varios consensos y publicado guías diagnósticas para mejorar la estandarización y la sensibilidad de esta técnica que permite identificar y cuantificar el clon HPN en células sanguíneas como ser neutrófilos, monocitos y eritrocitos. Recientemente, el anticuerpo monoclonal eculizumab ha aumentado la expectativa de vida de estos pacientes con una mejoría de su calidad de vida.

Palabras clave: hemoglobinuria paroxística nocturna, hemólisis, citometría de flujo, clon HPN, eculizumab.

## ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a low-frequency, severe, non-malignant acquired clonal disease of the haematopoietic stem cell, caused by an erythrocyte membrane anomaly, as a result of a somatic clonal mutation of the phosphatidylinositol glycan class A (PIG-A) gene located in the short arm of the X chromosome. Several complement-regulatory proteins, including Decay Accelerating Factor (CD55) and Membrane Inhibitor of Reactive Lysis (CD59), have been identified as deficient in this pathology. PNH is classified as either classic, in the setting of another bone marrow disorder, or subclinical. The disease is characterized by complement-mediated chronic intravascular haemolysis resulting in anaemia, risk of thrombosis and pancytopenia caused by bone marrow failure. Clinical manifestations vary depending on the clone size and some patients with small PNH clones may not present clinical symptoms. PNH is frequently associated with aplastic anaemia and hypoplastic myelodysplasia. At present, multiparameter flow cytometry, which allows identification and quantification of PNH clones in neutrophils, monocytes and erythrocytes, is the test of choice for the diagnosis and monitoring of PNH treatment. Several consensus have been reached and diagnostic guides have been published to improve the standardization and sensitivity of this test. Recently, the monoclonal antibody eculizumab has increased life expectancy, improving the quality of life in these patients.

Key word: paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, hemolysis, flow cytometry, PNH clone, eculizumab.

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa  
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM  
Código Bibliográfico: RByPC  
Fecha de Recepción:  
01/05/2015.  
Fecha de Aceptación:  
01/07/2015.

## Introducción

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una anemia hemolítica crónica, producida por un trastorno clonal severo, raro, no maligno y adquirido de la célula precursora hematopoyética. Este trastorno es causado por una mutación somática en el gen fosfatidilinositolglucano clase A (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 glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual le sirve como anclaje a muchas proteínas de la membrana celular. El resultado de la pérdida de estas proteínas de la superficie celular es un aumento de la sensibilidad a la destrucción celular mediada por el complemento<sup>1</sup>.

Desde el punto de vista clínico, la HPN se caracteriza por una hemólisis intravascular, con tendencia a la anemia y trombosis, y un componente variable de insuficiencia medular<sup>2</sup>.

En la actualidad se considera a la HPN como una enfermedad sistémica, en la que varios órganos pueden estar implicados, especialmente el hígado, el riñón, el sistema nervioso central, el pulmón y/o el corazón<sup>3, 4</sup>. La hemoglobinuria, signo que da nombre a la enfermedad, puede no ser objetivable; tan sólo el 26% de los casos la presentan al inicio,<sup>5</sup> y el 62% en algún momento a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad.

Es una entidad poco frecuente con gran variabilidad clínica. Su incidencia es de aproximadamente 1/100.000 casos por cada cien mil habitantes por año. La mortalidad es del 50% con una mediana de supervivencia de 22 años. Más del 60% de las muertes son causadas por trombosis y hemorragias<sup>1,2</sup>. Afecta a los dos sexos a cualquier edad, aunque es más frecuente en adultos del sexo femenino y aparece entre los 16 y 75 años, con una edad promedio de 42 años, aunque se ha descrito también en niños y en ancianos. Su comienzo es insidioso y su evolución es prolongada y variable<sup>1</sup>.

## Antecedentes históricos

La HPN fue descrita inicialmente en Londres, Inglaterra por William Gull en 1866, quien observó que el pigmento excretado en orina no correspondía a eritrocitos<sup>6</sup>.

En 1882 Paul Strübing describió la asociación entre la hemoglobinuria y el ejercicio físico<sup>7</sup>. Aunque no existieron méritos mayores en la descripción de la HPN en los trabajos de Marchiafava y Micheli en 1911 y 1931, sus nombres han sido utilizados como epónimos de esta enfermedad. Por justicia académica el epónimo que le corresponde a la HPN es el de "*Enfermedad de Gull-Strübing*".

El nombre de la enfermedad, hemoglobinuria paroxística nocturna, es controvertido en cuanto a lo que su definición implica, ya que éste parece equivocado, debido a que la hemoglobinuria habitualmente no es nocturna y sólo es uno de los signos asociados a la HPN<sup>8</sup>. El nombre de HPN fue establecido en 1928 por Enneking.<sup>9</sup> Sin embargo fueron las observaciones de Thomas Hale Ham en 1937, las que le permitieron proponer que el defecto de los eritrocitos en la

HPN consistía en una mayor susceptibilidad a la lisis por el complemento<sup>10</sup>.

