

HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA (H P N)

1- INTRODUCCION

La Hemoglobinuria paroxística nocturna ha sido considerada una anemia hemolítica de causa intracorpuscular y predominio intravascular. Pero hoy en día, se sabe que es algo mucho más complejo y se incluye dentro de los procesos denominados “panmielopatías clonales”. Se trata de un defecto adquirido de la célula madre pluripotencial de la médula ósea, que se transmitirá a las células que de ella descendán, dando lugar al clon anormal característico de la entidad. Este clon puede surgir de una médula previamente dañada (lo que es más común) o de una médula normal (es decir, cariotipo normal).

La HPN o síndrome de Marchiafava Michelle, fue descrita inicialmente por William Gull en 1866, en Londres (Inglaterra) (1). Le corresponde el mérito de haber descrito que el pigmento excretado en orina no correspondía a glóbulos rojos.

En 1882 Paul Strübing comunicó la siguiente descripción de la HPN (2). Sus observaciones clínicas fueron tan precisas que los conceptos emanados de ella son válidos hasta nuestros tiempos.

Strübing describió la asociación entre la hemoglobinuria y el ejercicio físico; propuso que la anormalidad residía en los glóbulos rojos, que al circular por los riñones sufrían hemólisis. Fue el primero en describir la asociación entre la administración de hierro y la crisis de hemólisis, e interpretó este fenómeno como secundario a la producción de nuevas células anormales, “explicación racionalmente aceptada en 1999 “.

Aunque no existieron méritos mayores en la descripción de la HPN en los trabajos de Marchiafava y Michelli en 1911 y 1931, sus nombres han sido utilizados como epónimo 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 en si, hemoglobinuria paroxística nocturna, es controvertido en cuanto a la definición que implica. Es decir, el nombre parece equivocado ya que la hemoglobinuria habitualmente no es nocturna y sólo es uno de los signos asociados a la HPN. Por otro lado, el nombre de HPN no define otras manifestaciones diferentes a la hemoglobinuria macroscópica, que común y frecuentemente forman parte de la enfermedad. Es lógico proponer que la HPN no deba ser considerada exclusivamente como una anemia hemolítica, ya que la hemólisis es sólo un evento asociado a la enfermedad. El nombre de HPN fue establecido en 1928 por Enneking (3) y a pesar de que esta nomenclatura en la actualidad no es representativa de la enfermedad, es el nombre que se utiliza en la literatura mundial.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Dar a conocer una enfermedad poco frecuente; enmarcada dentro de la Federación de Asociaciones de Enfermedades Raras (FEDER) y en la European Organization for rare disorders (EURODIS).

2.2.- Conocer los signos y síntomas de la HPN, cuyo diagnóstico tardío significa poner en situaciones críticas a estos pacientes por las expresiones clínicas que padecen.

2.1.-Definición.-

La HPN es una enfermedad clonal y 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) y codifica una proteína involucrada en la síntesis del Glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual le sirve como anclaje a muchas proteínas de la membrana celular. La mutación ocurre en el stem cell hematopoyético y da lugar a una 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. Está caracterizada por anemia hemolítica crónica intravascular, hemoglobinuria, hipercoagulabilidad, citopenia debido al fallo de la médula ósea, trombosis y raramente transformación leucémica (4).

Afecta a los dos sexos a cualquier edad, aunque es más frecuente en adultos del sexo femenino entre los 30 y 40 años. Su incidencia es de aproximadamente 1/ 100.000.

Fisiopatología.-

El mecanismo de la hemólisis parece ser la activación incontrolada del complemento en la superficie de los glóbulos rojos anormales por la marcada reducción o ausencia de proteínas de membrana reguladoras que protegen a la célula contra la lisis mediada por complemento (5).

La ausencia de estas proteínas en la HPN explica algunos de los síntomas clínicos de la enfermedad, pero no el mecanismo mediante el cual el clon HPN se expande en la médula ósea.

Una posible forma de ver la fisiopatología de la HPN es que ésta resulta precisamente de la coexistencia de dos factores: el fallo de la médula ósea normal, con una mutación somática del gen PIG-A. Cuando ambos factores ocurren en el mismo

individuo, el clon HPN puede proliferar y el cuadro clínico de la enfermedad se hace evidente. Esta es la llamada teoría de la PATOGENESIS DUAL para el desarrollo de la HPN (6, 7). Este clon anormal puede tener alguna ventaja proliferativa sobre el clon de las células normales y hacerse dominante en la médula de estos pacientes (8).

Otra hipótesis, es la teoría de la ventaja relativa del crecimiento o TEORIA DE ESCAPE (9), la cual se basa en el concepto de que la expansión del clon HPN depende de la existencia de uno o más factores ambientales adicionales externos, los cuales ejercen una presión selectiva a favor del clon HPN.

Deficiencia de la expresión de las proteínas de membrana

Los primeros defectos observados en la superficie de las células sanguíneas maduras en esta enfermedad fueron la disminución de la acetil colinesterasa en los hematíes y de la fosfatasa alcalina en los leucocitos.

