

# Diagnóstico de HPN Hemoglobinuria paroxística nocturna: diagnóstico y seguimiento por Citometría de Flujo.

PNH Diagnosis  
Paroxysital Nocturnal Hemoglobinuria: diagnosis and  
follow up by Flow Cytometry.

Galeano A, Sapia S, Spinelli O, Geraghty G, Ferreyra Y.

*Laboratorio de Citometría de flujo. FUNDALEU.*

*agaleano@fundaleu.org.ar*

*Fecha de recepción: 04/03/2014  
Fecha de aprobación: 15/03/2014*



LABORATORIO  
EN HEMATOLOGÍA

HEMATOLOGÍA, Vol.18 N° 1: 67-69  
Enero - Abril 2014

## Resumen

La HPN es una enfermedad clonal adquirida, 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 Glicosilfosfatidilinositol (GPI). Este es un glicolípido que ancla muchas proteínas a la superficie de la membrana celular. La mutación ocurre en la célula precursora hematopoyética dando lugar a la deficiencia parcial o total de la proteína PIG-A con la consecuente alteración en la síntesis del GPI de anclaje.

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.

La HPN está caracterizada por anemia hemolítica crónica intravascular, hemoglobinuria, citopenias debido al fallo de la médula ósea, trombosis y raramente transformación leucémica.

La expansión de la progenie de la célula precursora portadora de esta mutación es la responsable de las manifestaciones de esta enfermedad que no es nocturna –la hemólisis es constante– y no siempre se presenta con Hemoglobinuria.

**Palabras claves:** HPN- FLAER- GPI

## Abstract

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal disease caused by the somatic mutation of the PIG-A gene, located at the end of the short arm of the X chromosome (Xp22.1) which encodes a protein involved in the synthesis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) that anchors many proteins to the cellular membrane surface. This mutation occurs in a hematopoietic stem cell generating a partial or total deficiency of the PIG-A protein affecting consequently the synthesis of the GPI anchor.

The result of the loss of these proteins from the cellular membrane surface is the increase sensibility for complement mediated lysis. PNH is characterized by chronic intravascular haemolysis, hemoglobinuria, cytopenias due to bone marrow failure, thrombosis and eventually leukemic transformation.

The mutated hematopoietic stem cell expansion is responsible for the clinical manifestations of this disease that is not “nocturnal” -haemolysis is constant- and not always has hemoglobinuria.

**Keywords:** PNH - FLAER-GPI

## Introducción

Actualmente, 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 (HPN), pudiendo identificar distintos tipos celulares de acuerdo con la expresión de proteínas ancladas a través de GPI.<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>

TIPO I: SIN deficiencias de proteínas asociadas a GPI.

TIPO II: Con deficiencia PARCIAL de proteínas asociadas a GPI.

TIPO III: Con deficiencia TOTAL de proteínas asociadas a GPI.

## Fundamento

En el estudio de proteínas asociadas a GPI resulta especialmente útil la investigación del déficit de expresión de CD16, CD24, CD157 y CD66b en granulocitos neutrófilos y de CD14, y CD157 en monocitos. Alternativamente, puede emplearse un derivado fluorescente de la toxina bacteriana aerolisina (FLAER), capaz de unirse a GPI en las distintas subpoblaciones de leucocitos, (incluidos los granulocitos neutrófilos y monocitos) y plaquetas (pero no los hematíes). En este caso debe investigarse además la expresión de un marcador (de los mencionados anteriormente) asociado a línea de granulocito neutrófilo o de monocito.

Cuando se evidencia un defecto en la expresión de

proteínas asociadas a GPI en granulocitos neutrófilos y monocitos, conviene completar el estudio a través de la evaluación de CD59 en hematíes, con el fin de definir el tipo de hematíes presentes en SP, su grado de afectación y niveles de expresión de CD59.

