



6^o CURSO PRÁCTICO
CITOMETRÍA
DE **FLUJO**

ACTUALIZACIÓN EN NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS Y RELEVANCIA
DE LAS POBLACIONES
RESIDUALES NO TUMORALES

Peculiaridades del estudio inmunofenotípico en HPN

Amparo Sempere Talens

Laboratorio de Citometría de Flujo

Servicio de Hematología y Hemoterapia

Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, España

Contenido



- Punto de partida
- Citometría de flujo en hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
 - Poblaciones leucocitarias
 - Clon eritroide: “el gran olvidado”
- Monitorización de células HPN: ¿Tenemos algo nuevo?
- Casos clínicos peculiares
- Conclusiones

Contenido



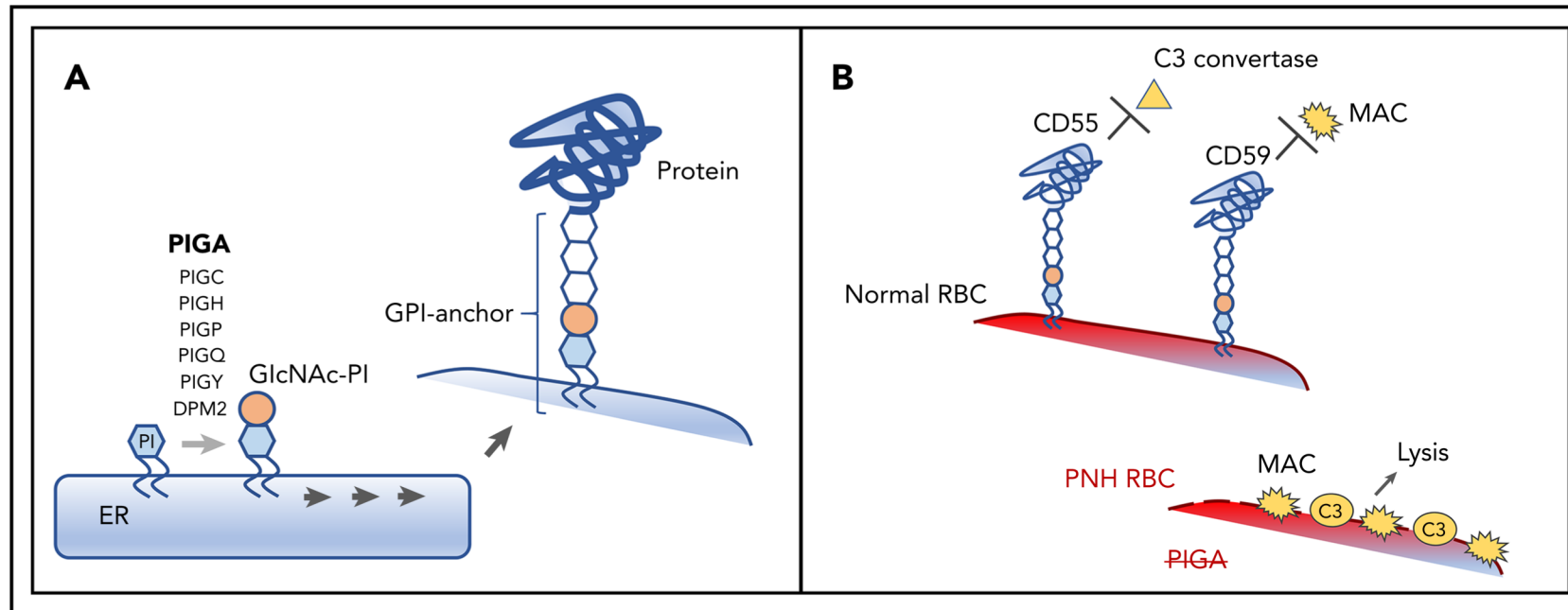
- Punto de partida
- Citometría de flujo en hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
 - Poblaciones leucocitarias
 - Clon eritroide: “el gran olvidado”
- Monitorización de células HPN: ¿Tenemos algo nuevo?
- Casos clínicos peculiares
- Conclusiones

Punto de partida

HPN: Fisiopatología

Hematopoyesis clonal “benigna” adquirida

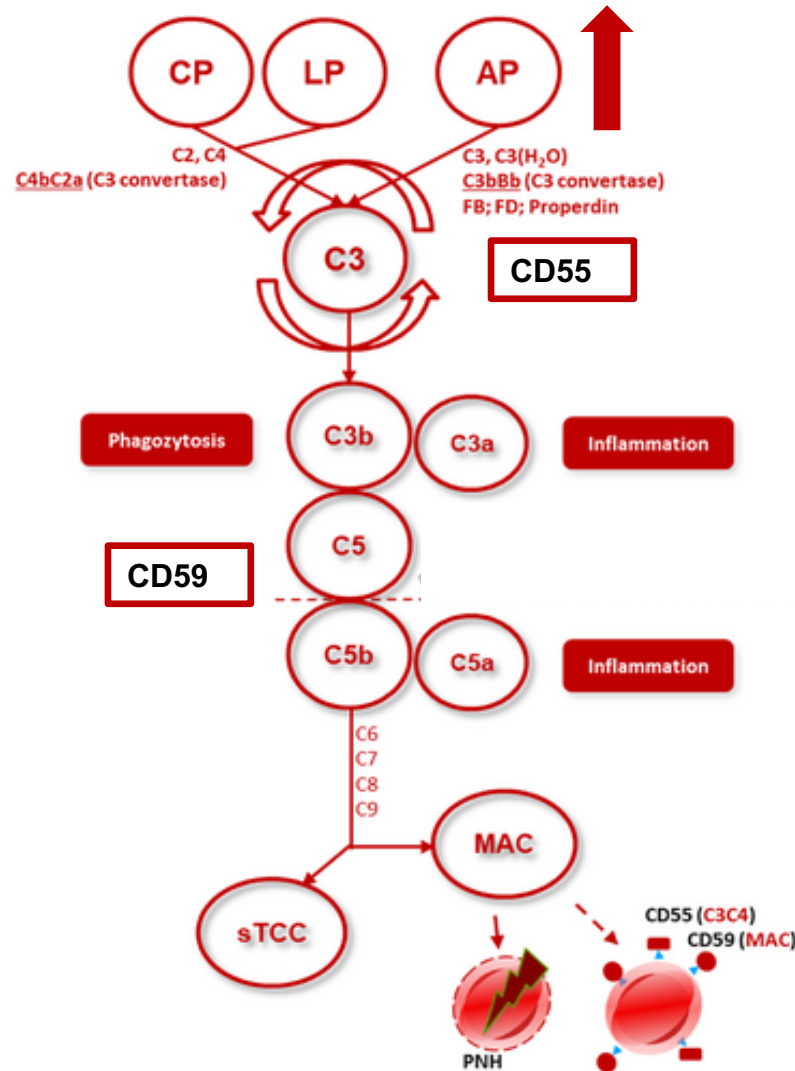
- Mutación somática en el gen fosfatidilinositol glucano de clase A (*PIGA*)
- Síntesis inadecuada de moléculas de anclaje de glicosidil-fosfatidil-inositol (GPI)
- Deficiencia total o parcial de la expresión de proteínas ancladas mediante GPI a la membrana de células hematopoyéticas
- Deficiencia de CD55 y CD59: actividad incontrolada del complemento