## Etiopatogenia

La HPN es un trastorno hemolítico adquirido en el que la lesión primaria es producida por una mutación somática y clonal de la célula madre hematopoyética en la biosíntesis de GPI. La carencia total o parcial de la expresión de las proteínas de la membrana ancladas a través del GPI provocan una sensibilidad anormal al complemento<sup>1,3</sup>.

En la biosíntesis del anclaje al GPI están involucradas al menos 10 reacciones y más de 20 genes diferentes. Dos de las proteínas, el factor acelerador de la degradación (DAF, CD55) y el factor inhibidor de la lisis reactiva de membrana (ILRM, CD59), que inhiben la activación y la función citotóxica del complemento respectivamente, son postuladas como las de mayor importancia en la fisiopatología de la enfermedad<sup>1,2,11,12</sup>.

Los primeros defectos observados en la superficie de las células sanguíneas maduras en esta enfermedad fueron la disminución de la acetilcolinesterasa en los hematíes y de la fosfatasa alcalina en los leucocitos<sup>2</sup>.

En este momento, ya son más de 20 las proteínas de membrana cuya expresión se ha encontrado disminuida o ausente<sup>3,13,14</sup> (tabla I) de ellas, sólo 6 tienen trascendencia clínica y la expresión de la enfermedad depende del tipo de proteína de membrana que falta y del grado de la alteración de su función<sup>11,12,15-17</sup>.

(Ver Tabla 1)

## Características clínicas

La HPN es una enfermedad clonal sistémica que puede involucrar a varios órganos como: hígado, riñón, pulmón, SNC y/o corazón. Se caracteriza principalmente por hemólisis intravascular, trombosis y falla medular<sup>18,19</sup>.

Su principal manifestación clínica es la hemólisis intravascular generando hemoglobinuria y anemia. El 26% de los pacientes presentan hemoglobinuria al inicio, sin embargo el 62% tienen hemoglobinuria en algún momento del curso de la enfermedad<sup>20</sup>. La hemólisis intravascular provoca liberación de hemoglobina (Hb) y aumento del secuestro del óxido nítrico (ON) que se une a la Hb libre. La disminución del ON produce vasoconstricción periférica y distonía del músculo liso lo que se evidencia por dolor abdominal, disfagia, espasmo esofágico, disfunción eréctil y astenia profunda con una importante alteración de la calidad de vida en algunos pacientes<sup>21, 22</sup>.

La trombosis es la complicación clínica más severa y la principal causa de muerte en estos pacientes. Ocurre aproximadamente en el 40% de los casos con HPN. La etiología de la trombosis es multifactorial estando involucradas tanto la cascada del complemento, la cascada de la coagulación como la hemólisis intravascular<sup>21</sup>. Aunque los eventos trombóticos pueden ocurrir en cualquier sitio, los pacientes con HPN presentan con más frecuencia trombosis en sitios

**Tabla I.** Proteínas unidas a la GPI: función y distribución celular.

Proteína unida a GPI	Función	Distribución
CD14	Receptor de lipopolisacáridos	Monocitos y macrófagos
CD16	Receptor Fc de complejos inmunes Ig G	Neutrófilos
CD24	Activación y diferenciación de linfocito B. Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en neutrófilos	Linfocitos B y neutrófilos
CD48	Molécula de adhesión. Activación linfocitaria	Linfocitos, monocitos y células progenitoras.
CD52	Desconocida	Linfocitos, monocitos y neutrófilos
CD55	Regulación de la activación del complemento	Todas las células hematopoyéticas
CD58	Molécula de adhesión. Regulación de la respuesta inmune	Todas las células hematopoyéticas
CD59	Inhibe la formación del complejo de ataque de membrana del complemento	Todas las células hematopoyéticas
CD66b,c,e	Desconocida	Neutrófilos
CD73	Ecto-5 nucleotidasa. Adhesión celular. Señal de coestimulación	Subpoblación de Linfocitos B y T
CD87	Urokinasa. Receptor del factor activador del plasminógeno	Linfocitos T, célula NK, monocitos y neutrófilos
CD90	Desconocida	Subpoblaciones de Linfocitos T y células progenitoras.
CD108	Desconocida	Eritrocitos y linfocitos
CD109	Desconocida	Células progenitoras., plaquetas, monocitos, neutrófilos y linfocitos T activados
CD157	Ectoenzima. Mediador de adhesión y migración.	Neutrófilos, monocitos,
Acetilcolinesterasa	Enzima	Eritrocitos
Fosfatasa alcalina del neutrófilo	Enzima	Neutrófilos
ADP-ribosiltransferasa	Enzima	Subpoblación de linfocitos T y neutrófilos
Cromer	Ag sanguíneos eritrocitarios	Eritrocitos
Cartwright/Yt	Ag sanguíneos eritrocitarios	Eritrocitos
John Milton Hagen	Ag sanguíneos eritrocitarios	Eritrocitos
Dombrock	Ag sanguíneos eritrocitarios	Eritrocitos
Holley- Gregory	Ag sanguíneos eritrocitarios	Eritrocitos
NA1/NA2	Ag del neutrófilo	Neutrófilos
NB1/NB2	Ag del neutrófilo	Neutrófilos