En la actualidad ya son más de 20 las proteínas de membrana cuya expresión se ha encontrado disminuida o ausente (10), pero solo tienen trascendencia clínica las siguientes:

1.- Factor acelerador de la degradación (DAF, CD55) (11), proteína integral de la membrana que interviene en el control de la activación del complemento en la superficie celular. Por lo tanto el DAF protege a las células autólogas normales del ataque complementario. Su ausencia se vincula con la mayor fijación del complemento por parte de las células.

2.- Inhibidor de la Lisis Reactiva de la Membrana (ILRM, CD59) (11), es otro factor escaso en la HPN, más importante que el DAF en la protección del eritrocito de la acción lítica del complemento. Además, al añadir ILRM a las células HPN, parece revertir el defecto. Estas observaciones sugieren que en la patogenia de la HPN la proteína de control del complemento más importante es el ILRM.

3.- CD16 (Receptor Fc γ III a) (12). Esta proteína que se expresa en la superficie de los neutrófilos, se une con la porción Fc de la molécula de IgG, preparándolos para la fagocitosis. En los neutrófilos, el mayor receptor de IgG es el Fc γ IIIa unido a la membrana por el GPI, el cual está ausente en los neutrófilos en la HPN, lo que puede contribuir a la susceptibilidad de estos pacientes a las infecciones.

4.- Receptor Activador del Plasminógeno tipo Uroquinasa (uPAR) (13). Se une con la enzima proteolítica uroquinasa que activa el plasminógeno a plasmina e inicia la fibrinólisis, la cual se ve seriamente afectada cuando esta proteína se encuentra muy disminuida o ausente, favoreciendo los fenómenos trombóticos.

5.- CDw52 (campath-1) (12). Localizado en linfocitos, monocitos y neutrófilos, es el responsable de la activación linfocitaria T por la vía CD2. La reacción de este antígeno, que resulta ser una proteína de membrana, con Ac anti CD52, da lugar a la activación del complemento, y por lo tanto, a la lisis de la célula. Esto ha permitido el uso de este

anticuerpo para la depleción linfocitaria en las enfermedades autoinmunes, los linfomas y en la enfermedad injerto contra huésped. Esta molécula está ausente en las células HPN.

6.- Factor de Restricción Homóloga / C8bp (14). Es una proteína integral de la membrana que opera por unión con el C8 y demuestra la restricción de la especie, o sea, lo poco eficiente de la lisis cuando el complemento y las células objetivo pertenecen a la misma especie. En la HPN esta restricción desaparece.

Las células HPN no poseen factor de restricción homólogo / C8bp (15).

Todo lo anteriormente expuesto indica que la expresión clínica de la enfermedad depende del tipo de proteína de membrana que falta y del grado de alteración de su función.

Sensibilidad a la Lisis Mediana por Complemento.-

La hemólisis de la HPN deriva de una alteración intrínseca de los glóbulos rojos (16). En los pacientes con HPN, la supervivencia de las células indemnes es normal, mientras que la de las células comprometidas se acorta. La destrucción de los eritrocitos es prematura, porque son muy susceptibles a la lisis mediada por complemento. No obstante, la sensibilidad de todos los glóbulos rojos no es igual (17). Por medio de test especiales in vitro (HAM y SUCROSA), que cuantifican la sensibilidad del eritrocito a la lisis mediada por complemento, pueden ser identificados 3 fenotipos diferentes de eritrocitos HPN: uno de los fenotipos (HPN I) está caracterizado por sensibilidad normal o casi normal al complemento, mientras que el fenotipo (HPN III) es de 15 a 20 veces más susceptible a la lisis, y un tercer fenotipo (HPN II) es de sensibilidad intermedia, de 3 a 5 veces mayor que en las células normales. El 78% de los pacientes con HPN exhiben una mezcla de células HPN I y III (18). Esto constituye lo que se denomina mosaicismos fenotípicos, descrito por Rosse y Dacie en 1966 y confirmado en 1973 (4).

Esta variedad en la sensibilidad a la lisis entre los diferentes fenotipos, también se explica por las diferencias cuantitativas en la expresión del DAF y el ILRM. Las células HPN III son completamente deficientes en DAF e ILRM, las células HPN II son parcialmente deficientes, y las células HPN I no tienen deficiencia en ninguna de las 2 proteínas reguladoras (11).

2.2.- MANIFESTACIONES CLINICAS

El comienzo de la HPN suele ser insidioso y la evolución tiende a ser prolongada y variable. El patrón “clásico” de HPN se caracteriza por episodios de hemólisis intravascular que puede ser desde apenas detectable hasta masiva con requerimientos transfusionales y hemoglobinuria, que ocurren sobre todo asociados con el sueño y con una periodicidad irregular.

Al principio, el paciente refiere astenia, coloración amarillenta de la piel y otros síntomas de hemólisis crónica sin hemoglobinuria obvia. A menudo la identificación correcta de la enfermedad se demora entre 2 y 3 años.

FALLO DE MEDULA OSEA

Aunque todos los pacientes con HPN tienen elementos de fallo de médula ósea (BFM), este es obviamente diferente de la anemia aplásica por sus características clínicas prominentes (hemólisis y trombosis).

