

Detección de clonas de hemoglobinuria paroxística nocturna por citofluorometría de cuatro colores en un laboratorio de hematología del Noreste de México

Adrián Alejandro Ceballos-López,* Roxana Saldaña-Vázquez,* Myrna P Pequeño-Luévano,* María del R Salazar-Riojas,* Nereida Méndez-Ramírez,* Marta A Reyes-López,* David Gómez-Almaguer*

RESUMEN

Antecedentes: la hemoglobinuria paroxística nocturna es una enfermedad rara, caracterizada por hemólisis mediada por complemento. **Objetivo:** reportar los resultados de los estudios de laboratorio relacionados con el diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna en un hospital de concentración del norte de México.

Material y método: estudio retrospectivo, de pacientes con sospecha diagnóstica de hemoglobinuria paroxística nocturna a quienes en nuestro laboratorio se realizó entre los meses de enero 2005 y mayo 2012 citofluorometría de cuatro colores, basada en detección de CD55, CD59, CD45, CD14 y CD16; se analizaron las variables demográficas disponibles.

Resultados: se incluyeron 95 pacientes, 34 (35.7%) hombres, 53 (55.7%) mujeres y 8 (8.6%) de género desconocido. La mediana de edad fue de 38 años, con límites de 1 y 87 años. De las 95 muestras, 11 (11.5%) fueron positivas, 82 (86.3%) negativas y 2 (2.1%) indeterminadas.

Conclusiones: se encontró que el porcentaje de pruebas positivas fue bajo, incluso en pacientes con sospecha diagnóstica de hemoglobinuria paroxística nocturna. La citofluorometría de cuatro colores es una herramienta útil para diagnosticar esta enfermedad.

Palabras clave: clonas, hemoglobinuria paroxística nocturna, citofluorometría de cuatro colores, laboratorio de hematología, Noreste de México.

ABSTRACT

Background: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare disease characterized by complement-mediated hemolysis.

Objective: Report laboratory tests results related to PNH diagnosis at a reference hospital in the Northeast of México.

Material and method: Retrospective study of results of patients suspected with PNH who underwent four-color cytofluorometry based on detection of CD55, CD59, CD45, CD14 and CD16 at our laboratory from January 2005 to May 2012. An analysis of available demographic variables was performed.

Results: 95 patients—34 (35.7%) males, 53 (55.7%) females and 8 (8.6%) of unknown sex were included in the study. Median age was 38 years; a minimum of a year and up to 87 years. Of the 95 samples, 11 (11.5%) were positive, 82 (86.3%) negative and 2 (2.1%) indeterminate.

Conclusions: A low percentage of positive test results was found even in patients with suspected diagnosis of PNH. The four-color cytofluorometry is a useful diagnostic tool for this disease.

Key words: Clones, Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Four-Color Cytofluorometry, Hematology Laboratory, Northeastern Mexico.

* Servicio de Hematología del Hospital Universitario José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

Correspondencia: Dr. David Gómez Almaguer. Madero y Gonzalitos sin número. Colonia Mitras Centro. Monterrey 64460, Nuevo León, México. Correo electrónico: dr_gomez@infosel.net.mx
Recibido: mayo 2012. Aceptado: junio 2012.

Este artículo debe citarse como: Ceballos-López AA, Saldaña-Vázquez R, Pequeño-Luévano MP, Salazar-Riojas MR, Méndez-Ramírez N, Reyes-López MA, Gómez-Almaguer D. Detección de clonas de hemoglobinuria paroxística nocturna por citofluorometría de cuatro colores en un laboratorio de hematología del noreste de México. Rev Hematol Mex 2012;13(3):95-98.

La hemoglobinuria paroxística nocturna es una enfermedad rara de las células hematopoyéticas, consecuencia de una mutación somática del gen PIGA en el cromosoma X.¹ Este gen codifica una enzima en la primera etapa de la síntesis del glicofosfatidilinositol (GPI) que causa incapacidad parcial (células tipo II) o total (células tipo III) de producir proteínas ancladas al GPI (GPI-AP) como el CD55 y CD59 en eritrocitos y granulocitos.² Las células deficientes de CD55 y CD59 son incapaces de impedir la activación de la superficie celular por la vía alterna del complemento y de bloquear la formación del complejo de ataque a la membrana, lo

que da a la enfermedad su característica distintiva de destrucción celular.

Las manifestaciones clínicas de la hemoglobinuria paroxística nocturna son: anemia hemolítica, insuficiencia medular y estado de trombofilia. El tromboembolismo es la primera causa de morbilidad y mortalidad por hemoglobinuria paroxística nocturna; algunas trombosis inusuales incluyen: síndrome de Budd-Chiari, trombosis mesentérica y cerebral.³ La inactivación del complemento reduce marcadamente la incidencia de trombosis.

