

EVOLUCION DEL CLON DE LA HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA EN LA CRISIS  
HEMOLITICA DE UNA ANEMIA APLASICA  
ESTUDIO POR CITOMETRIA DE FLUJO

KATIA CANALEJO, NORA GALASSI, NORMA RIERA, RAQUEL BENGIO, MONICA AIXALA

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina*

**Resumen** Se estudió por citometría de flujo la expansión de un clon HPN durante una crisis hemolítica en una paciente con anemia aplásica (AA) de 18 años de evolución. Cuando las pruebas de Ham y Sacarosa fueron positivas (día 0) estaban disminuidos los niveles de hemoglobina y los recuentos de eritrocitos y leucocitos. Estos descensos se fueron acentuando hasta el último día del estudio (día 24). Durante este período los niveles de LDH, bilirrubina indirecta y reticulocitos se mantuvieron elevados. El clon HPN se investigó evaluando la expresión de CD55 y CD59 sobre los eritrocitos. Las células de la paciente presentaron una menor intensidad de fluorescencia para CD55 respecto del control normal. Con la marcación con anti CD59 se detectó la presencia de dos poblaciones de hematíes: HPN I, con fluorescencia positiva semejante a la de la población normal y HPN III, con fluorescencia negativa, correspondiente al clon HPN. El porcentaje de la población HPN III se incrementó de 52% (días 0 y 7) a 70% (día 24). Las proteínas de la membrana leucocitaria también se encontraron afectadas (CD14 ausente y CD16 disminuida). El análisis global de los datos reveló una buena correlación entre la observación clínica, la evolución de los valores del laboratorio y la expansión del clon.

**Palabras claves:** clon HPN, crisis hemolítica, citometría de flujo

**Abstract** *Evolution of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone during an hemolytic crisis in a patient with aplastic anemia. Flow cytometry analysis.* The expansion of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clone was evaluated in a patient with aplastic anemia (AA) of 18 years of evolution during an hemolytic crisis. On day 0, Ham and Sucrosa tests were positive and hematological parameters were altered. Low hemoglobin (Hb) levels and erythrocyte and leukocyte counts were found and continued decreasing on days 7 and 24 (last day of study). High LDH levels, indirect bilirubin and reticulocyte counts were detected throughout. We evaluated CD55 and CD59 on erythrocytes by flow cytometry. Our results showed low CD55 expression with respect to the normal pattern. Since day 0, CD59 staining detected two red cell populations: PNH I (48%), cells with positive fluorescence similar to normal and PNH III (52%), negative cells (PNH clone). These negative cells increased, reaching 70% on day 24. Other membrane anchored leukocyte proteins were also absent (CD14) or decreased (CD16). We found a good correlation between clinical observations, evolution of the laboratory values and expansion of the PNH clone.

**Key words:** PNH clone, hemolytic crisis, flow cytometry

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un desorden hemolítico, adquirido, clonal, caracterizado por una sensibilidad aumentada de los eritrocitos a la lisis mediada por el complemento. Esta enfermedad es causada por mutaciones somáticas en el gen PIG-A las cuales afectan la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI)<sup>1</sup> que es utilizado por algunas proteínas como sistema de anclaje a la membrana celular. Como la mutación del

gen PIG-A se produce en una célula pluripotencial están afectados todos los linajes hematopoyéticos. Entre las proteínas de membrana con expresión deficiente se encuentran el CD55 (DAF) y el CD59 (MIRL). Estas proteínas protegen a las células de la acción lítica del complemento. El CD14 (receptor del lipopolisacárido bacteriano) y el CD16 (receptor FcγIIIb) también están disminuidos.

Es reconocida la asociación entre HPN y anemia aplásica (AA)<sup>2</sup>. En ambas enfermedades hay una disminución de progenitores hematopoyéticos lo que sugiere un defecto básico común<sup>3</sup>. Una alta proporción de pacientes con AA tiene riesgo de desarrollar clones HPN durante la evolución de la enfermedad. Los clones HPN pueden ser detectados por citometría de flujo por ser una técnica más sensible que las convencionales de Ham

y Sacarosa<sup>4</sup>, para ello es necesario evaluar al momento del diagnóstico por lo menos dos marcadores de superficie que utilicen el GPI como anclaje a la membrana celular.