ANEMIA HEMOLITICA / HEMOGLOBINURIA

Se debe a la acción del complemento activado por el defecto al menos de 2 proteínas de la membrana eritrocitaria (CD55 y CD59). De estas, la ausencia de CD59 es la más importante. La anemia aparece de forma brusca, con dolor lumbar, ictericia y hemoglobinuria. Su intensidad depende de 3 factores:

A) La proporción de eritrocitos anormales (23): La proporción de glóbulos rojos en la circulación sensibles al complemento pueden variar de 1 a más del 90%. Pacientes con menos del 20% de células anormales raramente tienen hemoglobinuria, pero casi siempre tienen evidencia de hemólisis y hemosiderinuria.

B) La anormalidad de las células (23): La intensidad de la hemólisis se vincula con el tamaño de la población HPN III. Cuando estas constituyen menos del 20%, es indetectable o leve. Si alcanzan del 20 al 50% la hemoglobinuria es episódica y si superan el 50% es constante. Las células HPN II aún en niveles elevados provocan enfermedad leve y hemoglobinuria mínima o nula.

C) El grado de activación del complemento (23): células normales en la HPN pueden ser lisadas por el complemento, siempre y cuando este sea activado en otras células o en el plasma. La hemólisis es más activa cuando el complemento es activado por infecciones virales o bacterianas (particularmente las gastrointestinales). La hemólisis nocturna se ha atribuido a la absorción de endotoxinas (un potente activador de la vía alternativa del complemento en el tracto gastrointestinal) (8) durante la noche.

La anemia hemolítica se acompaña de neutropenia y trombocitopenia en alrededor del 15% de los pacientes, lo que constituye el patrón “hipoplástico” de la HPN. Las complicaciones trombóticas pueden presentarse tanto en el patrón “clásico” de la enfermedad como el “hipoplástico”. En el 15 y 20% de los pacientes con HPN, se presentan con un fallo de médula ósea caracterizado por pancitopenia moderada o severa, una doble población de glóbulos rojos y la presencia de anemia hemolítica, que constituye el síndrome anemia aplásica/HPN descrito por Dacie y Lewis en 1967 (24).

HEMOGLOBINURIA

Está presente en la cuarta parte de los enfermos y la mayoría no presentan exacerbaciones nocturnas; cuando esto ocurre, se debe al incremento de la hemólisis durante el sueño, si el paciente permanece despierto de noche y duerme de día, el ritmo se invierte (25), por lo tanto, no se relacionan con el horario. En pacientes con hemoglobinuria nocturna la orina es usualmente oscura al levantarse y aclara durante el día. Sin embargo, cuando la hemólisis es intensa, la hemoglobinuria puede persistir durante todo el día. Se plantea que la retención de CO₂ con descenso del Ph plasmático es suficiente para activar la vía alternativa del complemento.(4)

TROMBOSIS

El tromboembolismo venoso es una de las complicaciones más temidas en la HPN y junto a los episodios hemorrágicos son responsables de un 50% de la mortalidad por esta enfermedad (26). Se presenta entre el 12 y el 40% de los casos. Representa el mayor factor pronóstico negativo; la mayoría de las trombosis intraabdominales, principalmente de las venas hepática y mesentérica (27). La localización más frecuente y grave es la trombosis de la vena hepática o síndrome de BUDD-CHIARI (16), el cual se presenta entre el 15 y 30% de los pacientes con HPN. Frecuentemente ocurre durante una crisis hemolítica, surgiendo que la activación del complemento es responsable de ambos. Otras veces es más gradual e insidioso. La patogénesis de estos eventos trombóticos aún no está clara (17). Se plantean 3 clases de mecanismos: a) el deterioro de la fibrinólisis, b) la hiperactividad de las plaquetas y c) la hipercoagulabilidad. Estos 3 factores desempeñan un papel muy importante en la producción del estado trombofílico en la HPN (16).

INFECCIONES

Las infecciones son frecuentes y se atribuyen a defectos cuantitativos y/o cualitativos en linfocitos y leucocitos HPN, los que tienen una elevada sensibilidad a la lisis mediada por complemento y disminución en la expresión de proteínas de membrana, tales como el CD16 y CD55, lo que trae como resultado una actividad quimiotáctica y fagocítica pobre. Estos defectos funcionales, conjuntamente con el fallo de médula ósea que se produce, son los responsables de la susceptibilidad a las infecciones en la HPN (18).

HEMORRAGIAS

La trombocitopenia puede ser severa y las complicaciones hemorrágicas ocupan un lugar importante en el cuadro clínico de la HPN, por lo que constituye la segunda causa de muerte (26).

AFECTACIÓN DE LOS VASOS CUTÁNEOS

Lo más frecuente es la aparición de lesiones inflamatorias, dolorosas, hipopigmentadas, de un tamaño entre 5 - 10 cm sin localización específica. Pueden ser recurrentes aunque no siempre en la misma localización y algunas pueden ulcerarse posteriormente. En algunos casos se observan áreas de lesiones purpúricas. La trombosis venosa profunda o superficial ocurre con mayor frecuencia que en la población general aunque la muerte por tromboembolismo pulmonar tiene una baja incidencia.

EMBARAZO

En un estudio realizado en 38 gestantes con HPN se observó que sólo un tercio de los casos no presentó complicaciones (28). Es habitual que el embarazo no llegue a término.