Todos los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna padecen disfunción medular. Hay una muy bien documentada relación entre hemoglobinuria paroxística nocturna y anemia aplásica. Se reporta que, incluso, 40% de los pacientes con anemia aplásica tienen clonas de hemoglobinuria paroxística nocturna, dependiendo de la sensibilidad del ensayo utilizado.⁴ En 90% de los casos la clona deficiente de GPI-AP en neutrófilos de sangre periférica es menor de 25%; la expansión clonal puede ocurrir en 15 a 50% de los casos.

El diagnóstico de laboratorio para hemoglobinuria paroxística nocturna ha mejorado mucho con la instrumentación de pruebas basadas en citometría de flujo con uso de anticuerpos monoclonales para GPI-AP.⁵

No todos los laboratorios del país cuentan con esta tecnología. Se sigue utilizando la prueba de Ham para el diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna y, por ello, no puede establecerse la incidencia de esta enfermedad en nuestro país. Este estudio, relativamente rudimentario y complicado, depende de la experiencia subjetiva del químico responsable.

En este estudio se describe la experiencia del diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna mediante citometría de flujo convencional en una población del noreste de México.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo efectuado con base en la revisión de todas las citometrías de flujo solicitadas por un médico hematólogo, por sospecha de hemoglobinuria paroxística nocturna, al Laboratorio del Departamento de Hematología del Hospital Universitario José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León de enero 2005 a mayo 2012.

Las pruebas se realizaron en un citómetro de flujo BDFACSCanto II. Los fluorocromos utilizados fueron:

CD55 BD Pharmigen clona IA10, CD59 PE BD Pharmigen clona H19, CD14 FITC DAKO clona TUK4, CD64 PE DAKO clona 10.1, CD16 PE DAKO clona DJ1300 y CD45 BD PerCP clona 2D1. Se consideraron positivas las pruebas con deficiencia CD55, CD59, CD14 o CD16 en glóbulos rojos, granulocitos o monocitos. Se analizaron las variables demográficas.

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se realizaron 95 citometrías de flujo por sospecha de hemoglobinuria paroxística nocturna; 34 (35.7%) hombres, 53 (55.7 %) mujeres y 8 (8.6) cuyo género no pudo determinarse. La mediana de edad fue de 38 años con límites de 1 y 87 años. De las 95 muestras, 11 (11.5%) fueron positivas, 82 (86.3%) negativas y 2 (2.1%) indeterminadas. Entre las muestras que resultaron positivas, 3 (27.2%) fueron de hombres y 8 (72.8%) de mujeres; la mediana de edad fue de 38 años con límites de 29 y 77 años. En estas muestras, la expresión de CD55 se encontró deficiente en 62.1% de glóbulos rojos, 59.1% de monocitos y 43.2% de granulocitos; la expresión de CD59 en 47.9% de los glóbulos rojos y 10% de monocitos, mientras que el CD14 y el CD16 se encontraron disminuidos en 49.5% y 56.95% de las poblaciones respectivas (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

La medición de la expresión de GPI-AP por citometría de flujo es el patrón de referencia en diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna. Ha sustituido a técnicas como la prueba de lisis de sacarosa y la prueba Ham.^{6,7} La citometría de flujo permite una determinación específica y sensible en distintos linajes celulares e, incluso, de pequeñas poblaciones con deficiencias parciales de GPI-AP. Esto es importante en la aplicación clínica porque la mayoría de los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna tipo III en más de 20% de los eritrocitos tienen hemólisis clínicamente significativa, mientras que casi la mitad de los pacientes con más de 50% de deficiencia de GPI en los granulocitos tienen un episodio de trombosis venosa en los primeros diez años de diagnóstico.⁸

Se sugiere que los precursores en médula ósea de los eritrocitos y granulocitos tienen la misma tasa de proliferación en hemoglobinuria paroxística nocturna, aunque con

Cuadro 1. Resultados de citometrías de flujo positivas para hemoglobinuria paroxística nocturna