CD: cluster de diferenciación, Fc: fracción constante de la inmunoglobulina, Ig: inmunoglobulina, ADP: Adenosindifosfato, Ag: antígenos.

inusuales como en venas hepáticas (síndrome de Budd-Chiari), venas abdominales, cerebrales, dérmicas y de la retina. Un 15% de las trombosis se producen a nivel arterial pudiendo afectar las arterias cerebrales y coronarias. En las mujeres el embarazo aumenta el riesgo trombótico y la morbilidad materno-fetal<sup>19,20,23</sup>.

La disminución de la hematopoyesis como consecuencia de la falla medular puede producir citopenias. Otras manifestaciones clínicas que se pueden observar son insuficiencia renal, hipertensión pulmonar e infecciones. La insuficiencia renal puede ser aguda, generalmente reversible, o crónica. La hipertensión pulmonar es causante también de disnea y fatiga<sup>22</sup>.

En pacientes con diagnóstico de anemia aplásica (AA) o de síndrome mielodisplásico (SMD) se ha identificado la presencia de clones HPN<sup>24,25</sup>. Un 50-80% de las AA y un 12-23% de los SMD presentan clones HPN<sup>26,27</sup>. En la mayoría de los casos los clones HPN identificados son de pequeño tamaño (<1%). Los pacientes con AA que presentan clones HPN (+) tienen mejor respuesta al tratamiento inmunosupresor y un pronóstico más favorable. Por otro lado, la presencia de clones HPN se observa principalmente en los SMD de bajo riesgo, particularmente en la variante de anemia refractaria. Estos pacientes tienen algunas características clínicas diferentes como, por ejemplo, menos alteraciones morfológicas en glóbulos rojos y menos anomalías ca-

riotípicas, mayor incidencia de HLA-DR15, menor progresión a leucemia aguda y mayor respuesta a la terapia con inmunosupresores<sup>28</sup>.

Existe una gran variabilidad en la expresión de los síntomas clínicos en la HPN. En algunos casos se presentan síntomas muy graves e incapacitantes, mientras que en otros tienen escasa sintomatología. Los síntomas también pueden variar en el tiempo en un paciente dado.

La International PNH *Interest Group* propuso una clasificación que incluye 3 categorías de HPN<sup>29-31</sup>:

- 1- HPN clásica: pacientes con hemólisis intravascular y/o trombosis. Otros síntomas clínicos también presentes son la anemia, la fatiga, la disfunción eréctil, la disfagia, el dolor abdominal, la falla renal, etc. No hay evidencia de falla medular y en general presentan clones HPN de gran tamaño ( $\geq 50\%$ ).
- 2- HPN en el contexto de otra patología hematológica: pacientes con evidencia clínica y/o de laboratorio de hemólisis intravascular, que presentan otra patología hematológica primaria como AA o SMD. En la mayoría de ellos se observan clones HPN pequeños ( $< 30\%$ ). La falla medular es la que domina el cuadro clínico.
- 3- HPN subclínica: pacientes que presentan clones HPN pequeños (en general  $< 1\%$ ) por citometría de flujo, no tienen síntomas clínicos ni evidencia de hemólisis. Se asocia típicamente a aplasia medular.

### Diagnóstico de HPN

Las guías internacionales recomiendan el estudio de clones HPN por citometría de flujo en pacientes que manifiestan<sup>18,20,29,31</sup>:

- 1- Hemoglobinuria.
- 2- Hemólisis intravascular Coombs directa negativa de causa inexplicada, aumento de LDH en suero y especialmente en pacientes con deficiencia de Fe.
- 3- Trombosis no explicadas venosa o arteriales en pacientes jóvenes o con trombosis en sitios inusuales: síndrome de Budd-Chiari, venas portal o mesentéricas, venas cerebrales o dérmicas.
- 4- Disfagia intermitente o dolor abdominal de etiología no explicada con evidencia de hemólisis intravascular.
- 5- Citopenias idiopáticas o mantenidas de significado incierto.
- 6- Pacientes con diagnóstico de AA, al diagnóstico y anualmente.
- 7- Pacientes con diagnóstico de SMD hipoplásico, especialmente en pacientes jóvenes.