COMPLICACIONES RENALES

En HPN estables se ha detectado disminución del aclaramiento de creatinina, hipertensión arterial (HTA), hematuria, proteinuria, e incapacidad para concentrar la orina. Puede producirse insuficiencia renal aguda (IRA) como complicación de la hemoglobinuria que precise hemodiálisis.

OTRAS MANIFESTACIONES CLINICAS

Disfagia producida por el desarrollo de espasmos esofágicos durante los episodios de hemoglobinuria; los varones pueden presentar impotencia que puede ser permanente. Entre un 5 y un 9% de los pacientes con HPN asocian síndromes mielodisplásicos (29), anemia aplásica o evolucionan a leucemia aguda. La mediana de aparición de la leucemia es de 5 años, aunque el rango va desde pocos meses después del diagnóstico hasta 22 años después.

2.3.-DIAGNOSTICO

En general la anemia es grave, con cifras de hemoglobina inferiores a 5g/dl, la leucopenia y la trombocitopenia son comunes, aunque la sobrevida y la función plaquetaria son normales (19). Se constatan signos de hemólisis como: incremento de la cifra de reticulocitos, policromatofilia, elevación de la LDH, de la bilirrubina no conjugada y descenso de la cifra de haptoglobina.

Existe ferropenia por hemosiderinuria crónica, se mencionan pérdidas diarias de hierro de hasta 15'9 mg (18). En la médula ósea se observa hiperplasia normoblástica,

hipoplasia o aplasia global, según el grado de insuficiencia hematopoyética, pero en muchos casos la celularidad es normal.

A.- PRUEBAS SEROLOGICAS

El diagnóstico de la HPN se basa en pruebas serológicas especiales que detectan la sensibilidad de los glóbulos rojos a la lisis mediada por concentraciones mínimas de complemento. Varias de estas técnicas dependen de la activación de la vía alternativa del complemento.

1.- PRUEBA DE HAM (20): el fundamento de esta prueba lo constituye la susceptibilidad de los eritrocitos HPN a la lisis en suero humano acidificado; se considera la prueba diagnóstica cuando resulta positiva. Su eficacia es limitada, porque puede dar resultados falsos negativos por el efecto de transfusiones previas, y falsos positivos en la anemia diseritropoyética congénita tipo II o HEMPAS.

2.- PRUEBA DE LA SUCROSA (21): la base de esta prueba es la fijación del complemento mediante la disminución de la potencia iónica del medio ambiente, que provoca la hemólisis exagerada de los eritrocitos HPN. Este examen es sensible, pero poco específico.

3.- PRUEBA DE LA TROMBINA (Test de Crosby) (21): es más sensible, pero menos específica que la de Ham. Está basada en el incremento de la hemólisis que tiene lugar cuando se añade trombina a las células suspendidas en suero acidificado.

B.- TEST BASADO EN LA IDENTIFICACION DE LOS DEFECTOS PROTEICOS DE LA MEMBRANA CELULAR.

Hasta el momento, la demostración de glóbulos rojos y/o granulocitos carentes de proteínas de membrana ligadas al GPI mediante el uso de anticuerpos monoclonales (CD55 y CD59) y la CITOMETRIA DE FLUJO, es la mejor forma de diagnosticar la HPN. Este método es sensible y específico, y puede brindar información en cuanto a la proporción de poblaciones celulares anormales (22). Además la transfusión de hematíes no influye en los resultados al poderse estudiar los neutrófilos y monolitos.

EVOLUCION Y PRONÓSTICO

La evolución es heterogénea, con pacientes que fallecen pocos meses después del diagnóstico por alguna de las complicaciones descritas anteriormente, y otros que presentan un curso crónico ondulante debido al balance entre el clon patológico y la hematopoyesis residual.

La supervivencia mediana de la serie de 80 pacientes seguidos prospectivamente en el hospital Hammersmith (26) durante más de 40 años es de 10 años con un intervalo también de 10 años (0-48) entre el diagnóstico y el fallecimiento. Aproximadamente el 60% de las muertes se relacionaron con trombosis o fenómenos hemorrágicos secundarios a trombopenia severa. El 28% de los pacientes sobrevivieron más de 25 años. En esta serie no se describió ningún caso de leucemia aguda. También se observó una disminución de la gravedad de la enfermedad con el paso del tiempo, y algunos pacientes (15% en esta serie) presentaron una remisión clínica completa con negativización de la prueba de HAM. Una explicación para este fenómeno es que el clon afecto de HPN tiene una vida media finita, como las células somáticas normales. La recuperación hematopoyética dependerá de la presencia de células stem normales capaces de repoblar la médula ósea.

TRATAMIENTO

En la HPN se han utilizado diferentes métodos terapéuticos, pero con excepción del trasplante de médula ósea, ninguno se considera apropiado. Desde el punto de vista práctico, el tratamiento de la HPN se divide en 3 aspectos fundamentales:

- a) Corrección de la anemia
- b) Prevención y tratamiento de la trombosis
- c) Modificación de la hematopoyesis.

A.- CORRECCION DE LA ANEMIA

Consiste principalmente en terapia de soporte, incluyendo tratamiento con hierro y ácido fólico, así como transfusión de hemoderivados. Cuando se administra hierro puede desencadenarse un episodio hemolítico debido al aumento de producción de células de la clona HPN. La prevención de la hemólisis se realiza mediante la administración simultánea de prednisona o por supresión de la eritropoyesis mediante la transfusión de concentrados de hematíes. El efecto neto de la administración de hierro es beneficioso, disminuyendo los requerimientos transfusionales.