HPN: déficit parcial o total de CD55 y CD59

Activación incontrolada del complemento

- Los hematíes normales están protegidos de la hemólisis extravascular dependiente de C3 y de la hemólisis intravascular mediada por MAC por CD55 y CD59 respectivamente



Actividad proximal: CD55

Hemólisis extravascular

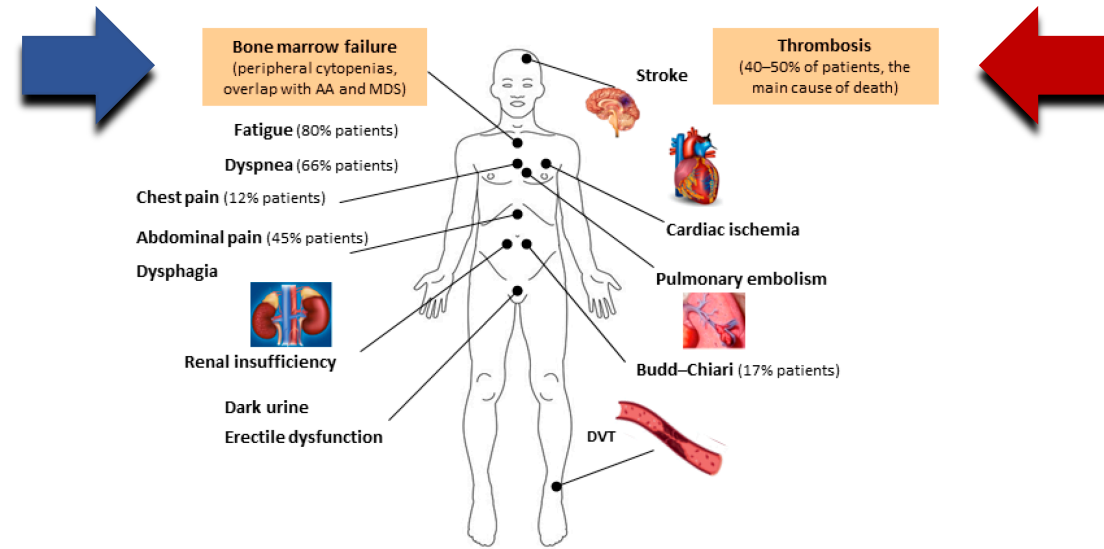
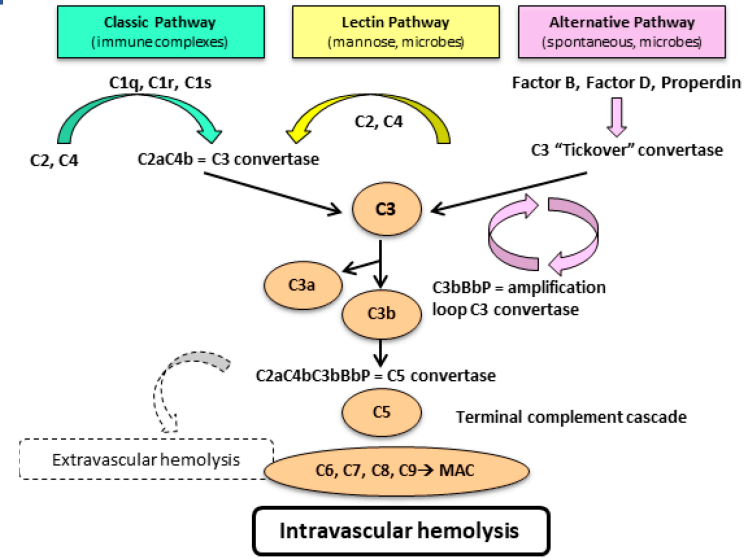
Actividad terminal: CD59

Hemólisis intravascular crónica

- Conocer la eficacia del bloqueo del complemento proporciona información sobre el nivel de control de la enfermedad y puede ayudar en el manejo de los pacientes

Manifestaciones clínicas en HPN

- La **hemólisis intravascular crónica** condiciona la mayoría de manifestaciones clínicas de la enfermedad
- Un **grado variable de fracaso medular** es observado al inicio o durante la evolución en los pacientes con HPN
- En **≥ 50%** de los pacientes con AM se identifican al diagnóstico células de HPN
- Los **clones de HPN pueden expandirse** rápidamente y progresar a HPN hemolítica
- La detección de células HPN en pacientes con SIM permite identificar grupos con **posibilidades terapéuticas específicas**