Durante muchos años el test de Ham, o prueba de la hemólisis ácida, ha sido el método de elección para el diagnóstico de HPN. Esta prueba de laboratorio se fundamenta en el principio de que los hematíes de pacientes con HPN son más sensibles a la acción de las proteínas del sistema del complemento, cuando se activan en un medio ácido. Si bien, es una técnica específica, la principal limitación reside en que su sensibilidad es relativamente baja, sobre todo en pa-

cientes que han recibido con anterioridad transfusiones de concentrados de hematíes, pues presentan pequeños clones de hematíes HPN, lo que da lugar a falsos negativos<sup>23</sup>.

El análisis por citometría de flujo de la expresión de proteínas ancladas a GPI surgió como un método complementario al test anterior. Comenzó a utilizarse en 1985, cuando dos grupos independientes de investigadores usaron la citometría de flujo y un anticuerpo dirigido contra CD55, para investigar pacientes con HPN. Sus estudios demostraron poblaciones de hematíes, neutrófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas deficientes en CD55, lo cual confirmó que la HPN era un desorden de la célula madre hematopoyética. Desde entonces la citometría de flujo se ha aplicado satisfactoriamente en el estudio de muestras de pacientes con HPN, hasta convertirse en el método de elección para el diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad<sup>23,32</sup>.

En la actualidad, el diagnóstico inequívoco requiere la demostración de la deficiencia de al menos 2 proteínas, ancladas a GPI en al menos 2 poblaciones celulares diferentes, con el fin de excluir los casos que presentan deficiencias congénitas de un solo antígeno y obviar algunos problemas técnicos<sup>23</sup>.

La muestra de elección para el estudio de HPN es sangre periférica y merece destacarse que habitualmente es desaconsejable realizar el rastreo de HPN en muestras de médula ósea, ya que la expresión de proteínas ancladas a GPI depende del estadio madurativo de las diferentes series hematopoyéticas, lo que complica de forma innecesaria el análisis<sup>23</sup>.

Teniendo en cuenta la expresión de la proteína anclada a GPI, los clones de HPN se dividen en tipo I (si la expresión de proteína anclada a GPI es normal), tipo II (si la deficiencia es parcial, es decir, se observa una expresión débil de la proteína anclada a GPI) y tipo III (si la deficiencia es total)<sup>31</sup>.

El estudio de las proteínas asociadas a GPI debe combinarse con el marcaje adicional de anticuerpos monoclonales, que permitan la identificación correcta e inequívoca de las subpoblaciones de interés. Las poblaciones celulares más adecuadas para la identificación del déficit de expresión de dichas proteínas son: las poblaciones leucocitarias de neutrófilos y monocitos, puesto que, dentro de las poblaciones celulares representadas en sangre periférica en número suficiente, éstas constituyen las subpoblaciones celulares que suelen mostrar mayor grado de afectación, debido a su corta vida media. Cuando se evidencia un defecto en la expresión de proteínas ancladas a GPI en neutrófilos y monocitos, conviene completar el estudio a través de la evaluación de los hematíes<sup>18</sup>.

### Análisis de eritrocitos

Durante muchos años, el diagnóstico de HPN por citometría de flujo se ha centrado en el análisis de la expresión de las proteínas ancladas a GPI en la superficie de los eritrocitos. Esto se debe, fundamentalmente, a que la manifestación clínica más característica de la enfermedad es la

hemólisis intravascular y a que las técnicas empleadas con anterioridad a la citometría, como el test de Ham o la prueba de la sacarosa, estaban dirigidas de forma específica a la identificación de la alteración en los hematíes<sup>23</sup>. El ensayo en eritrocitos fue el primero en ser utilizado para detectar HPN, ya que se comprobó inicialmente que la deficiencia de CD55 y CD59 eran centrales en la patofisiología de la enfermedad. El CD59 se expresa en altos niveles en los hematíes, mientras que el CD55 es menos abundante en los mismos<sup>31</sup>.

Mientras que la pérdida de CD55 y CD59 se usaba tradicionalmente para detectar eritrocitos HPN, los ensayos de rutina basados solamente en CD55 y/o CD59 no son sensibles para detectar clones menores de 1-2%, siendo inadecuados para detectar clones pequeños que se encuentran generalmente en casos de AA o SMD o incluso en casos de pacientes transfundidos. Además, el CD55 es inferior al CD59 porque no permite la separación eficiente en tipo I, II y III. Para el análisis de eritrocitos de alta sensibilidad, las guías ICCS (International Clinical Citometry Society) recomiendan el uso de CD235a o Glicoforina A, actualmente, único reactivo disponible para identificar específicamente eritrocitos maduros, y CD59, para detectar las células deficientes en GPI<sup>31,33</sup>.

El análisis de los hematíes en un paciente no transfundido permite la evaluación más precisa de la distribución de las poblaciones tipo I, II y III (Figura 1).

