

Artículo Original

Detección y monitoreo de clones con hemoglobinuria paroxística nocturna por citometría de flujo (Detection and monitoring of clones with paroxysmal nocturnal Hemoglobinuria by flow cytometry)

Por Bioq. Ximena S. Burrueco¹, Bioq. Especialista Darío A. Sastre¹, Bioq. Melina Del V. Cloquell¹, Médica Hematóloga Blanca de los M. Rossi², Bioq. Damaris N. Campregher³, Médico Hematólogo Hugo G. Campregher³, Bioq. Especialista Cecilia M. Rodríguez¹ (Autor/a).

cecirodr@hotmail.com

¹ Servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba. ² Servicio de Hematología del Hospital Córdoba. ³ Instituto de Hematología y Oncología HOPE, La Rioja. Lugar de trabajo: Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba, Santa Rosa 1564, Córdoba, CP: 5000.

Resumen:

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno clonal adquirido en la célula progenitora hematopoyética, causado por una mutación somática en el gen PIG-A que lleva a una deficiencia en la expresión de proteínas ligadas al Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI). Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la incidencia y tamaño de clones HPN en pacientes con hemólisis, citopenia/falla medular, trombosis en lugares atípicos y realizar el seguimiento de los pacientes tratados con eculizumab por citometría de flujo (CF), utilizando protocolos estandarizados. Se estudiaron 36 pacientes con sospecha de HPN que concurren al Servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas. Se evaluó la expresión de las siguientes proteínas ligadas a GPI en leucocitos y glóbulos rojos (GR) de sangre periférica: CD16, CD24, CD66b y FLAER en neutrófilos (Ns), CD14 y FLAER en monocitos (Mn) y CD59 en GR. De los 36 pacientes, 7 (19,4%) presentaron clones HPN (+), 2 Anemia Aplásica y 5 Anemia Hemolítica Coombs negativa. La mediana y el rango del tamaño de los clones fue de 79,0% (r: 21,0-96,0%) en Ns, 83,0% (r: 26,4-96,8%) en Mn y 39,0% (r: 2,4-72,0%) en GR. Uno de los 7 pacientes HPN (+) fue tratado con eculizumab observándose aumento del tamaño del clon HPN en GR, el hematocrito y hemoglobina y descenso de la LDH a los 43 días de iniciado el tratamiento. En este trabajo se destaca, la importancia de la utilización de protocolos estandarizados en el diagnóstico por CF y la alta sensibilidad de la técnica para la detección de pequeños clones HPN y clones con deficiencia parcial de proteínas ligadas a GPI.

Palabras clave

*Hemoglobinuria Paroxística Nocturna *FLAER *CD59
*Citometría de flujo

Abstract:

The paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal hematopoietic stem cell disorder, caused by a somatic mutation on the PIG-A gene that leads to a deficiency in the expression of proteins linked to the phosphatidylinositol glycan (GPI). The aims of this work were to study the incidence and size of PNH clones in patients with hemolysis, cytopenia/bone marrow failure, thrombosis in atypical locations and follow up of patients treated with eculizumab by flow cytometry (FC) using standardized protocols. We studied 36 patients with suspicion of PNH attended at Oncohematology Service of National Clinics Hospital. We assessed the expression of proteins linked to GPI in leukocytes and red blood cells (RBCs) in peripheral blood: CD16, CD24, CD66b and FLAER in neutrophils (Ns), CD14 and FLAER in monocytes (Mn) and CD59 in (RBCs). From the total of 36 patients, 7 (19.4%) had PNH clones (+), 2 aplastic anemia and 5 Coombs negative hemolytic anemia. The median and range size of the clones was 79.0% (r: 21.0-96.0%) in Ns, 83.0% (r: 26.4-96.8%) in Mn and 39.0% (r: 2.4-72.0%) in GR. One of the 7 patients PNH (+) that was treated with eculizumab showed increased size of the PNH clone in RBCs, hematocrit and hemoglobin level and low level of LDH after 43 days of treatment. This work highlights the importance of the use of standardized protocols in the diagnosis of FC and the high sensitivity of the technique for the detection of small PNH clones and clones with partial deficiency of proteins bound to GPI.

Keywords:

*Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria *Flaer *CD59 *flow cytometry *eculizumab.