La prednisona es efectiva en un 60% de los pacientes ya que disminuye la activación del complemento. Algunos pacientes responden a derivados androgénicos que pueden estimular la hematopoyesis como el Danazol, la fluoximesterona y la oximetazona y pueden administrarse conjuntamente con la prednisona. Más recientemente se han utilizado citoquinas recombinantes como la eritropoyetina y el

factor estimulador de colonias granulocíticas (GSF-G), los que generalmente son poco efectivos y difíciles de administrar.

B.- PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA TROMBOSIS

La mayoría de los pacientes fallecen por complicaciones trombóticas y hemorrágicas, por lo que estas posibilidades deben manejarse con especial interés.

El uso de agentes fibrinolíticos (estreptoquinasa, uroquinasa , r-tPA) debe considerarse en pacientes con trombosis de grandes vasos si el trombo tiene menos de 3-4 días de evolución y no hay contraindicaciones. En los pacientes con síndrome de Budd-Chiari este manejo puede disminuir considerablemente la aparición de complicaciones a largo plazo(31). Sin embargo la fibrinólisis debe emplearse con precaución en fenómenos de trombosis venosa cerebral debido a la posibilidad de hemorragia a dicho nivel.

El siguiente paso en el manejo de la trombosis consiste en la instauración de tratamiento con heparina sódica utilizando las pautas habituales de dosificación y seguimiento. En raros casos, el empleo de heparina se ha relacionado con activación del complemento y agravamiento o desencadenamiento de episodios hemolíticos.

Por último, cabe destacar el papel de los anticoagulantes orales durante al menos 6 meses después del primer episodio, recomendándose en las recurrencias la anticoagulación indefinida.

Las situaciones de alto riesgo como inmovilización , infección o cirugía se asocian con una elevada incidencia de trombosis, por lo que se aconseja la profilaxis mediante la administración de heparina de bajo peso molecular.

C.- MODIFICACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

Tres formas de modificar la hematopoyesis se han utilizado en esta enfermedad: la estimulación con andrógenos, la inhibición linfocitaria; basándose en la suposición de que los linfocitos T modifican la hematopoyesis y pueden desempeñar un rol importante en su disminución , se ha administrado globulina antitimocítica (GAT) obtenida de equino a pacientes con anemia aplástica, y se ha obtenido un 60% de remisión.

Teniendo en cuenta las similitudes de la HPN y la anemia aplástica , a pacientes con deficiencia en la hematopoyesis se les ha administrado GAT (30), corrigiendo la citopenia en el 70% de los casos, principalmente de la trombocitopenia.

El trasplante de médula ósea (TMO) es el único tratamiento con intención curativa que puede ofrecerse a los enfermos con HPN. Hasta el momento, el trasplante ha sido limitado a pacientes con fallo de médula ósea con donante histocompatible. Por los buenos resultados obtenidos se ha comenzado a utilizar en niños en quienes el pronóstico es pobre y este proceder es salvador. Se ha visto la desaparición de las células HPN anormales en el trasplante singénico (de un gemelo idéntico) con régimen acondicionante previo con drogas inmunosupresoras y mieloablativas. En la actualidad,

los riesgos y costos del TMO en esta enfermedad superan los beneficios, excepto cuando la enfermedad pone en peligro la vida. Los pacientes gemelos idénticos podrían representar la excepción de esta generalización, porque en estas circunstancias, las complicaciones son escasas (16)

3.-MATERIAL Y METODOS

3.1.- Descripción de la Técnica.- Detección por citometría de flujo de la deficiencia en la membrana de los hematíes y de los granulocitos de ciertos marcadores dependientes del Glicosilfosfatidilinositol (PIG- anchoring proteins).

3.2.- Resultados del Estudio Realizado a 246 pacientes sospechosos de Indicación de la HPN.

3.1.1.- Materiales y Equipo empleados en el Estudio por Citometria de la HPN.-

- Solución de PFA (RL-ILP-02).
- Solución de PBS-BSA (RL-ILP-04)
- Solución de PBS (RL-ILP-06)
- Tubos ependorf
- Pipetas Pasteur
- Tubos de cristal de 10 ml sin anticoagulante
- Tubos de plástico con tapón verde de 10 ml
- Ficoll densidad 1077
- Pipeta para 10 y 25 ul
- Tubos de plástico adaptables al citómetro
- Solución FACS flow
- Centrífuga para tubos
- Anticuerpos Monoclonales:
 - Controles negativos IgG1 con fluorescencia y con ficoeritrina.
 - CD16 IgG1 con fluoresceína
 - CD55 IgG1 con ficoeritrina
 - Controles negativos IgG2 con fluoresceína y con ficoeritrina.
 - CD59 IgG2 con fluoresceína
 - CD HLA IgG2 con ficoeritrina.

3.1.2.- Descripción de la técnica empleada. Citometria de Flujo.-

3.1.2.1.-Preparación de los Granulocitos

El tubo de muestra del paciente debe ser un tubo de EDTA (extraído en el día). Utilizaremos otro tubo en las mismas condiciones de un testigo sano (generalmente un donante de sangre).