Se observa una variación marcada en la distribución de estas subpoblaciones de paciente a paciente y la separación entre los tres tipos, a veces, no es clara. Estudios recientes demostraron que los hematíes tipo III sobreviven entre 17 y 60 días y que los eritrocitos tipo II, cuando expresan al menos 15% de cantidad normal de CD59, son protegidos de la lisis mediada por complemento<sup>32</sup>.

El estudio solamente de eritrocitos no es adecuado para la evaluación de pacientes con HPN debido a la hemólisis y a las transfusiones que pueden subestimar el tamaño del

clon HPN. Pero el análisis de hematíes es importante, primero, porque, la determinación de la distribución de células tipo I, II y III puede predecir el fenotipo clínico: los pacientes con clones tipo III mayor a 20% casi siempre presentan evidencia clínica de hemólisis; y segundo, es útil para evaluar la eficacia de respuesta al tratamiento con eculizumab, dado que esta droga inhibe la lisis de las células mediada por complemento, los eritrocitos anormales sobreviven y la proporción de los mismos aumenta, reflejando el tamaño del clon<sup>31,34</sup>.

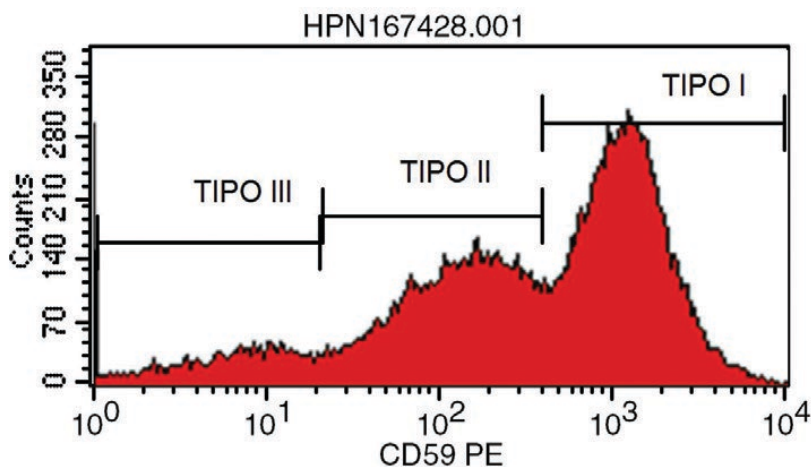
### Análisis de neutrófilos y monocitos

La proporción de neutrófilos y monocitos anómalos refleja mejor la actividad de la célula madre alterada en HPN, ya que su vida media es habitualmente corta, tanto en individuos sanos como en HPN; por el contrario, la vida media de los hematíes es más larga y está significativamente acortada en los pacientes con HPN<sup>23</sup>. Por lo tanto, el estudio de los neutrófilos y monocitos está ampliamente reconocido como el mejor método para evaluar el verdadero tamaño del clon HPN<sup>31</sup>.

En la mayoría de los pacientes con HPN, el clon de neutrófilos es mayor al clon de eritrocitos. Esta diferencia es, seguramente, debida a la vida media corta de los eritrocitos de HPN, comparada con los eritrocitos normales y además puede estar complicada por las transfusiones sanguíneas<sup>32</sup>. Generalmente, el tamaño del clon de neutrófilos y monocitos es similar<sup>31</sup>.

Históricamente, el CD55 y el CD59 fueron los primeros marcadores utilizados para detectar clones HPN en neutrófilos y monocitos en virtud de la experiencia previa que se tenía del estudio de hematíes. Sin embargo, dichos marcadores, generalmente, poseen una menor separación entre las poblaciones negativas y positivas, poseen altos coeficientes de variación y dan tamaños de clones menores que otros antígenos anclados a GPI, motivos por los cuales no

**Figura 1.** Histograma de la expresión de CD59 en eritrocitos en muestra de sangre periférica por citometría de flujo. Se observan la presencia de clones HPN tipo I [expresión normal], tipo II [expresión parcial] y tipo III [ausencia de expresión].



son óptimos para el estudio de HPN.

En el presente, se posee experiencia en un gran número de marcadores como CD16, CD24, CD66b para neutrófilos, CD14 para monocitos y CD157 y FLAER para ambos leucocitos<sup>31</sup>.

El CD16 merece una mención especial, dado que existen polimorfismos en la población que no son reconocidos por algunos anticuerpos anti-CD16, puede perderse en pacientes con SMD y no se expresa en estadios celulares inmaduros, por lo cual se recomienda que el estudio de este antígeno sea en combinación con otro reactivo<sup>31</sup>.