Introducción

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), es un desorden hemolítico adquirido, clonal no maligno, causado por una mutación somática en el gen PIG-A (Fosfatidil Inositol Glicano-clase A) localizado en el brazo corto del cromosoma X (Xp22.1), a nivel de la célula progenitora hematopoyética. Esta mutación resulta en una deficiencia parcial o total en la expresión de proteínas normalmente ancladas a la membrana celular por medio de un puente Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI) (1-3). Entre ellas, CD55 (factor acelerador de la degradación del complemento) y CD59 (inhibidor de la lisis reactiva) son moléculas ligadas a GPI, las cuales tienen un importante rol en el control de la lisis de glóbulos rojos (GR) mediada por el complemento, siendo su deficiencia total o parcial específica de HPN (4).

La HPN es una enfermedad rara, con una incidencia de 2-6 casos por millón de habitantes, afecta con igual frecuencia a ambos sexos, y puede manifestarse a cualquier edad (4). Presenta gran variabilidad clínica, desde casos con escasa sintomatología hasta otros muy graves e incapacitantes. Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen: hemólisis intravascular que lleva a la hemoglobinuria, falla medular con citopenia periférica y fenómenos tromboembólicos, siendo éstos últimos la principal causa de muerte (5).

Recientemente, la presencia de pequeños clones HPN ha sido asociada a pacientes con Anemia Aplásica (AA), Síndromes Mielodisplásicos (SMD) y otros síndromes de falla medular (6). La detección de estos pequeños clones asociados a AA requiere ensayos de alta sensibilidad y es de gran importancia clínica ya que un 10-25% pueden sufrir una expansión clonal y progresar a HPN (7).

A pesar de su baja frecuencia, el *screening* apropiado y el correcto diagnóstico, así como la detección de pequeños clones es importante ya que es una enfermedad crónica y tiene un profundo impacto en la calidad de vida y sobrevida de los pacientes. En los últimos años, se ha desarrollado un anticuerpo (AC) monoclonal humanizado (eculizumab) dirigido contra la fracción C5 del complemento, el cual ha sido aprobado para el tratamiento ya que reduce los episodios de hemólisis, trombosis y requerimiento transfusional, mejorando así la calidad de vida de los pacientes (8-9).

Actualmente, la mayor disponibilidad de ACs dirigidos contra proteínas unidas a GPI y las nuevas estrategias de análisis por citometría de flujo (CF) enfocadas al estudio de 2 o más líneas celulares:

neutrófilos (Ns), monocitos (Mn) y GR para el diagnóstico y monitoreo de clones HPN han aumentado la capacidad de detección (10). También nuevos reactivos como la aerolisina fluorescente ó FLAER que se une específicamente a GPI ofrece ventajas significativas y puede ser usado en combinación con ACs dirigidos contra la población celular a seleccionar (11). Este enfoque permite clasificar las células HPN de acuerdo al grado de deficiencia de proteínas asociadas a GPI en: Tipo I (expresión normal), Tipo II (deficiencia parcial) y Tipo III (deficiencia total) (12).

Objetivos

- Estudiar la incidencia y tamaño de clones HPN en pacientes con hemólisis, citopenia/falla medular, trombosis en lugares atípicos, por CF utilizando protocolos estandarizados.
- Seguimiento de los pacientes tratados con eculizumab por CF.

Pacientes y métodos

Pacientes

Se realizó un estudio prospectivo transversal en el que participaron 36 pacientes con sospecha de HPN que concurren al Servicio de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas de la provincia de Córdoba desde mayo de 2011 hasta septiembre de 2013.

Los pacientes debieron cumplir con uno de los siguientes criterios de inclusión:

- Hemólisis intravascular evidenciada por hemoglobinuria y/o hemosiderinuria.
- Hemólisis no explicada más uno ó más de los siguientes: ferropenia, dolor abdominal, espasmos esofágicos, trombosis, neutropenia, trombocitopenia, daño renal crónico sin causa evidente.
- Anemias hemolíticas Coombs negativa (AH Coombs negativa).
- AA, SMD de bajo grado y otras citopenias de causa no explicadas.
- Trombosis más uno ó más de los siguientes: localización venosa atípica-esplénica, cerebral ó dérmica, signos de hemólisis ó citopenias no explicadas.

Métodos y muestras

Se analizaron muestras de sangre periférica recogidas con EDTA-Na₂. Las mismas fueron procesadas antes de las 2 hs posteriores a la extracción.