Separar sangre total de cada paciente y del testigo en un tubo de eppendorf para el estudio de los hematíes.

A continuación se aíslan los granulocitos con Ficoll y se fijan con PFA.

3.1.2.2.-Preparación de los Hematíes.-

Lavar Los hematíes dos veces con PBS-BSA centrifugándolos 5 minutos de 1200 a 1500 g.

Después del ultimo lavado, preparar una suspensión de hematíes al 5% poniendo una gota de hematíes y 19 de PBS. Mezclar bien.

3.1.2.3.-Realización de la Técnica.-

Confeccionar un listado de trabajo de HPN numerando todas las muestras que vayamos a analizar, haciendo generalmente cuatro series, dos para granulocitos del testigo y paciente y dos para los hematíes según esquema adjunto.

- 1.- Testigo gránulos + Controles negativos IgG1 Fluoresceína y ficoeritrina
- 2.- Testigo gránulos + CD16 y CD55
- 3.- Testigo gránulos + Controles negativos IgG2 fluoresceína y ficoeritrina
- 4.- Testigo gránulos + CD59 y CD HLA

- 5.- Paciente gránulos + Controles negativos IgG1 fluoresceína y ficoeritrina
- 6.- Paciente gránulos + CD16 y CD55
- 7.- Paciente gránulos + Controles negativos IgG2 fluoresceína y ficoeritrina
- 8.- Paciente gránulos + CD59 y CD HLA

- 9.- Testigo hematíes + Control negativo IgG1 ficoeritrina
- 10.-Testigo hematíes + CD55
- 11.-Testigo hematíes + Control negativo IgG2 fluoresceína
- 12.-Testigo hematíes + CD59

- 13.-Paciente hematíes + Control negativo IgG1 ficoeritrina
- 14.-Paciente hematíes + CD55
- 15.-Paciente hematíes + Control negativo IgG2 fluoresceína
- 16.-Paciente hematíes + CD59

En tubos de plástico que acoplen al citómetro se rotulan números sucesivos según el listado anterior.

A continuación dispensamos en el fondo de cada uno 10 ul de cada uno de los anticuerpos monoclonales y 25 ul de los gránulos o de los hematíes correspondientes. Incubar 30 minutos al abrigo de la luz y a temperatura ambiente. Añadir a cada tubo 1ml de PBS-BSA y centrifugar:

Los gránulos 7 minutos de 300 a 400g
Los hematíes 5 minutos de 1200 a 1500g

Decantar y agitar cada tubo y repetir el lavado dos veces más.

Una vez finalizado el tercer lavado secar al máximo posible los tubos sobre papel secante, agitarlos y añadir a cada tubo 400 ul de liquido Facs flow.

Guardar los tubos en el refrigerador hasta la lectura (generalmente en el mismo día de realización de la técnica) y posterior análisis e impresión de resultados .

3.1.2.4.- Documentos de Referencia y Relacionados.-

POE-ILP-02: Procedimiento de fijación de plaquetas y granulocitos con PFA
POE-ILP-07: Procedimiento para la lectura con el citómetro de flujo FACS-SCAN
POE-ILP-08: Análisis e interpretación de resultados del citómetro
POE-ILP-09: Procedimiento para el estudio de autoanticuerpos granulocitarios.

El estudio se realiza sobre un total de 246 pacientes en el periodo de tiempo comprendido de Enero del 2002 a Diciembre del 2006 en los que por distintas manifestaciones clínicas se sospecha la posible existencia de HPN.

RESULTADOS

TOTAL ESTUDIOS REALIZADOS: 246

NEGATIVOS: 232

POSITIVOS: 13

NO VALORABLES: 1

RESULTADOS ESTUDIOS SUGESTIVOS DE HPN

ESTUDIO 1

GRANULOCITOS:

CD59 (mac inhib): Doble población 88% células negativas.
CD16 (Fc R III): Disminuida

HEMATÍES

CD59 (mac Inhib): Doble población. 12% células negativas.

ESTUDIO 2

GRANULOCITOS

CD55: Doble población 25% de células negativas
CD59: Doble población 21% de células negativas.

HEMATÍES

CD59: Doble población 15% de hematíes negativos.

ESTUDIO 3

GRANULOCITOS

CD16 (Fc R III): Disminuido, población intermedia.

HEMATÍES

CD55 (DAF): doble población 26% de células negativas.
CD59 (mac inhib): doble población, 27% de células negativas.

ESTUDIO 4

GRANULOCITOS

CD16 (Fc R III): Disminuida en el 100%
CD55 (DAF) : Disminuida en el 100%
CD59 (mac inhib): Negativa el 100%
Conclusión en granulocitos: el 100% de los granulocitos estan afectados en mayor o menor grado.

HEMATÍES

CD55 (DAF): Doble población. Negativa el 76%.
CD59 (mac inhib): Doble población. Negativa el 72%.
Conclusión: Población afectada entre el 70 – 80%.