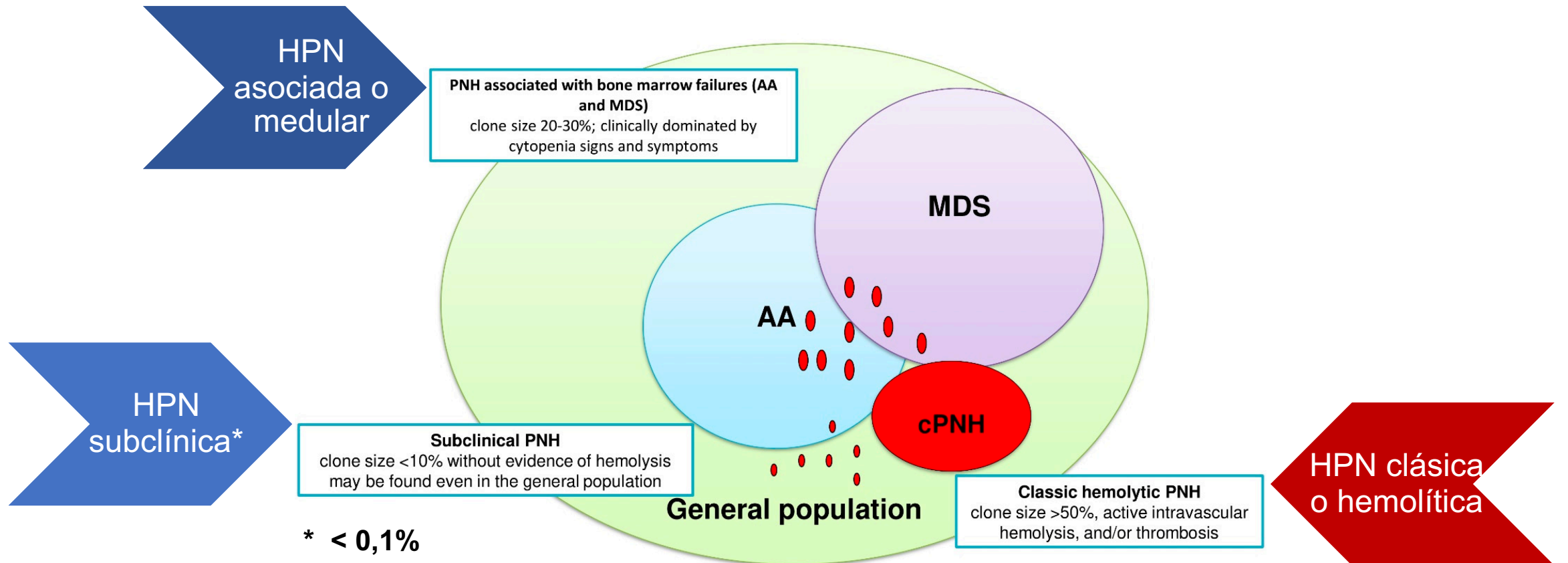


AM: aplasia medular adquirida; SIM: síndromes de insuficiencia medular

Clasificación de la HPN: subtipos clínicos¹

Presentación clínica y tamaño del clon HPN

Cuanto más alta sea la proporción de células HPN del paciente, mayor será la posibilidad de que tenga síntomas de la enfermedad



AA: Aplastic Anemia; MDS: myelodysplastic syndromes

Diagnóstico en HPN

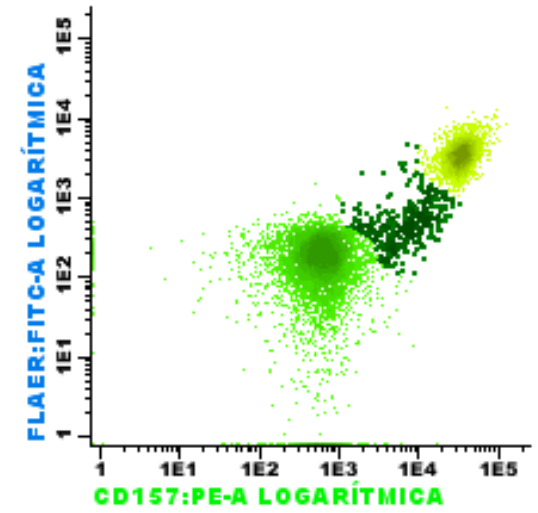
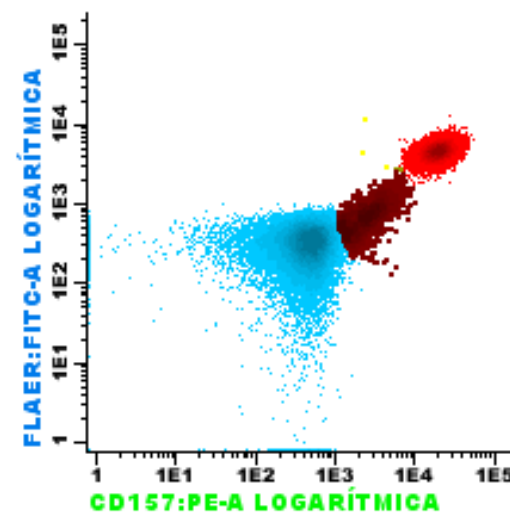
Requisitos necesarios



Sospecha clínica



Confirmación diagnóstica
CMF en SP:
Detección de células de HPN



CMF: citometría de flujo. SP: sangre periférica

Indicaciones del estudio de citometría

Diagnóstico y monitorización de células con fenotipo HPN

Indicaciones clínicas del estudio de citometría de flujo en HPN

Sospecha clínica diagnóstica

1. Pacientes con hemólisis intravascular crónica con elevación de LDH, haptoglobina baja, prueba de antiglobulina directa negativa, hemoglobinuria o disfunción renal
2. Trombosis (venosa o arterial) de localización inusual, especialmente en pacientes jóvenes con signos de hemólisis y/o citopenia
3. Disfagia, dolor abdominal o disfunción eréctil de etiología no identificada, con evidencia de hemólisis o citopenias
4. Pacientes con deficiencia de hierro y signos de hemólisis sin causa conocida
5. Síndromes de insuficiencia medular: confirmación o sospecha diagnóstica de aplasia medular; síndrome mielodisplásico especialmente hipoplásico o con hemólisis
6. Citopenia inexplicable idiopática y mantenida de significado incierto