Sexo/ Edad (años)	Resultado de citometría de flujo
M/38	59.17% de los monocitos y 67.95% de granulocitos muestran deficiencia de CD55.
M/45	Disminución de expresión de CD55 y CD59 en serie roja y serie blanca.
F/29	Deficiencia de CD59 en serie roja.
F/38	94.5% de la serie granulocítica presenta deficiencia en la expresión de CD16 . La expresión CD55 y CD59 es normal.
F/37	Monocitos: 96% muestra expresión deficiente para CD14 y el 92% expresión deficiente de CD55. La expresión de CD59 es normal. Granulocitos: 94% muestra expresión deficiente de CD16. La población de granulocitos tiene expresión normal de CD55 y CD59. Glóbulos rojos: 33% de esta población muestra expresión deficiente de CD59. La expresión de CDSS es normal.
M/77	Los monocitos muestran expresión deficiente de CD14 en 43 % de su población y la serie granulocítica expresión deficiente de CD16 en 36%.
F/59	La serie roja muestra expresión normal de CD55 y expresión débil de CDS9 en 28% de los glóbulos rojos. Expresión de CD14 y CD16 normal.
F/68	Los monocitos muestran expresión deficiente de CD14 en 36 % de su población. La serie granulocítica muestra expresión deficiente de CD16 en 30%.
F/38	La serie granulocítica muestra expresión normal de CDSS y CDS9, 65% de esta población muestra expresión deficiente de CD16. 50% de los monocitos presenta expresión deficiente de CDSS y en 65% expresión deficiente de CD14. La expresión de CDS9 es normal en esta población. La serie roja presenta expresión normal de CD55 y CDS9.
F/59	Los glóbulos rojos muestran expresión normal de CDSS y CDS9. La serie granulocítica muestra expresión deficiente CDSS en 18.5% de sus células. La expresión de CDS9 y CD16 es normal. 23% de los monocitos muestra expresión deficiente de CD14. La expresión de CDSS y CD59 es normal
F/38	Los glóbulos rojos muestra expresión deficiente de CDS9 en 68.5%. La expresión de CDSS es normal. La serie granulocítica muestra expresión deficiente CD16 en 96.8%. La expresión de CDSS y CDS9 es normal. La expresión de CD14, CDSS y CD59 en los monocitos es normal.

frecuencia se detectan clonas deficientes en granulocitos que no se identifican en eritrocitos.⁹ Los lineamientos para el diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna proponen utilizar glicoporina A(CD235a) y CD59 en el análisis rutinario en glóbulos rojos y CD45/SS o CD15/SS con FLAER (*fluorescinated inactive aerolysin variant*), CD24, CD66b, y CD16, en el análisis de clonas de hemoglobinuria paroxística nocturna en granulocitos.¹⁰ FLAER utiliza la aerolisina, una toxina de la bacteria *Aeromonas hydrophila* que se une directamente a las GPI-AP.¹¹ La técnica de FLAER se limita únicamente a los leucocitos; sin embargo, es más sensible que otras en la detección de CD55 y CD59 y da mejor distinción entre las células tipo I, II y III.¹²

El método utilizado en nuestro laboratorio es citofluorometría de cuatro colores basada en detección de CD55, CD59, CD45, CD14 y CD16. No es suficientemente sensible ni específica para detectar clonas deficientes de GPI-AP menores a 1-2%, que por lo general se encuentran en síndromes de insuficiencia medular, como la anemia aplásica y el síndrome mielodisplásico. Por esto, puede inferirse que la incidencia reportada por nuestro laboratorio (11.5% de muestras positivas) podría ser mayor si se utilizara análisis de citofluorometría de cuatro colores junto con la técnica de FLAER.

La identificación de células de hemoglobinuria paroxística nocturna en un paciente con citopenias permite

minimizar, oportunamente, las complicaciones más graves y frecuentes y modificar la conducta terapéutica. También permite elegir entre un tratamiento potencialmente curativo como el trasplante de células hematopoyéticas y una modificación del espectro clínico y calidad de vida con anticuerpo anti-complemento (*eculizumab*).

Con lo anterior mejoran la sensibilidad y especificidad del análisis de muestras sospechosas de hemoglobinuria paroxística nocturna cuando se combinan métodos convencionales de citofluorimetría con la técnica de FLAER para detección de clonas de menor tamaño. Esta combinación puede ayudar a conocer la incidencia e importancia real de la hemoglobinuria paroxística nocturna en México.

REFERENCIAS

1. Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur J Haematol* 2009;83(6):503-511.
2. 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. Clinical Cytometry* 2012;82B:195-208.
3. Parker, C. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 2012;19:141-148.
4. Dunn DE, Liu JM, Young NS. Bone marrow failure in PNH. En: *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the glycosylphosphatidylinositol-linked proteins*. San Diego: Academic Press; 2000;113-138.
5. Britta Höchsmann, Markus Rojewski, Hubert Schrezenmeier. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol* 2011;90:887-899.
6. Hillmen P, Hows JM, Luzzatto L (1992) Two distinct patterns of glycosylphosphatidylinositol (GPI) linked protein deficiency in the red cells of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*;80(3):399-405.
7. De Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, Roth S, de Guibert S, Maury S, Cahn JY, Socie G (2008) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*112:3099-3106.
8. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in PNH. *Blood* 2003;102:3587-3591.
9. Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J, Anderson T, Acton E, Barth D, Keeney M. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol* 2009;132:564-572.
10. 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. *Cytom Part B Clin Cytom* 2010;78B:211-230.
11. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114:459-466.
12. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E, Bamford S, Chin-Yee I, Keeney M. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:167-177.