### • Poblaciones celulares de interés

En muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA tripotásico, con no más de 24 horas de edad (los eritrocitos son estables 7 días) se estudian los granulocito neutrófilo y monocito ya que dentro de las poblaciones celulares representadas en SP en número suficiente, éstas constituyen las subpoblaciones celulares que suelen mostrar un mayor grado de afectación, debido a su corta vida media.

Aunque el estudio de hematíes fue lo tradicional debido a su larga vida media el tamaño del/los clones asociados a GPI suelen ser menores (debido a la hemólisis)

### • Combinación de marcadores

El estudio de las proteínas asociadas a GPI debe combinarse con marcación que permitan la correcta e inequívoca identificación de las subpoblaciones de interés. Para monocitos y granulocitos neutrófilos usamos CD15, CD64 y CD45, en combinación con las características de dispersión de luz (dispersión frontal o FSC y dispersión lateral o SSC).

Para hematíes usamos CD235a como marcador específico para eritrocitos y eventualmente CD61 como marcador plaquetario.

	V450	V 500	FITC/ ALEXA 488	PE	PerCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
SP	CD64	CD45	FLAER	CD157	CD15	CD16	CD14	CD24
SP (alt)		CD45	CD66b	CD24	CD15	CD16		
			CD235a	CD59	CD45			

### • Adquisición y análisis de datos

Previamente a la adquisición de datos en el citómetro de flujo, éste debe de haber sido calibrado adecuadamente de forma óptima para la lectura de marcaciones fluorescentes en i) leucocitos y ii) hematíes de SP, empleando condiciones diferentes adecuadas para una de estas dos poblaciones celulares. Se recomienda la adquisición/estudios de 100.000 eventos correspondientes a leucocitos

para alcanzar una sensibilidad para la detección de poblaciones representadas en la muestra en frecuencias de 0.05% con una precisión elevada en el recuento CV<10% cuando esta represente 0.1% (o más) de la celularidad global de la muestra.

### • Controles

Se emplean controles internos de la propia muestra.

**Utilidad clínica**

Se recomienda hacer un rastreo diagnóstico ante la sospecha de HPN. Además, se recomienda realizar monitorización de pacientes en tratamiento con eculizumab en el momento de iniciar el tratamiento, a los 6 y 12 meses y, posteriormente con periodicidad anual.<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>

En los casos no tratados así como en las formas subclínicas de HPN se recomienda realizar una monitorización con periodicidad anual que evalúe el tamaño del clon deficitario en proteínas asociadas a GPI. Finalmente, debe realizarse la monitorización del clon deficitario en GPI ante la observación de cambios en el comportamiento clínico de la enfermedad.

Tabla Resumen		
Variable		Recomendación
Tipo de muestra		Sangre periférica
Poblaciones preferentes	1º paso 2º paso	Neutrófilos y monocitos Hematías
Marcadores GPI	1º paso Alternativa 2º paso	CD16* y CD24 en gr. Neutrófilos y CD14 en monocitos FLAER y CD157 en granulocitos y monocitos. CD59 en hematías
Marcadores adicionales		*CD45, CD15 y CD64 en el estudio de leucocitos *CD235a y CD45 (CD61) en el estudio de hematías
Combinación de marcadores para el estudio de Leucocitos		FLAER-Alexa488; CD157PE; CD15PerCPCy5.5; CD16PE-Cy7; (CDCD14APC); CD24APC-H7; CD64 V450; CD45 V500
Combinación de marcadores para el estudio de Hematías		CD235a FITC CD59PE CD45 PerCP
Controles		INTERNOS: Poblaciones positivas y negativas o con diferente intensidad de fluorescencia para cada marcador
Indicaciones		Diagnóstico / Monitorización

\*CD66b y podría usarse como marcador alternativo o de confirmación al CD16

**Bibliografía**

1. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, Borowitz MJ. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114:459-466
2. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Clinical Cytometry Society. Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):211-30
3. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012 Jul;82(4):195-208.
4. Sutherland DR, Acton E, Keeney M, Davis BH, Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Jul 3