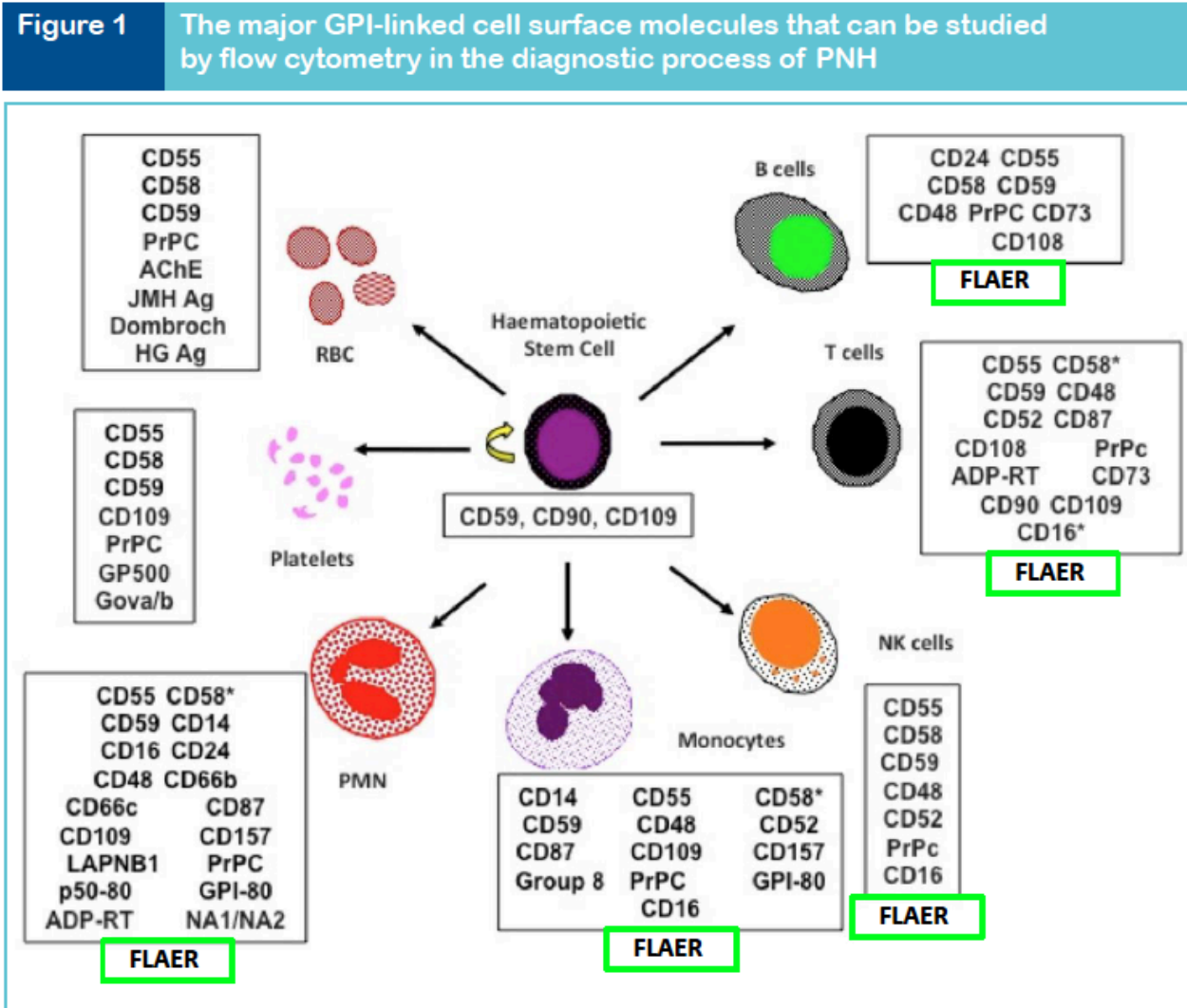
Monitorización

Citometría de Flujo en HPN

Células con expresión de proteínas GPI

Poblaciones diana en sangre periférica:

- Neutrófilos y monocitos
- Hematías y reticulocitos



Citometría de flujo



- Deficiencia de > de una proteína GPI
- Al menos dos poblaciones celulares afectadas

Adaptado del esquema modificado por Brando B. de Rotoli B^{1,2}; FLAER: Fluoresceine-labelled aerolysin; GPI: glicosidil-fosfatidil-inositol

Contenido



- Punto de partida
- Citometría de flujo en hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
 - Poblaciones leucocitarias
 - Clon eritroide: “el gran olvidado”
- Monitorización de células HPN: ¿Tenemos algo nuevo?
- Casos clínicos peculiares
- Conclusiones

Citometría de flujo en HPN

¿Identificación, detección y cuantificación de células HPN?

Análisis comparativo

Células normales
Expresión de proteínas GPI

Estudio

- **Sangre periférica**
 - Neutrófilos y monocitos
 - Hematíes y reticulocitos

Identificación

Detección

Cuantificación

Diagnóstico y Monitorización

Células con fenotipo HPN
Expresión deficiente de
proteínas GPI

Análisis inmunofenotípico

- **Identificación:** neutrófilos, monocitos y hematíes
- **Detección:** células normales (**tipo I**) con deficiencia parcial (**tipo II**) o total (**tipo III**)
- **Cuantificación:** tamaño del clon (**tipo II+III**)

Detección de células HPN

Marcadores GPI y reactivos de selección celular

Hematías

CD59



TABLE 1 Recommended antibody clones and conjugates for High-Sensitivity PNH RBC and WBC assays

Target	Antibody conjugates	Purpose	Clone and vendor
RBC (all platforms)	CD235a-FITC	Gating on RBC	10F7MN (eBio), YTH 89.1 (Cedarlane) KC16 (BC), JC159 (DAKO)
	CD59-PE	GPI-linked for RBC	OV9A2 (eBio), MEM-43 (Invitrogen) MEM-43 (EXBIO/Cedarlane)
WBC (BC Cytometers)	FLAER-Alexa488	GPI-linked (Neuts+Monos)	NA (Cedarlane)
	CD24-PE	GPI-linked (Neuts)	SN3 (eBio), ALB9 (BC)
	CD24-APC		SN3 (eBio, EXBIO)
	CD14-PE	GPI-linked (Monos)	δ1D3 (eBio), RMO52 (BC)
	CD14-APC700		Tuk4 (Invitrogen) RMO52 (BC)
	CD157-PE	GPI-linked (Neuts+Monos)	SY11B5 (eBio, EXBIO, BD, BC, Sysmex)
	CD64-PC5	Gating on Monocytes	22 (BC)
	CD64-ECD		22 (BC)
	CD64-PC7		22 (BC), 10.1 (EXBIO)
	CD15-PC5	Gating on Neutrophils	80H5 (BC)
	CD15-PerCP-eF710		MMA (eBio)
	CD15-PerCPcy5.5		MEM158 (EXBIO)
	CD45-PC7	Debris/unlysed RBC exclusion+pattern recognition	J33 (BC)
	CD45-KO		J33 (BC)
CD45-eF450		2D1 (eBio)	
WBC (BD Cytometers)	FLAER-Alexa488	GPI-linked (Neuts+Monos)	NA (Cedarlane)
	CD24-PE	GPI-linked (Neuts)	SN3 (eBio), ML5 (BD)
	CD24-APC		SN3 (eBio, EXBIO)
	CD14-PE	GPI-linked (Monos)	δ1D3 (eBio), Tuk4 (Invitrogen)
	CD14-APC		MoP9 (BD)
	CD157-PE	GPI-linked (Neuts+Monos)	SY11B5 (eBio, EXBIO, BD, BC, Sysmex)
	CD64-APC	Gating on Monocytes	10.1 (BD, eBio)
	CD64-PECy7		10.1 (EXBIO), 22 (BC)
	CD15-APC	Gating on Neutrophils	HI98 (BD)
	CD15-PerCP-eF710		MMA (eBio)
	CD15-PerCPcy5.5		MEM 158 (EXBIO)
	CD45-eF450	Debris/unlysed RBC exclusion+pattern recognition	2D1 (eBio)
	CD45-PerCP		2D1 (BD)
	CD45-APC-H7		2D1 (BD)

Leucocitos

FLAER (N y M)

CD157 (N y M)

CD24 (N)

CD14 (M)