ESTUDIO 5

GRANULOCITOS

CD16 (Fc R III): Doble población celular. Negativa el 51%
CD55 (DAF): Doble población celular. Negativa el 34%

CD59 (mac inhib): Doble población celular. Negativa el 48%

HEMATÍES

CD55 (DAF): Doble población de hematíes. Negativa el 18%

CD59 (mac inhib): Doble población de hematíes. Negativa 7%

ESTUDIO 6

GRANULOCITOS

CD16 (Fc R III): Doble población. Negativa 60%

CD55 (DAF): Doble población. Negativa 60%

CD59 (mac inhib): Doble población. Negativa 58%

HEMATÍES

CD55 (DAF): Población Negativa 12%

CD59 (mac inhib): Población Negativa 3%

ESTUDIO 7

GRANULOCITOS

CD16 (Fc R III): Negativo 87%

CD55 (DAF): Negativo 100%

CD59 (Mac inhib): Negativo 100%

Conclusión en granulocitos: Población deficitaria mayor del 80%.

HEMATÍES

CD55 (DAF): Negativo 20%

CD59 (mac inhib): Negativo 23%

Conclusión en hematíes: Población deficitaria mayor del 20%

ESTUDIO 8

GRANULOCITOS

CD16 (Fc R III): Población Negativa 19%

CD55 (DAF): Población Negativa 20%

CD59 (mac. Inhib): Población Negativa 11%

HEMATÍES

CD55 (DAF): Población Negativa 27%

CD59 (mac inhib): Población Negativa 14%

ESTUDIO 9

GRANULOCITOS

CD16 (Fc R III): Doble Población. Negativa 28%

CD55 (DAF): Doble población. Negativa 27%

CD59 (mac inhib): Doble Población. Negativa 29%

HEMATÍES

CD55 (DAF): Doble Población. Negativa 7%

CD59 (mac inhib): Doble Población. Negativa 7%

ESTUDIO 10

MARCADORES HPN EN GRANULOCITOS

Receptor CD16: Negativo 94%

Receptor CD55: Negativo 89%

Receptor CD59: Negativo 93%

ESTUDIO 11

GRANULOCITOS

Receptor CD16: Negativo 91%

Receptor CD55: Negativo 90%

Receptor CD59: Negativo 87%

Conclusión: Prácticamente todas las células están afectadas.

HEMATÍES

Receptor CD55: Doble población. Negativa 32%

Receptor CD59: Doble población. Negativa 25%

ESTUDIO 12

MARCADORES HPN EN HEMATÍES

Receptor CD55: Negativo 78%

Receptor CD59: Negativo 41%

ESTUDIO 13

MARCADORES HPN EN HEMATÍES

Receptor CD55: Doble población. Negativa 21%

Receptor CD59: Doble población. Negativa 38%

ESTUDIO 14

MARCADORES HPN EN HEMATÍES

Receptor CD55: Doble población. Población Negativa 9% (Testigo 7%).

Receptor CD59: Doble población. Población Negativa 3% (Testigo 0%).

Conclusión: No Valorable.

Se precisa el estudio en granulosa ya que las alteraciones que vemos en hematíes no son significativas para el diagnóstico.

4.-CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio nos confirman que la HPN es una enfermedad poco frecuente (13 casos positivos en un periodo de 5 años) y que su incidencia es aproximadamente la de 1/100.000; así como que aparece en ambos sexos a cualquier edad, siendo algo más frecuente en mujeres entre los 30 y 40 años.

El conocimiento de que en la HPN existe una ausencia o disminución en la expresión de proteínas de membrana relacionadas con GFI, dio lugar al desarrollo de un método sencillo de detección de estas proteínas mediante anticuerpos monoclonales y citometría de flujo con una mayor sensibilidad y especificidad que progresivamente está sustituyendo a las pruebas clásicas.

El test basado en la identificación de los defectos proteicos de la membrana celular, es la mejor forma de diagnóstico de la HPN y nos brinda información en cuanto a la proporción de poblaciones celulares anormales.

Que la HPN debe considerarse en cualquier paciente que presente:

Signos de hemólisis intravascular de etiología no precisada, sobre todo cuando se acompaña de hemoglobinuria.

Pancitopenia asociada con hemólisis.

Deficits de hierro, persistentes e inexplicables.

Trombosis venosas recurrentes, sobre todo abdominales cuando acontece en personas jóvenes sin ninguna otra alteración que justifique la tendencia a la hipercoagulabilidad.

Episodios reiterados de dolor abdominal, lumbalgia, o cefaleas en individuos con hemólisis crónica.

Tras la clonación del gen PIG-A responsable de la alteración en la clona HPN, la terapia génica parece desempeñar un importante papel, aunque es necesario considerar que el mecanismo que posibilita la expansión de la clona de células HPN no es del todo conocido.

Finalmente, el mejor entendimiento acerca de la fisiopatología y el monitoreo cuidadoso de los pacientes con deficiencia en la expresión de las proteínas ligadas al GPI, posibilitará la predicción de un pronóstico individual, y de esa forma, facilitará la decisión terapéutica más adecuada.

5.- BIBLIOGRAFÍA.-

5.1.-Direcciones de Interés

FEDERACION ESPAÑOLA DE ASOCIACIONES DE ENFERMEDADES RARAS (FEDER).

Domicilio: c/ Enrique Marco Dorta, 6 local.