Análisis por Citometría de flujo

Estudio de leucocitos: las muestras fueron procesadas de acuerdo al método descrito por Borowitz M. (13). Brevemente, 100µl de sangre periférica fueron lisadas previamente con cloruro de amonio y posteriormente incubados durante 15 minutos, a T° ambiente con los siguientes AC monoclonales dirigidos contra: CD16 (clon 3G8), CD66b (clon G10F5), CD24 (clon ALB9), CD14 (clon MoP9), CD64 (clon 10.1), CD45 (clon 2D1), CD15 (clon HI9) y FLAER-Alexa 488, este último se incubó a 4°C. Las células se lavaron con PBS 2 veces y se resuspendieron para su posterior adquisición con un Citómetro FACScalibur de 4 colores. El posterior análisis se realizó con el software Infinicyt (Cytognos) por medio del cual se evaluó la expresión de los siguientes antígenos asociados a GPI en Ns y Mn: CD16, CD66b, CD24 y FLAER en la población de Ns y CD14 / FLAER en los Mn. Las poblaciones de Ns y Mn fueron seleccionadas a través de *Forward Scatter* (FSC) y *Side Scatter* (SSC) (tamaño vs granularidad) y marcadores específicos de linaje CD45/CD15 para Ns y CD45/CD64 para Mn.

Estudio de hematías: las muestras fueron diluidas 1/200 con PBS, se tomaron 50µl y se incubaron 20 minutos en oscuridad y a T° ambiente con los Ac monoclonales CD59 (clon MEM-43) y CD235a (clon KC16). Luego de 2 lavados con PBS las células fueron resuspendidas. Para la adquisición de los hematías se utilizó FSC/SSC en escala logarítmica. Se adquirieron 400.000 eventos en todos los casos. En el análisis se evaluó la expresión de CD59 en GR seleccionados con CD235a (Glicoforina A).

Resultados

En éste estudio, se analizó la presencia de clones HPN en 36 pacientes (19 varones y 17 mujeres) con edades comprendidas entre 11 y 77 años, de los cuales 18 fueron derivados por citopenia/falla medular, 15 por hemólisis y 1 por trombosis en sitios atípicos, 1 por donante de médula y 1 sin datos.

De los 36 pacientes, 7 (19,4%) presentaron clones HPN (+) en las poblaciones de Mn, Ns y GR estudiadas, de los cuales 2 fueron derivados por

falla medular (AA) (pacientes 3 y 5) y 5 por AH Coombs negativa (pacientes 1,2,4,6 y 7). La mediana y el rango del tamaño de los clones fue de 79,0% (r: 21,0- 96,0%) en Ns, 83,0% (r: 26,4-96,8%) en Mn y 39,0% (r: 2,4-72,0%) en GR. En la **Tabla 1** se muestra el tamaño del clon HPN de los 7 pacientes positivos en las poblaciones de Ns, Mn y GR.

En todas las muestras testeadas, el tamaño del clon en Ns y Mn fue similar, mientras que en GR siempre fue menor debido a los episodios de hemólisis y/o transfusiones.

Tabla 1. Tamaño del clon HPN en las distintas poblaciones celulares.

Pacientes	Tamaño del Clon HPN (%)				
	Tipo de Células				
	GR tipo I	GR tipo II	GR tipo III	Neutrófilos	Monocitos
1	28,0	0,0	72,0	79,0	83,0
2	65,0	0,0	35,0	86,0	84,2
3	61,3	0,0	39,7	47,0	79,0
4	95,7	0,9	3,3	21,0	26,4
5	97,6	0,9	1,5	62,0	67,0
6	61,0	0,0	39,0	95,0	96,8
7	48,7	4,3	47,0	96,0	90,0

La selección (*gate*) de Ns con CD15 y CD45/SSC mejoró la pureza del *gate* con respecto al uso de FSC/SSC solo o en combinación con CD45. Lo mismo se observó con el CD64 como marcador de linaje en Mn.

El uso de FLAER en combinación con CD15 y CD64 permitió la detección simultánea de clones HPN en Ns y Mn, siendo su sensibilidad similar al uso combinado de CD66b y CD24 en Ns (**Figura 2**).