N: neutrófilos; M: monocitos
FLAER: Fluoresceine-labelled aerolysin

Paneles de anticuerpos

Nuevas técnicas: mayor eficiencia

Combinaciones de marcadores para el estudio de células HPN

Población	Combinación de marcadores GPI* y de selección^	Fluorocromos y clones	Sensibilidad
Leucocitos: Neutrófilos y Monocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Un tubo con ≥ 5 fluorocromos: - FLAER / CD157/ CD15 / CD64 /45 - FLAER / CD24/ CD15/ CD64 / CD14/ CD45 - FLAER / CD157/ CD15/ CD64 / CD24/ CD45 - FLAER / CD157/ CD15/ CD64/ CD24 / CD14/ CD45 	CD157-PE: SY11B5	Neutrófilos: - 0,05% Monocitos: - 0,1-0,5%
Serie eritroide: Hematíes Reticulocitos&	Un tubo: ≥ 2 fluorocromos: <ul style="list-style-type: none"> - CD235a-FITC / CD59-PE - CD235a-FITC**/ CD59-PE / CD71-APC 	CD235a-FITC: KC16; 10F7MN; YTH 89.1*; JC159 CD59-PE: MEM-43; OV9A2 CD71-APC: MEM-75	- 0,01%

^ Adaptado a los diferentes equipos; * mínimo dos marcadores GPI; FLAER: Fluoresceine-labelled aerolysin; FITC: fluoresceína; PE: ficoeritrina; APC: alofococianina.

** preferible YTH 89.1 para el análisis de reticulocitos (> tiempo de adquisición); &: análisis opcional en clones medianos y grandes (>5-10%)

Citometría de flujo de alta sensibilidad

Límites de detección y cuantificación

1. Límite de blanco (LOB) o “**índice de fondo**”: porcentaje de células HPN detectables en individuos normales (<0,01%)
2. El porcentaje mínimo detectable por encima del fondo es el **límite de detección** (LOD) y se puede calcular como $20 \text{ células HPN} \times 100/\text{número de eventos adquiridos}$
3. El **límite inferior de cuantificación** (LLOQ) se calcula como $50 \text{ células de HPN} \times 100/\text{número de eventos adquiridos}$
4. Cada laboratorio debe analizar muestras normales para garantizar que su tasa de fondo sea la menor posible (artefactos relacionados con el ensayo, expansiones transitorias...)

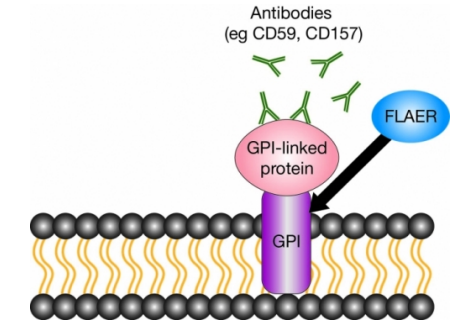
Table 1
Estimated LLOQ and LOD According to the Total Number of Cells Acquired

Total number of gated cells acquired	Quantitative assay using LLOQ (>50 PNH cells) (%)	Qualitative assay using LOD (>20 PNH cells) (%)
10,000	0.5	0.2
20,000	0.25	0.1
30,000	0.17	0.066
40,000	0.125	0.05
50,000	0.1	0.04
100,000	0.05	0.02
200,000	0.025	0.01
300,000	0.017	0.007
400,000	0.0125	0.005
500,000	0.01	0.004
1,000,000	0.005	0.002

Diagnóstico y monitorización de HPN

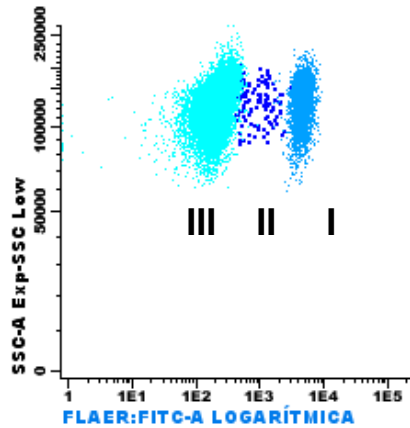
Análisis en sangre periférica: leucocitos

Panel de leucocitos: FLAER/CD157/CD45/CD64/CD15

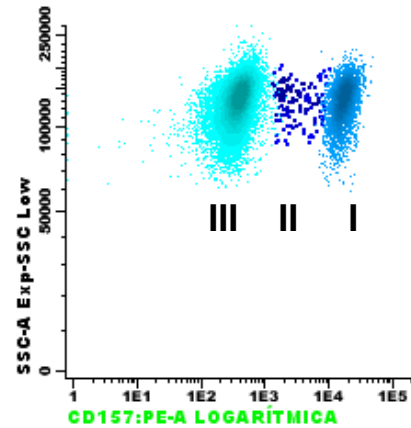


FLAER: Fluoresceine-labelled aerolysin

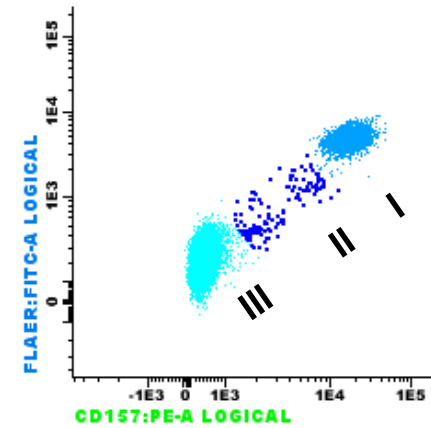
SSC / FLAER



SSC / CD157



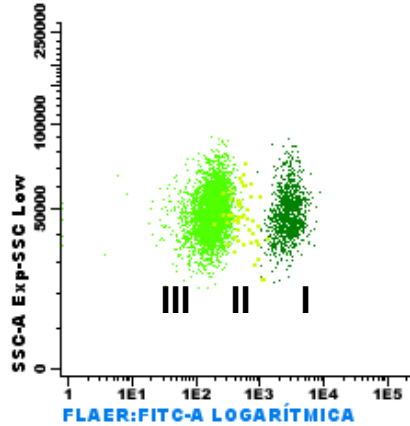
CD157 / FLAER



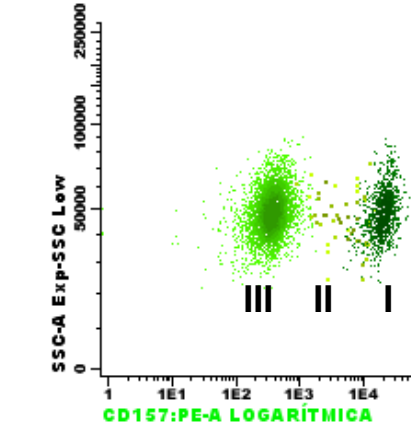
Neutrófilos

- Clon 82% (tipo II+III)