El objetivo de este estudio fue analizar el patrón de expresión del CD59 en eritrocitos durante la crisis hemolítica de una paciente con diagnóstico de AA y establecer su relación con el perfil clínico.

### Caso clínico

En 1980 ingresó a nuestro Instituto una mujer de 27 años, caucásica, con antecedentes personales de anemia. Presentaba equimosis, hematomas y palidez, sin organomegalia. Laboratorio: Hematíes  $1.2 \times 10^{12}/L$ , Hb 3,7 g/dL, Hto 0,1L/L, Reticulocitos 1.6%, Leucocitos  $2.4 \times 10^9/L$  (N: 28%, L: 67%, M 4%), plaquetas  $25 \times 10^9/L$ , bilirrubina total 6.84  $\mu\text{mol/L}$ , hierro sérico 410  $\mu\text{g/dL}$ , saturación de la transferrina 82%, anticuerpos antivirales negativos (HCV, HAV, HBV, HIV), prueba de Ham negativa. La biopsia por punción de la médula ósea (MO) mostró hipocelularidad global con línea eritroide en proporción normal y descenso de megacariocitos. No se observaron sideroblastos en anillo. Por estudios eritrocinéticos se encontró sobrevida eritrocitaria acortada con incremento en la depuración plasmática del hierro. Había disminución en el crecimiento de colonias eritroides. El resultado de los estudios citogenéticos de la MO reveló importantes metafases hipodiploides. Se diagnosticó AA.

La pancitopenia se trató con esteroides anabólicos (oximetolona) hasta el desarrollo de trombocitopenia. Se obtuvo una remisión parcial después de la administración oral de esteroides (prednisona a dosis estándares de 1mg/kg/día). La paciente fue esplenectomizada y recibió anabólicos durante períodos variables en el curso de la enfermedad. A los 18 años de evolución y ante una crisis de dolor abdominal, se realizaron las pruebas de Ham y Sacarosa. Ambas fueron positivas, confirmando la asociación HPN-AA. La paciente no había recibido terapia esteroide ni transfusiones sanguíneas antes de realizar los estudios hematológicos. Posteriormente requirió transfusiones y corticoterapia con pobre respuesta. Un año después, a los 46 años falleció durante el curso de una infección. El presente estudio se realizó entre el 3 y 27 de noviembre de 1998.

#### Estudios hematológicos

Al inicio de este estudio (día 0), las pruebas de Ham y Sacarosa fueron positivas, y los parámetros hematológicos fueron registrados en los días 0, 7 y 24 (Tabla 1). En el día 0, la LDH (2350 UI/L) y la bilirrubina indirecta (42.4  $\mu\text{mol/L}$ ) estaban aumentadas. En todos los frotis de sangre periférica, se observó moderada acantocitosis, dianocitosis, punteado basófilo, y marcadas macrocitosis y policromatofilia.

#### Citometría de Flujo

Se empleó un citómetro FACScan (Becton Dickinson). Las señales de dispersión de la luz y las de fluorescencia fueron adquiridas con amplificación logarítmica para un mínimo de 25 000 células.

La expresión de CD55 y CD59 sobre eritrocitos fue determinada por técnicas habituales de marcación de proteínas de membrana con anticuerpos monoclonales purificados (Serotec)

TABLA 1.- Valores hematológicos

| Día                               | 0     | 7     | 24    |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| Hematíes ( $\times 10^{12}/L$ )   | 3.28  | 2.72  | 2.29  |
| Hb (g/dL)                         | 9.8   | 8.3   | 7.5   |
| Hto (L/L)                         | 0.31  | 0.26  | 0.23  |
| VCM (fL)                          | 94    | 96    | 100   |
| Reticulocitos ( $\times 10^9/L$ ) | 272.2 | 279.7 | 274.8 |
| Eritroblastos (%)                 | 2     | 27    | 35    |
| Leucocitos ( $\times 10^9/L$ )    | 4.3   | 4.1   | 3.3   |
| Neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )   | 3.0   | 1.7   | 1.3   |
| Monocitos ( $\times 10^9/L$ )     | 0.3   | 0.4   | 0.3   |
| Linfocitos ( $\times 10^9/L$ )    | 1.0   | 2.0   | 1.6   |