A)

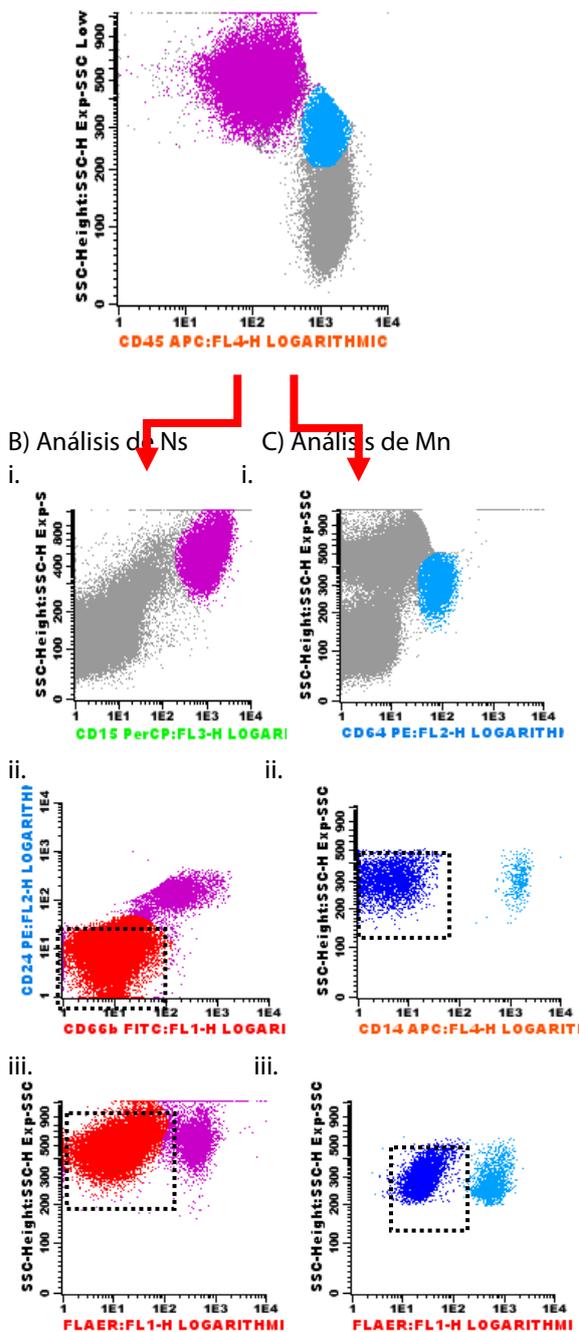


Figura 2. Estrategia de análisis multiparamétrico de selección de Ns y Mn en un paciente HPN (+). A) Gráfico (*Dot-Plot*) CD45/SSC, *gate* inicial donde se observan las poblaciones de Ns (violeta) y Mn (celeste). B) i) Selección de Ns con CD15 / SSC. ii) Gráfico de CD66b/CD24, donde se observa la población de Ns HPN tipo III con ausencia total de CD66b y CD24 (recuadro). iii) Gráfico de FLAER/SSC en la población de Ns CD15 (+) donde se observan los Ns FLAER (-) (recuadro). C) i) Gráfico de CD64/SSC para selección de Mn CD64 (+). ii) Gráfico de

CD14/SSC, donde se observa la población de Mn HPN tipo III con ausencia de CD14 (recuadro). iii) Gráfico de FLAER/SSC, donde se observan los Mn FLAER (-) (recuadro).

Solo en 3/7 pacientes se observaron las 3 poblaciones HPN en GR: Tipo I, II y III. El tamaño del clon de la población tipo II fue menor que la tipo III en los 3 casos (**Figura 3**).