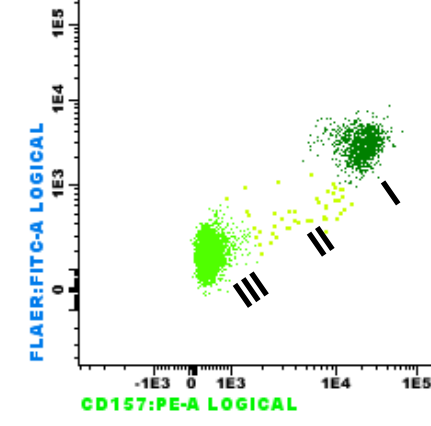
SSC / FLAER



SSC / CD157



CD157 / FLAER



Monocitos

- Clon 76% (tipo II+III)

La proporción de neutrófilos/monocitos deficitarios representa de forma más precisa el tamaño de clon HPN

International PNH Registry¹

Características clínico-biológicas según el tamaño del clon HPN en 2.813 pacientes: ≤ 5%; ≥ 5 % y ≤10%; > 10% y ≤ 30%; > 30%

Table 1 Baseline^a demographics and characteristics of patients with PNH^b

	≤5% (n= 1006)	> 5 to ≤ 10% (n= 221)	> 10 to ≤ 30% (n= 443)	> 30% (n= 1143)
Sex, n (%)				
Female	526 (52.3)	121 (54.8)	254 (57.3)	602 (52.7)
Male	480 (47.7)	100 (45.2)	189 (42.7)	541 (47.3)
Race, n (%)				
White or Caucasian descent	841 (83.8)	176 (80.0)	337 (76.4)	823 (72.2)
Asian	125 (12.5)	34 (15.5)	76 (17.2)	276 (24.2)
Black or African descent	23 (2.3)	5 (2.3)	14 (3.2)	25 (2.2)
Native or Aboriginal	0	2 (0.9)	3 (0.7)	2 (0.2)
Unlisted or multiple races	15 (1.5)	3 (1.4)	11 (2.5)	14 (1.2)
Age at PNH onset, y, median (Q1, Q3)	44 (26.6, 61.4)	35 (22.7, 53.6)	38 (25.0, 55.6)	33 (23.5, 46.9)
History of BMF, ^b n (%)	539 (54.2)	113 (51.8)	192 (43.8)	352 (31.3)
History of TE, n (%)	33 (3.4)	6 (2.8)	8 (1.8)	46 (4.1)

BMF, Bone marrow failure; *GPI*, glycosphosphatidylinositol; *MAVE*, major adverse vascular event; *PNH*, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; *TE*, thrombotic event

^aBaseline was defined as PNH onset (i.e., disease start date) at the earliest reported GPI-deficient clone, date of PNH diagnosis, or PNH symptom

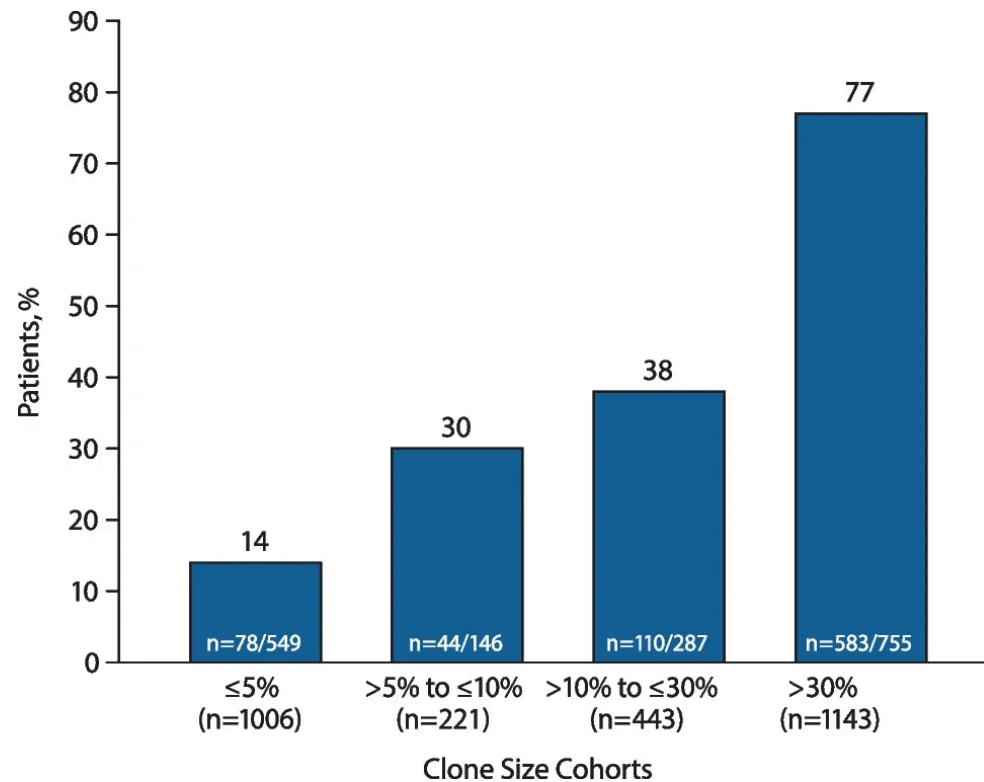
^bIncludes aplastic or hypoplastic anemia, acute myelogenous leukemia, myelodysplastic syndrome, myelofibrosis, and other bone marrow pathology

Valorar la relación entre el tamaño del clon de granulocitos deficientes en GPI y el riesgo de MAVE, incluido ET, a lo largo la evolución de la enfermedad

International PNH Registry¹

Tamaño del clon HPN en 2.813 pacientes: $\leq 5\%$; $\geq 5\%$ y $\leq 10\%$; $> 10\%$ y $\leq 30\%$; $> 30\%$

Pacientes con alta actividad de la enfermedad* en el último seguimiento, estratificados por el tamaño del clon de granulocitos