FLAER es un derivado fluorescente de la toxina bacteriana aerolisina que se une específicamente a la molécula GPI y se ha convertido, probablemente, en el reactivo más útil en la detección de clones HPN en glóbulos blancos<sup>35</sup>. Se ha demostrado que el CD157 conjugado con ficoeritrina (CD157 PE) es superior al CD24 PE en el ensayo de neutrófilos y superior al CD14 PE en el ensayo de monocitos, La ventaja de FLAER y de CD157 es que permiten la detección simultánea tanto de neutrófilos como monocitos con alta sensibilidad<sup>36</sup>.

El uso de los distintos marcadores difiere según el grupo de investigadores. Para la detección de clones HPN de neutrófilos, Borowitz y col. [Guías ICCS]<sup>31</sup> propusieron que los anticuerpos CD24, CD66b, CD16, junto con FLAER, son los reactivos más confiables; Sutherland y col.<sup>34</sup> seleccionaron a CD24 y FLAER como los reactivos más específicos de GPI, mientras que la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), en su actualización del 2014 de la Guía de HPN<sup>20</sup>, propuso CD157 y FLAER como primera alternativa. Para la detección de clones HPN de monocitos, tanto Borowitz como Sutherland identificaron a CD14 y FLAER como

los reactivos más confiables y la SEHH, FLAER y CD157.

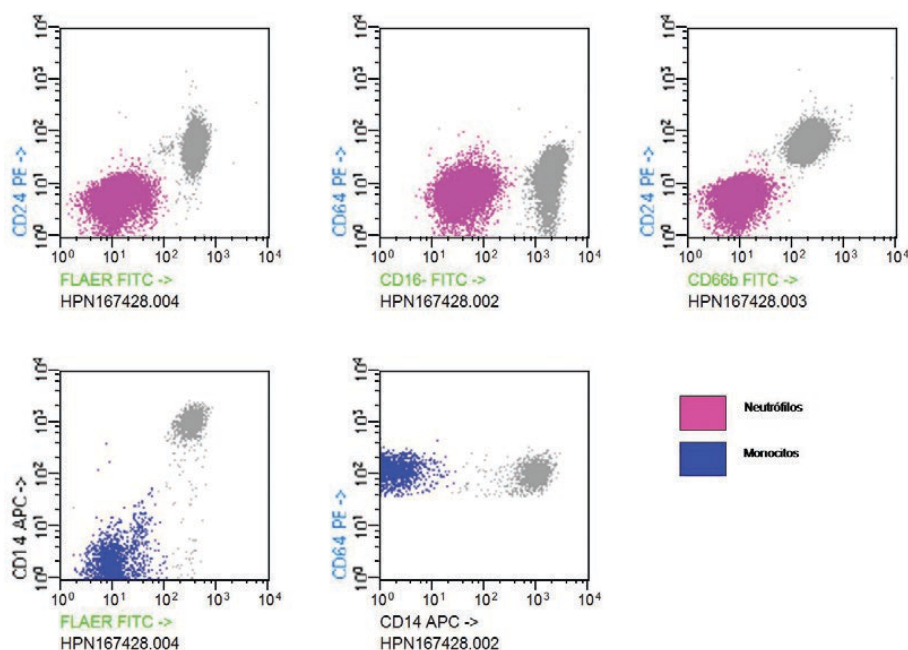
Para la selección adecuada de neutrófilos se han propuesto el CD15 y CD10, mientras que, para la detección de monocitos el CD64 es el más efectivo, porque otra alternativa propuesta anteriormente como el CD33 se ha comprobado que falla en la marcación, como es el caso de algunos pacientes<sup>20,31,34</sup>.

Para el análisis de alta sensibilidad de leucocitos, la selección según parámetros de dispersión de luz (SSC/FSC) o el uso del marcador pan-leucocitario CD45, no es aceptable puesto que pueden aparecer eventos espúreos que no sean neutrófilos o monocitos, los cuales podrían llevar a una falsa conclusión de la presencia de una población HPN. Para una selección más precisa, se requiere un marcador de linaje como se mencionó anteriormente, CD15 o CD10 para neutrófilos y CD64 para monocitos, combinado con parámetros de dispersión de luz y CD45 para mejorar la precisión de la selección de las poblaciones. Además, es esencial usar más de un marcador de proteína anclada a GPI. FLAER es particularmente útil para este tipo de análisis<sup>21,32</sup> (Figura 2).

En cuanto a la adquisición de eventos de interés en el citómetro, se obtienen, generalmente, 50.000 neutrófilos, y para detectar clones pequeños de HPN, se pueden conseguir 250.000 eventos asegurando, de esta manera, la confiabilidad de los datos. Para los monocitos, se logran, generalmente, entre 5.000 y 10.000, y para la detección de clones pequeños de HPN, se pueden coleccionar hasta 25.000 monocitos<sup>34</sup>.