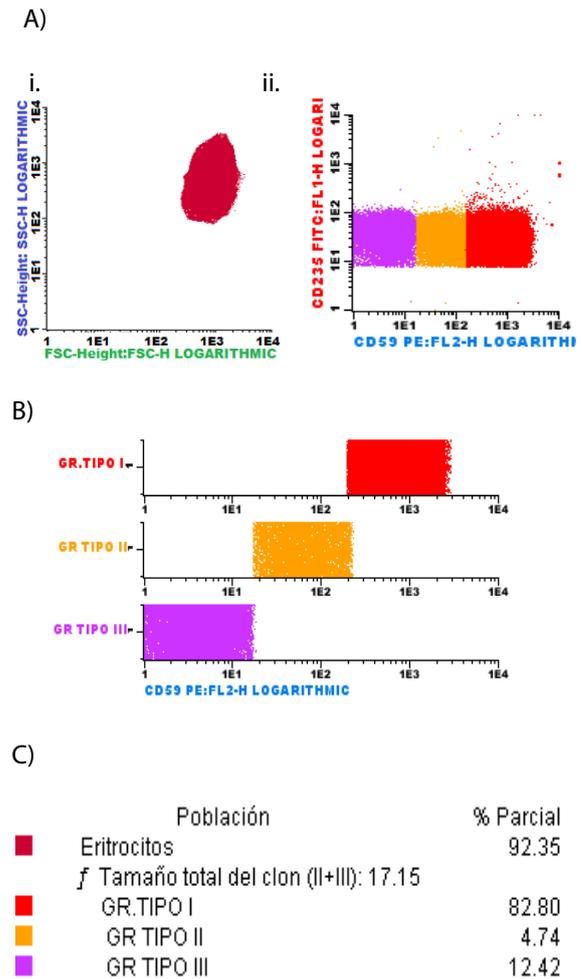


Figura 3. Caso representativo de un paciente HPN (+) donde se observan GR tipo I, II y III. **A)** i) Gráfico tamaño /granularidad (FSC/SSC) de GR. ii) Expresión de CD59 en GR seleccionados con CD235a. **B)** Gráfico de banda donde se observan las 3 poblaciones de GR con distinta expresión de CD59. **C)** Proporción de cada población de GR tipo I, II y III según la expresión de CD59.

De los 7 pacientes HPN (+), solo uno fue tratado con eculizumab observándose aumento del tamaño del clon HPN en GR (35% a 45%), descenso de la LDH (3010 a 539 U/L), aumento en el hematocrito (Hto) (25% a 27%) y hemoglobina (Hb) (8 a 9,3 g/dl) a los 43 días de iniciado el tratamiento.

Discusión y conclusiones

De los 7 pacientes HPN (+) 5 fueron derivados por AH Coombs negativa, siendo esta la causa más frecuente de sospecha diagnóstica de HPN. Esto también se asocia a mayor tamaño del clon tanto en Ns como en Mn. El mismo fue mayor al 50% en 4 de los 5 casos descriptos, presentándose clínicamente, como una HPN clásica (10,13-15). El uso de CD59PE (clon MEM-43) permitió discriminar entre los clones tipo I, II y III en GR y en solo 3 casos se encontraron pequeños clones de GR tipo II (con deficiencia parcial de CD59) como se muestra en la tabla 1. El mosaicismo fenotípico de la HPN depende del genotipo PIG-A, el cual determina el grado de deficiencia. El curso clínico de los pacientes con GR tipo II es benigno debido a que los GR tipo II son relativamente resistentes a la hemólisis espontánea. Sin embargo, es poco frecuente este hallazgo y en la mayoría de los casos están asociados a GR tipo I y III (11, 13,15).

En el análisis de Ns la selección de la población con CD15/SSC presentó ventajas respecto al uso de CD45 solo, ya que esta estrategia permitió la exclusión de eosinófilos los cuales contaminan el *gate* del CD45. El uso de CD16 en el *screening* inicial de Ns HPN es de limitada utilidad ya que existen variantes polimórficas CD16 (-) y además este marcador se encuentra ausente en eosinófilos dando falsos negativos (13, 16,17).

El CD64 como reactivo de *gate* asociado a CD14 y FLAER resultó ser la mejor combinación para la detección de clones HPN en Mn, eliminando así la sobre estimación del tamaño del clon debido a células dendríticas CD14 (-) que se encuentran en el *gate* de los Mn (11, 13,16).

El uso de antiglicoforina A (CD235a) para la selección de los GR aumentó la pureza del *gate* eliminando falsos negativos debido a la presencia de detritus y/o plaquetas. La combinación con CD59PE permitió discriminar entre los tres subtipos de GR y no se observó aglutinación masiva de los mismos, fenómeno observado por algunos autores con el uso de CD235PE. Esto se debe a que el fluorocromo FITC se encuentra cargado negativamente por lo cual los GR se repelen evitando así su aglutinación (11).

Como ya ha sido reportado en trabajos previos, durante el tratamiento con eculizumab se observó un aumento en el tamaño del clon de GR, debido al bloqueo de C5 inhibiendo la activación terminal del complemento. El tratamiento con eculizumab reduce con gran efectividad la hemólisis intravascular en HPN, fenómeno que se ve reflejado por una abrupta disminución de los valores de la enzima LDH a los pocos días de iniciado el tratamiento. La reducción de la hemólisis y el aumento de los GR HPN se relacionan con mejorías en la anemia demostrada por el aumento de la concentración de la Hb (8, 9, 15,18). En un trabajo donde se monitorearon 97 pacientes tratados con esta droga se observaron mejorías en los valores de Hto y Hb a las 8 semanas de iniciado el tratamiento, y disminución de LDH en la primer semana (9).