Hb: hemoglobina, Hto: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio

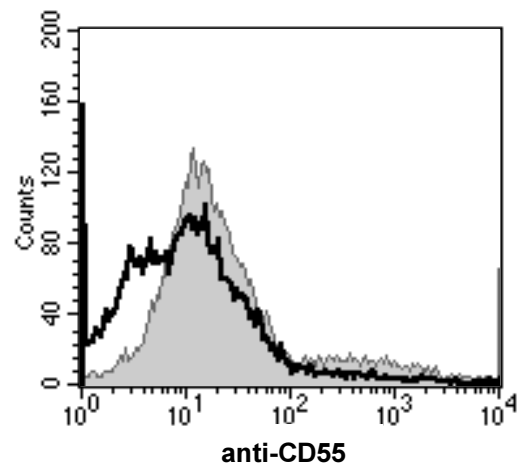


Fig. 1.- Expresión de CD55 sobre la membrana de los eritrocitos de la paciente (línea negra) comparada con un dador normal (línea gris).

y un segundo anticuerpo marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Serotec)<sup>5</sup>.

El análisis de los datos expresados como histogramas de intensidad de fluorescencia demostró una disminución de la expresión de CD55 sobre los eritrocitos de la paciente respecto a los del dador voluntario normal (Figura 1). Con la marcación anti-CD59 (Figura 2) se puso en evidencia la existencia de dos poblaciones bien definidas durante todo el período de estudio: una con alta intensidad de fluorescencia media (IFM) similar a la observable en el dador normal y otra, con baja IFM, cuyo porcentaje se incrementó de 52% a 70% entre los 7 y 24 días. También se evaluaron proteínas de membrana sobre leucocitos con la técnica de marcación de sangre entera con anti CD16-FITC (Caltag) y anti CD14-PE (Becton Dickinson). Los eritrocitos fueron lisados con solución comercial (Becton Dickinson). En este caso se adquirieron 20000 células con amplificación lineal para las señales de dispersión de la luz y amplificación logarítmica para las fluorescentes. La IFM para el anti-CD16 sobre los neutrófilos de la paciente descendió 2 logaritmos respecto al normal y no se encontró expresión de CD14 sobre los monocitos de la paciente.