Los ensayos de alta sensibilidad no son necesarios para el diagnóstico de HPN clásica, pero son útiles para la detección de pequeñas poblaciones HPN en pacientes con desórdenes de falla medular (AA y MDS).

**Figura 2.** Gráficos de citometría de flujo para la detección y cuantificación de clones HPN en neutrófilos y monocitos.



### Análisis de linfocitos

A pesar de afectar a una célula madre hematopoyética, el análisis de la expresión de proteínas ancladas a GPI en linfocitos no se recomienda para el diagnóstico de HPN, debido a que la proporción de células afectadas entre los linfocitos puede ser mínima y sumamente variable de unos pacientes a otros<sup>23</sup>. Cuando se compara con el tamaño del clon HPN de granulocitos, el clon en linfocitos B, T y células NK es generalmente menor. Esta diferencia se puede explicar por la larga vida media de los linfocitos residuales normales, que se generan antes del comienzo de la enfermedad<sup>32</sup>.

### Análisis de plaquetas

La utilidad diagnóstica y relevancia clínica del estudio de las plaquetas en HPN no ha sido establecida<sup>32</sup>.

### Informe de resultados en el estudio de HPN por citometría de flujo

En el informe deben constar los anticuerpos monoclonales utilizados, tanto para la identificación de las poblaciones celulares, como para el estudio de las proteínas ancladas a GPI. Asimismo, debe detallarse el tamaño de los clones tipo II y tipo III de cada población estudiada y también el tamaño total del clon (tipo II + tipo III) de las diferentes poblaciones celulares.

Si solo se detecta un clon menor, es preferible incluir una aclaración que indique que no es equivalente al diagnóstico de HPN clásica<sup>31</sup>.

### Seguimiento

Una vez realizado el diagnóstico de HPN, se debe monitorear el tamaño del clon HPN en forma regular, puesto que puede haber cambios en éste (aumentar o disminuir sus medidas) lo que puede reflejar cambios en la clínica del paciente. En aquellos con AA, que presentan pequeños clones HPN, es importante el control porque pueden progresar de la forma subclínica a la forma clásica y esto es precedido por el aumento en el tamaño del clon. En SMD también se debe realizar el monitoreo del clon, aunque su progreso no ha sido aún demostrado. El monitoreo debe realizarse cada 6 a 12 meses o ante cualquier cambio en la clínica del paciente<sup>29,31</sup>.

Tanto en los casos tratados con eculizumab como en aquellos que fueron trasplantados debe realizarse un monitoreo anual, como control.

### Tratamiento

El tratamiento de esta enfermedad va a depender de la forma clínica que presenta el paciente. La HPN subclínica, la cual no presenta síntomas, no requiere tratamiento. Solamente debe monitorearse el tamaño del clon HPN cada 6 o 12 meses porque puede haber aumento del clon y evolucionar a una forma clásica. En el caso de HPN asociada a AA o SMD el tratamiento está relacionado con la enfermedad primaria, inmunosupresores o trasplante de médula ósea<sup>19,22</sup>.

La HPN clásica es la única que requiere tratamiento específico. El uso de eculizumab y el trasplante de médula ósea alogeneico son hasta el momento las únicas terapias efectivas. El eculizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que bloquea la proteína C5 del complemento, disminuyendo las complicaciones de la HPN que son consecuencia directa de la hemólisis intravascular. No solo mejora la anemia y los requerimientos transfusionales, sino que mejora también los síntomas relacionados con la distonía del músculo liso, la fatiga, la función renal, reduce la incidencia de trombosis, disminuye la hipertensión pulmonar y mejora significativamente la calidad de vida de los pacientes<sup>37,38</sup>. El trasplante de médula ósea alogénico es el único tratamiento potencialmente curativo de esta enfermedad, pero tiene un alto riesgo de morbilidad<sup>39</sup>, siendo ésta, la única opción en pacientes que no responden al eculizumab.

### Conclusiones

La HPN es una enfermedad clonal benigna, poco frecuente, que afecta principalmente a individuos jóvenes. Sus manifestaciones clínicas son muy variadas y multisistémicas, encontrándose individuos asintomáticos o con síntomas leves, hasta pacientes con un gran deterioro en la calidad de vida y/o con compromisos graves que pueden causarle la muerte. Los nuevos avances en el manejo de esta enfermedad están vinculados al aporte de la citometría de flujo multiparamétrica, como diagnóstico y control, y a las nuevas drogas terapéuticas como el eculizumab que, si bien, no curan la enfermedad, disminuye el riesgo de complicaciones graves y mejora notablemente la calidad de vida. La citometría de flujo no solo permite el diagnóstico de HPN clásica con una alta sensibilidad, identificando y cuantificando clones HPN, sino que también permite identificar muy pequeños clones (<1%) en pacientes asintomáticos y con otras patologías hematológicas asociadas, lo que es de valor pronóstico y terapéutico.