Destacamos en éste trabajo, la importancia de la utilización de protocolos estandarizados en el diagnóstico por CF y la alta sensibilidad de la técnica para la detección de pequeños clones HPN y clones con deficiencia parcial de proteínas ligadas a GPI.

Agradecimientos

A.P.R.A.D.O.C: Asociación pro ayuda al departamento de Oncohematología-Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba.

Bibliografía

1. Miyata T., Takeda J., Lida Y., Yamada N., Inoue N., Takahashi M., Maeda K. y col. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* (1993) 259:1318-1320.
2. Takeda J., Miyata T., Kawagoe K., Lida Y., Endo Y., Fujita T. y col. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* (1993) 73:703-711.
3. Bocconi P., Del Vecchio L., Di Noto R., Rotoli B. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Crit.Rev. Oncol.Hematol.* (2000) 3:25-43.
4. Hernández-Campo P.M., Almeida J., Orfao A. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. *Med.Clin.* (2008) 131:617-630.
5. Hillmen P, Lewis SM., Bessler M., Luzzatto L., Dacie J.V. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N.Engl.J.Med.* (1995) 333:1253-1258.

6. Galili N., Ravandi F., Palermo G., Bubis J., Illingworth A., Castro-Malaspina H. y col. Prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) cells in patients with myelodysplastic syndromes (MDS), aplastic anemia (AA), or other bone marrow failure (BMF) syndromes: Interim results from the EXPLORE trial. *J.Clin.Oncol. (Meeting Abstracts)* (2009) 27:782.
7. Tichelli A., Gratwohl A., Nissen C., Speck B. Late clonal complications in severe aplastic anemia. *Leuk.Lymphoma* (1994) 12:167-175.
8. Hillmen P., Young N.S., Schubert J., Brodsky R.A., Socie G., Muus P. y col. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N.Engl.J.Med.* (2006) 355:1233-1243.
9. Brodsky R.A., Young N.S., Antonioli E., Risitano A.M., Schrezenmeier H., Schubert J. y col. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* (2008) 111:1840-1847.
10. Consenso Argentino de Diagnóstico y Tratamiento en Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Guía del Grupo Argentino de Interés en HPN. Buenos Aires, Argentina 2013.
11. Sutherland R., Kuek N., Azcona-Olivera J., Anderson T., Acton E., Barth D. y col. Use of a FLAER-Based WBC Assay in the Primary Screening of PNH Clones. *Am.J.Clin.Pathol.* (2009) 132:564-572.
12. Parker C., Omine M., Richards S., Nishimura J., Bessler M., Ware R. y col. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* (2005) 106:3699-3709.
13. Borowitz M.J., Craig F.E., Digiuseppe J.A., Illingworth A.J., Rosse W., Sutherland D.R. y col. Guidelines for the Diagnosis and Monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Related Disorders by Flow Cytometry. *Clin.Cytom.* (2010) 78B:211-230.
14. Morado M., Subirá D., López Rubio M., Grupo Español para el Estudio de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna por Citometría de Flujo. Hemoglobinuria paroxística nocturna: nuevos tratamientos y recomendaciones generales para su diagnóstico. *Med. Clin.* (2010) 134:369-374
15. Parker C.J. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitor therapy. *HematologyAm.Soc.Hematol.Educ. Program.2011* (2011) 21-9.
16. Sutherland R., Keeney M., Illingworth A. Practical Guidelines for the High-Sensitivity Detection and Monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones by Flow Cytometry. *Clin.Cytom.* (2012) 82B:195-208.
17. Wang L, Wells DA, Deeg HJ, Loken MR. Flow cytometric detection of nonneoplastic antigenic polymorphisms of donor origin after allogeneic marrow transplant: A report of two cases. *Am.J. Clin.Pathol.* (2004) 122:135-140.
18. Hillmen P., Young N., M.D., Schubert J., Brodsky R., Socie G., Muus P y col. The Complement Inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N.Engl.J.Med.* (2006) 355:1233-1243.