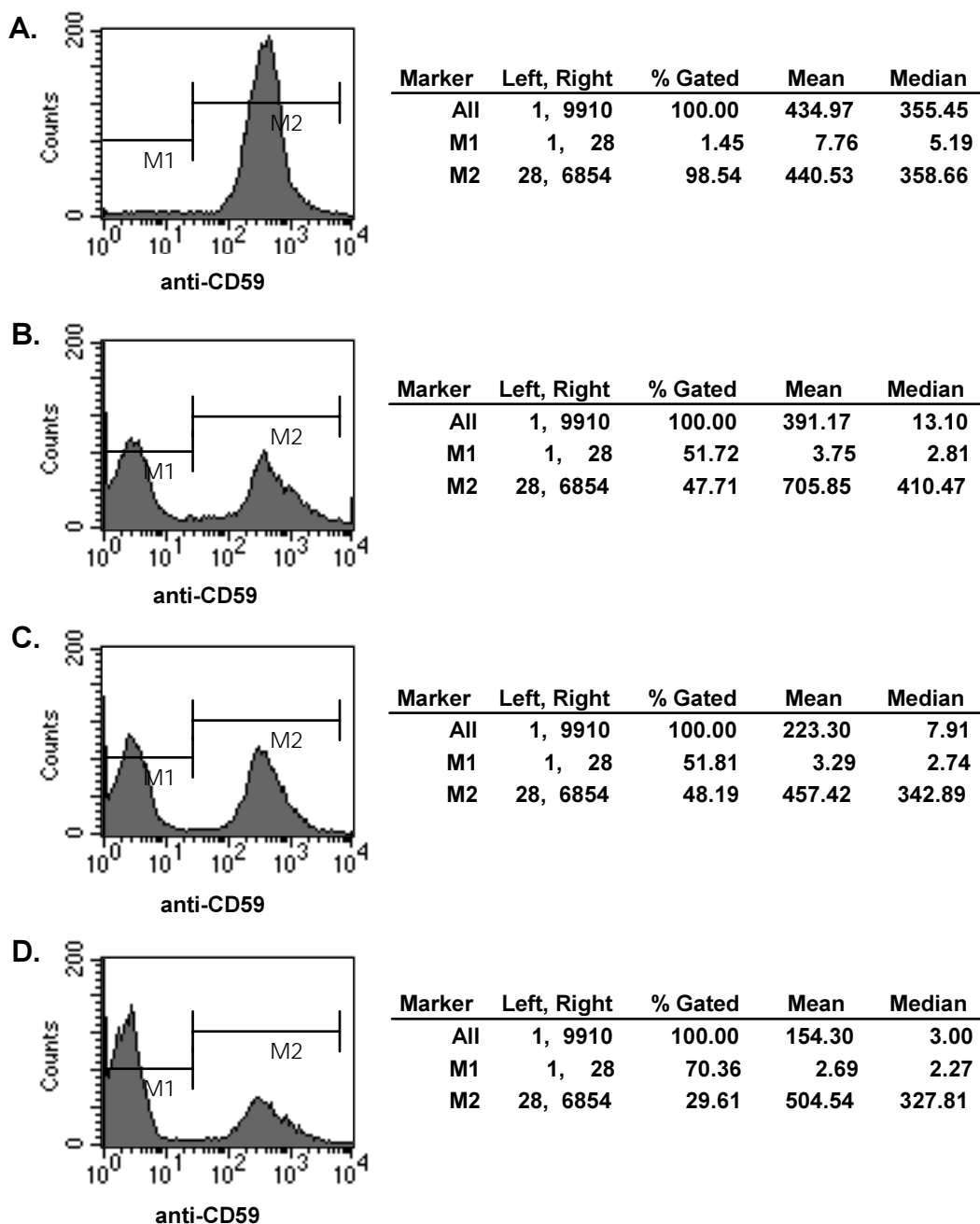


Fig. 2.— Histogramas de fluorescencia para CD59 sobre eritrocitos. Los marcadores M1 y M2 corresponden a las poblaciones HPN III y HPN I respectivamente. A) eritrocitos normales. B, C, D) eritrocitos de la paciente los días 0, 7 y 24 respectivamente.

**Discusión**

Las pruebas de Ham<sup>6</sup> y Sacarosa<sup>7</sup> han sido utilizadas de rutina en los laboratorios para el diagnóstico de HPN ya que pueden detectar eritrocitos que presenten alta sensibilidad a la acción lítica del complemento, aunque no siempre la prueba de Ham es lo suficientemente sensible y no refleja la verdadera propor-

ción de células anormales. Por otra lado, la prueba de lisis por Sacarosa tiene un alto porcentaje de resultados positivos falsos. Rosse<sup>8,9</sup> definió tres poblaciones de eritrocitos de acuerdo a su sensibilidad a la acción lítica del complemento: HPN(I), células que reaccionan normalmente, HPN(III) células con una marcada sensibilidad y HPN(II), células de sensibilidad intermedia.

La citometría de flujo es una herramienta útil en el diagnóstico de la HPN. Esta técnica es indiscutiblemente más específica y más sensible que las pruebas tradicionales<sup>4, 10</sup> y permite, además, realizar evaluaciones cuantitativas.