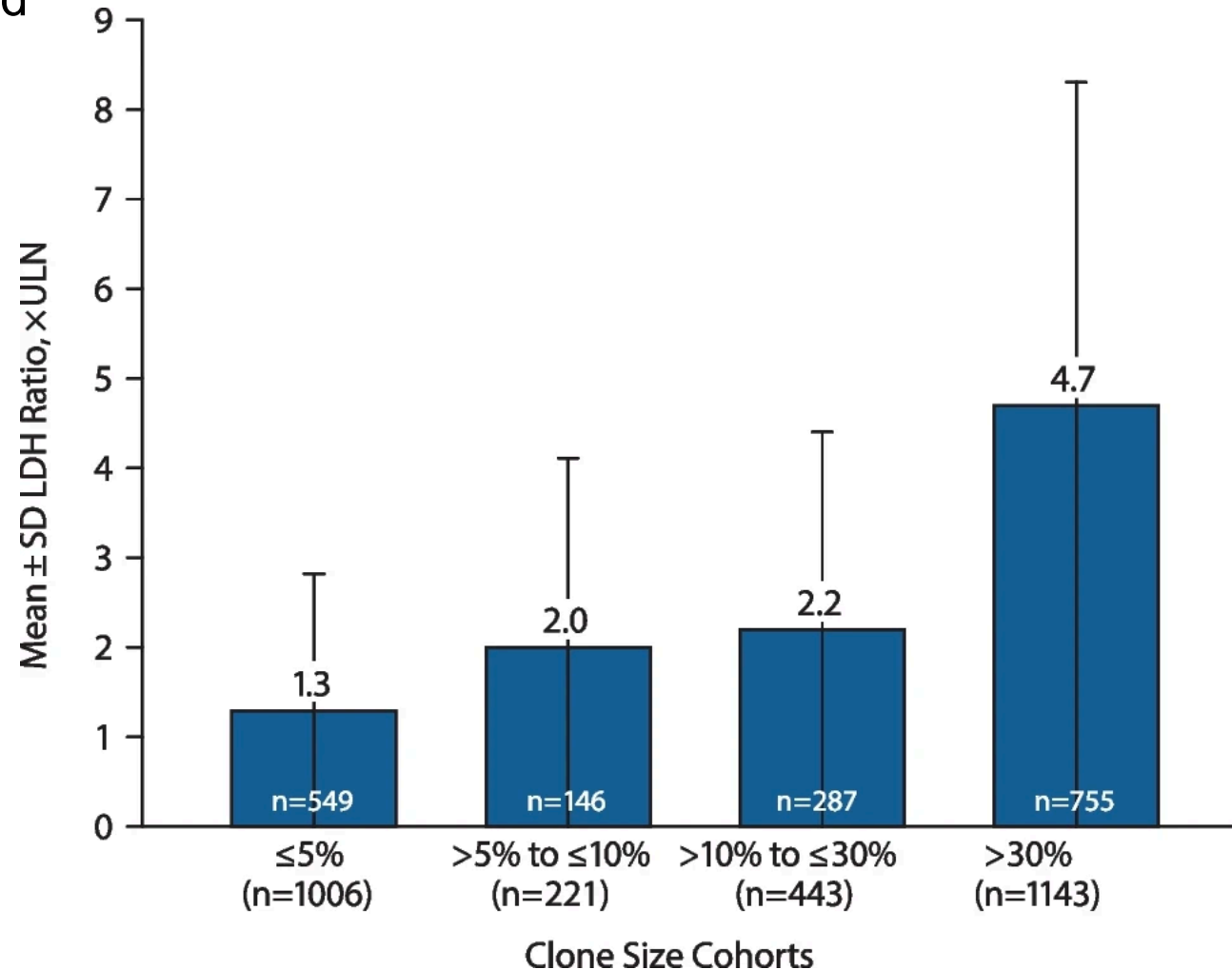
Aproximadamente un tercio de los pacientes tenían un tamaño de clon inicial $\leq 5\%$, lo que puede reflejar una detección más temprana debido a mejoras en el conocimiento de la enfermedad

* índice de LDH $\geq 1,5 \times$ LSN

1. Dingli D *et al. Ann Hematol. 2023.102*:1637–1644 (2023).

International PNH Registry¹

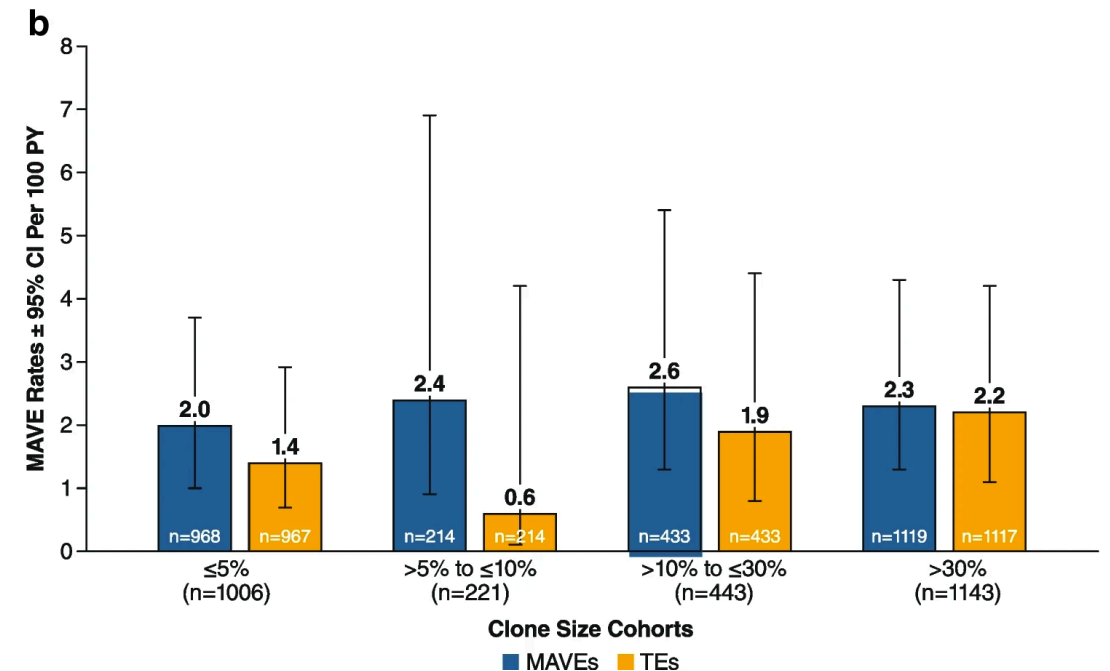
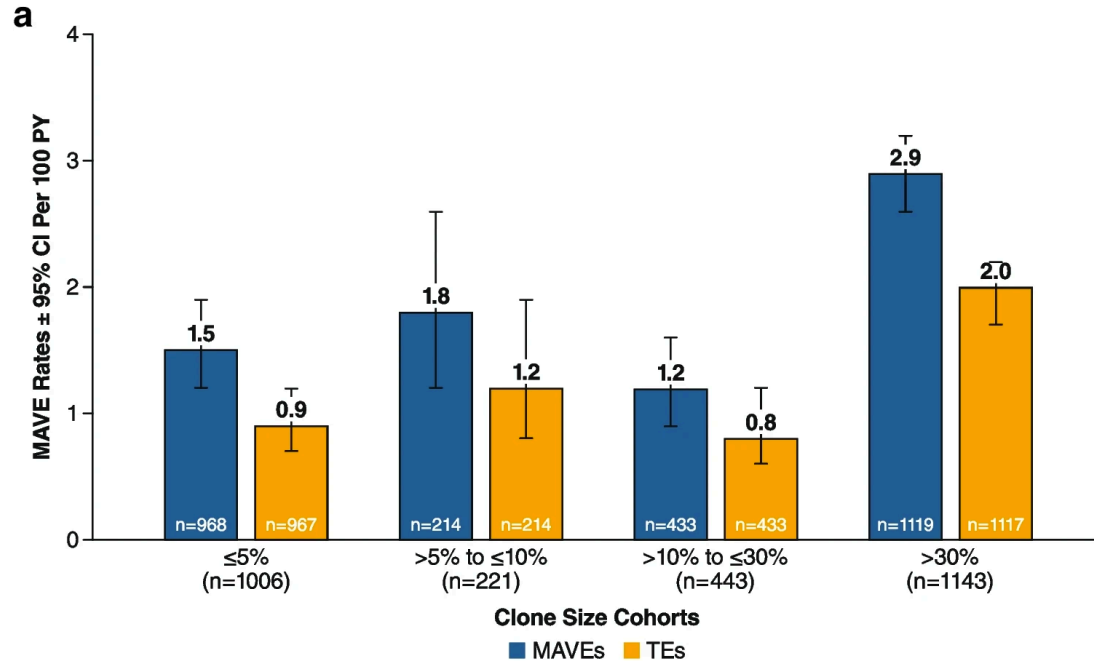
Relación entre la actividad hemolítica en el último seguimiento y el tamaño del clon HPN al inicio de la enfermedad*