### Referencias bibliográficas

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. Luzzatto L, Risitano AM, Notaro R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and eculizumab. *Haematologica*. 2010; 95(4):523-526.
3. Brodsky R. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2009; 113: 6522-6527.
4. Rother R B, Bell L, Hillmen P et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma haemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293 (13):1653-1662.
5. Parker C, Omine M, Richards S et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106: 3699-3709.

6. Gull WW. A case of intermittent haematuria. *Guys Hosp Rep.* 1866; 13:381-392.
7. Strübin P. Paroxysmal haemoglobinurie. *Dtsch Med Wochenschr.* 1882; 8:1-17.
8. Rosse WF. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Present status and future prospects. *West J Med.* 1980; 132:219-228.
9. Ham TH, Dingle JH. Studies on destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest.* 1939; 18:657-72.
10. Ham TH. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Study of the mechanism of hemolysis in relation to acid-base equilibrium. *N Engl J Med.* 1937; 217:915-917.
11. Guía clínica HPN. Consenso Español para Diagnóstico y tratamiento de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. SEHH. 2010. [http://www.sehh.es/documentos/42/HPN\\_guia\\_clinica\\_v17.pdf](http://www.sehh.es/documentos/42/HPN_guia_clinica_v17.pdf)
12. Parker CJ. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Curr Opin Hematology.* 2012; 19 (3): 141- 148.
13. García-Conde J. Hematología. Madrid: Ediciones Arán. 2003; 737-742
14. Yoon JH, Cho HI, Park SS, Chang YH, Kim BK. Mutation analysis of the PIG-A gene in Korean patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55:410-413.
15. Rosti V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica.* 2000; 85: 82-89.
16. Dodelet VC, Cashman NR. Prion expression in human leukocyte differentiation. *Blood.* 1998; 91:1556-1561.
17. Hernandez Campo PM, Almeida J, Sanchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins of different subsets of peripheral blood cells: A frame of reference for the diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry Part B.* 2006; 70B: 71-81.
18. Urbano- Ispizua A, Gaya A, Colado E, López M, Arrizabalaga B, Vicente V, Orfao A, Villegas A, Vallejo C. Diagnóstico y tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clin [Barc].* 2011; 136 (3): 121-127.
19. 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>.
20. 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](http://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/documentos/guias/Guias_HP_N_2014.pdf)
21. Hill A, Kelly RJ and Hillmen P. Trombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2013; 121(25): 4985- 4996.
22. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2014; 124(18): 2804- 2811.
23. Hernández- Campo PM, Almeida J y Orfao A. Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med Clin [Barc].* 2008; 131(16): 617- 630.
24. Sugimori C, Mochizuki K, Qi Z, Sigimori N, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H, Takami A, Okumura H and Nakao S. Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol – anchored protein among patients with bone marrow failure. *British Journal Haematology.* 2009; 147: 102- 112.
25. Warg S, Pozdnyakova O, Jorgensen J, Medeiros J, Stachurski D, Anderson M, Raza A and Woda B. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica.* 2009; 94: 29- 37.
26. Nakao S, Sugimori C, Yamazaki H. Clinical Significance of a Small Population of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria-Type Cells in the Management of Bone Marrow Failure. *Int. J. Haematol.* 2006; 84: 118- 122.
27. Morado M, Bosch JM, Cuadrado MA, Lemes A, Sempere A, Subirá D, Vidrales MB y López Rubio M. Conclusiones de la reunión de citometristas para el diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna. Madrid. Enero. 2009. <http://www.hematologiamadrid.org/pdf/Conclusiones%20CF%20en%20HPN.pdf>
28. Parker CJ. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology.* 2011; 21- 29.
29. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W and Socié G. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005; 106(12): 3699- 3709.
30. Hill A, Richards SJ and Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology.* 2007; 137: 181- 192.
31. Borowitz M, Craig F, DiGiuseppe J, Illingworth A, Rosse W, Sutherland R, Wittwer C and Richards S. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B.* 2010; 78B: 211- 230.
32. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of Flow Cytometry to the diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry.* 2000; 42:223–233.
33. 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.
34. 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.
35. Sutherland DR, Kuek N, Davinson J, Barth D, Chang H, Yeo E, Bamford S, Chin-Yee I, Keeney M. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part B.* 2007; 72B: 167-177.
  36. 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 Part B.* 2014; 86B: 44-55.
  37. Roth A and Dühssen U. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of eculizumab. *European Journal Haematology.* 2011; 87: 473- 479.
  38. Brodsky AL. Eculizumab. *Hematología.* 2013; Vol 17, Nº 3: 276- 284.
  39. Matos-Fernandez N, Mourad YA, Caceres W, Khorfan-Dabaja M. Current status of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009; 15: 656- 661.