En este estudio se analizó la evolución de un clon HPN durante una crisis hemolítica de una paciente con AA a los 0, 7 y 24 días, considerando día 0 cuando las pruebas de HAM y Sacarosa dieron positivas. El análisis se interrumpió ante el requerimiento de transfusión sanguínea (día 24).

Durante el seguimiento, se redujo el nivel de hemoglobina y también el recuento de eritrocitos; el volumen corpuscular medio (VCM) y los eritroblastos aumentaron y los reticulocitos permanecieron elevados. Estos resultados mostraron una respuesta eritropoyética compensatoria a la destrucción celular. Pudo observarse también un descenso gradual del recuento de leucocitos, especialmente de los neutrófilos.

Se ha demostrado que los pacientes con HPN tienen expresión deficiente de proteínas como el CD55 y el CD59<sup>11,12</sup> que utilizan el sistema del glicosilfosfatidilinositol como anclaje a la membrana. Ambas proteínas funcionan como protectoras de la acción lítica del complemento y están presentes en células de todos los linajes. Los estudios por citometría de flujo revelaron la deficiencia y permitieron cuantificar el porcentaje de células afectadas durante la crisis hemolítica. Al igual que en otros casos publicados<sup>13</sup>, la marcación con CD59 tuvo mejor resolución para distinguir la población negativa que la marcación con CD55. El descenso del CD16 sobre los granulocitos neutrófilos y la ausencia de CD14 en los monocitos reafirmaron el diagnóstico de HPN.

En esta paciente sólo se detectaron dos de las poblaciones de eritrocitos descritas por Rosse y col<sup>9</sup>: HPN(III) y HPN(I) con la marcación anti CD59. En el día 24, el porcentaje de células negativas se incrementó coincidiendo con el momento en el que la alteración de los parámetros del laboratorio fue mayor. Esto demostró buena correlación entre los datos hematológicos y los obtenidos por la citometría de flujo. Si bien no se pudieron precisar las causas que desencadenaron el episodio hemolítico, el comienzo de la crisis pudo estar asociado con una infección viral o bacteriana que indujo la activación del complemento<sup>14</sup>, y la médula ósea, en un intento de alcanzar un equilibrio, respondió principalmente con el incremento gradual del clon más afectado como mecanismo compensatorio.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Dra. María M. Bracco por sus comentarios sobre este caso. También se agradece a la Bqca Carolina Bayo y a la Srta Marta Filippo por su asistencia técnica. Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Fundación Argentina de la Hemofilia.

## Bibliografía

1. Rosse W. The glycolipid anchor of membrane surface proteins. *Semin Hematol* 1993; 30: 219-31.
2. Forés R, Alcocer M, Cabrera R, et al. Detección de clones NPH mediante citometría de flujo en anemia aplásica y hemoglobinuria paroxística nocturna. *Sangre* 1999; 44: 199-203.
3. Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Scrobohaci M, et al. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link. *Blood* 1995; 85: 1354-63.
4. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of Flow Cytometry to the Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42: 223-33.
5. Fujioka S, Yamada T. Varying populations of CD59-negative, partly positive, and normally positive blood cells in different cell lineages in peripheral blood of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria patients. *Am J Hematol* 1994; 45: 122-7.
6. 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.
7. Stratton F, Evans DIK. Lysis of PHN cells in solutions of low ionic strength. *Br J Haematol* 1967; 13: 862-7.
8. Rosse W, Dacie J. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. 1. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966; 45: 736-48.
9. Rosse WF, Adams JP, Thorpe AM. The population of cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis: significance and mechanism of increased immune lysis. *Br J Haematol* 1974; 28: 181-90.
10. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 5332-40.
11. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80: 5066-70.
12. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1990; 323: 1184-9.
13. Rotoli B, Bessler M, Alfinito F, del Vecchio L. Membrane proteins in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. *Blood Rev* 1993; 7: 75-86.
14. Nakakuma H, Hidaka M, Nagakura S, et al. Expression of cryptantigen Th on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes in association with a hemolytic exacerbation. *J Clin Invest* 1995; 96: 201-6.

-----

Para lograr la felicidad es condición indispensable saber adaptarse a los tiempos.