Localidad: 41018 Sevilla

Teléfono: 954 98 98 92

FAX: 954 98 98 93

Correo-e: f.e.d.e.r@teleline.es

Información y contacto: 902 18 17 25 / info@enfermedades-raras.org

WEB: <http://www.enfermedades-raras.org/es/default.htm>

EUROPEAN ORGANIZATION FOR RARE DISORDERS (EURORDIS)

Domicilio: Plateforme Maladies Rares 102, Rue Didot

Localidad: 75014 Paris

Teléfono: 00 33 1 56 53 53 40

FAX: 00 33 1 56 53 52 15

Correo-e: eurordis@eurordis.org

WEB: <http://www.eurordis.org>

5.2.- Referencias

- 1.- Gull W W. A cose if intermittent haematuria. Guys Hosp. Rep 1866; 13:381-92.
- 2.- Strubing P. Paroxysmal haemoglobinuria. Dtsch Med Wochenschr 1882; 8:1-17.
- 3.- Rosse W.F. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Present status and future prospects. West J Med 1980; 132:219-28.
- 4.- Parker CJ, Richard-Lee G. Paroxysmal Nocturnal haemoglobinuria. Eds Wintrobe clinical Hematology. 10 ed Baltimore: Williams and Wilkins; 1999. p: 1264-86.
- 5.- Davitz MA, Low HG, Nussenzweig V. Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol specific phospholipase C (PIPLC). J Exp Med 1996; 163:1150-61.
- 6.-Luzzato L, Bessler M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Curr Opin Hematol 1996; 3: 101-10.
- 7.- Johnson RJ, Hillmen. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Mol Pathol 2002; 55: 145-52.
- 8.- Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. En: Hoffman R, Benz EJ, Shatill SJ, Furie B, Cohen HJ, Silbertein E, Mc Glave P. Hematology: Basic principles and practice. 3ed USD: Churchill Livingstone; 2000. p 331-442.
- 9.-Rosti V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Haematologica 2000, 85: 82-9.
- 10.- Nicholson-Weller A. Decay accelerating factor. Curr Top Microbiol Immunol 1992; 178: 7-30.
- 11.- Holguin MH, Parker CJ. Membrane inhibitor of reactive lysis. Curr Top Microbiol Immunol 1992; 178: 61-85.
- 12.- Wendel FR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. Medicine 1997; 76: 63-85.
- 13.- Plough M, Plesner T, Rone E. The receptor for Urokinase-Type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with PHN. Blood 1992; 79:1447-55.
- 14.- Zalman LS. Homologous restriction factor. Curr Top Microbiol Immunol 1992; 178:87-99.
- 15.- Zalman LS, Wood LM, Frank MM, Muller-Eberhard HJ. Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. J Exp Med 1987; 165-572.
- 16.- Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Hematology 2000; 18:82-7.
- 17.- Meletis J, Terpos E. Paroxysmal nocturnal Hemoglobinuria: clinical presentation and association with other haematological disorders. Haema 2001; 4: 79-88.
- 18.-Richard-Lee G. Hemoglobinuria paroxistica nocturna. En: Wintrobe Hematologia clinica. 9 ed, Inter.-medicos S.A.I.C.I; 1994; p 1072-83.
- 19.- Gadner FH, Murphy S. Granulocyte and platelet functions in HPN. Ser Haematol 1967; 5: 78-80.
- 20.- Wilcox LA, Ezzell JL, Bernshaw NJ, Parker CJ. Molecular basis for the enhanced susceptibility of the erythrocytes of HPN to hemolysis in acidified serum. Blood 1991; 78:820-9.
- 21.- Hartmann RC. Diagnostic Specificity of sucrose hemolysis test for HPN. Blood 1970; 35:462-4.

- 22.- Hall S, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow citometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 5332-6.
- 23.-Murakami Y, Kinoshita T, Maeda Y. Different roles of glycosyl phosphatidylinositol in various hematopoietic cells as revealed by a mouse model of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood* 1999; 94:2963-70.
- 24.-Lewis SM, Dacie JV. The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br J Haematol* 1967; 13:236-51.
- 25.- Rosenfeld SL, Jenkins DE, Leddy JP. Enhanced reactive lysis of HPN erythrocytes by C 569 does not involve increase C7 binding or cell-bound C3b. *J Immunol* 1995; 134: 506-10.
- 26.- Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253-1258.
- 27.- Ray JG, Burow RF, Ginsberg JS, Burrow EA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis: review and nonpregnant patient. *Haemostasis* 2000; 30: 103-17.
- 28.- De Gramont A, Krulik M, Debray L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and pregnancy. *Lancet* 1987; 1868.
- 29.- Socie G, Mary JY, De Gramont A, Rio B, Leponier M, Rose C, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long Term Follow-up and prognosis factors. *Lancet* 1996; 348: 573-577.
- 30.- Sanchez E, Morales MR, Gomez E. Treatment of HPN with antilymphocytic globulin. *Rev Invest clin* 1993; 45: 457-9.
- 31.- Mc Mullin MF, Hillmen P, Jackson J, Ganly P, Luzzatto L. Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in HPN. *J. Int Med* 1994; 235: 85-89.

Autor Vicente Luis Dolz Sanchis
Febrero 2007