*: Primera detección de células HPN ≥ 0,01%

International PNH Registry¹

Tasas de MAVE desde el diagnóstico hasta el último seguimiento estratificadas por tamaño de clon de granulocitos al inicio del estudio (a: modelo no ajustado; b: modelo ajustado)



Un > tamaño de clon inicial se asoció con tasas más altas de MAVE y ET hasta la última visita de seguimiento

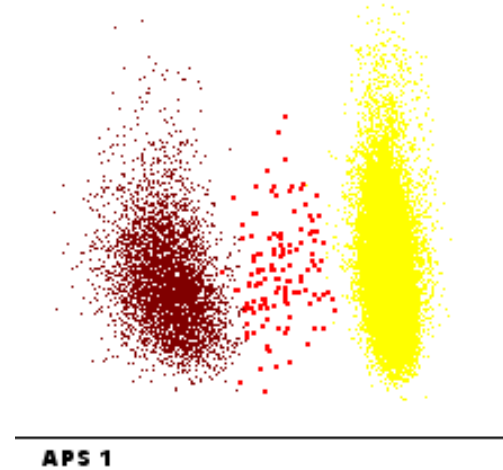
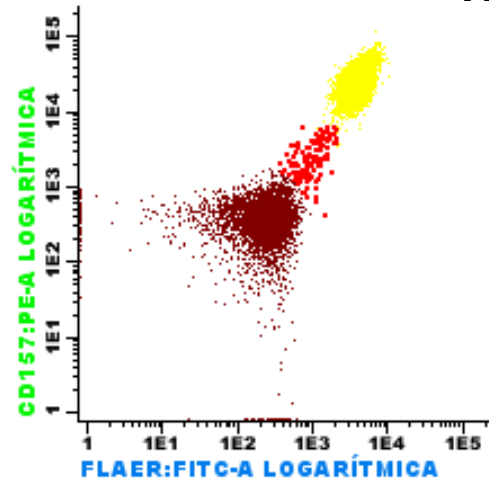
El análisis sugiere una correlación entre el tamaño del clon y la carga/riesgo de MAVE, que puede tener valor pronóstico relacionado con la toma de decisiones en el tratamiento de pacientes con HPN

Peculiaridades del clon HPN en leucocitos

Discrepancias en el tamaño del clon: monocitos y neutrófilos

Neutrófilos

FLAER/CD157/CD45/CD64/CD15



Neutrófilos

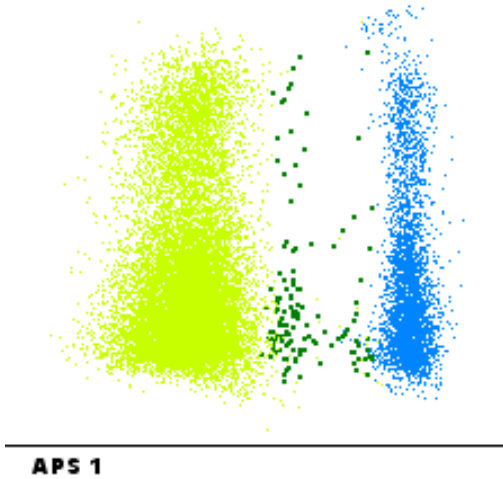
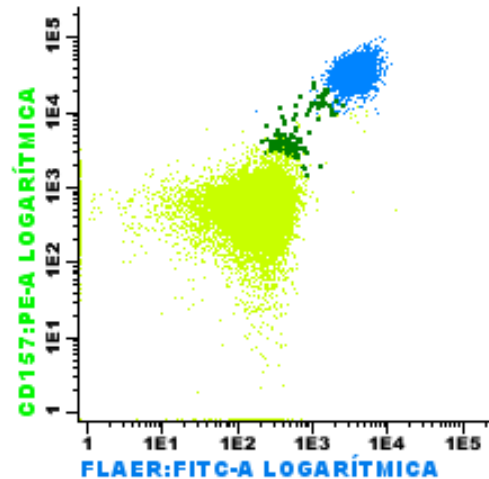
Tipo I: 87,94

Tipo II: 0,367

Tipo III: 11,692

Clon: 12,06

Monocitos



Monocitos

Tipo I: 18,976

Tipo II: 0,612

Tipo III: 80,412

Clon: 81,024

Discrepancia del tamaño del clon HPN de neutrófilos respecto al de monocitos sin un significado clínico claro. Posiblemente la causa sea multifactorial y podría estar implicado un mecanismo genético además de otros factores endógenos y exógenos

Peculiaridades del clon HPN en leucocitos

Discrepancias en el tiempo del tamaño del clon

Año CMF	Clon N %	Clon M %	Clon H %
2017	11	80,2	44
2017	12,06	81,02	-
2018	10,5	81,8	47,6
2019	9,5	80,6	45,32
2020	6	77	44,5
2020	7	72	49
2022	3,5	64	-
2023	4	57	67

Progresiva disminución del tamaño del clon de neutrófilos, se mantiene la discrepancia respecto a monocitos

Tamaño y composición del clon HPN

Análisis en diferentes poblaciones leucocitarias

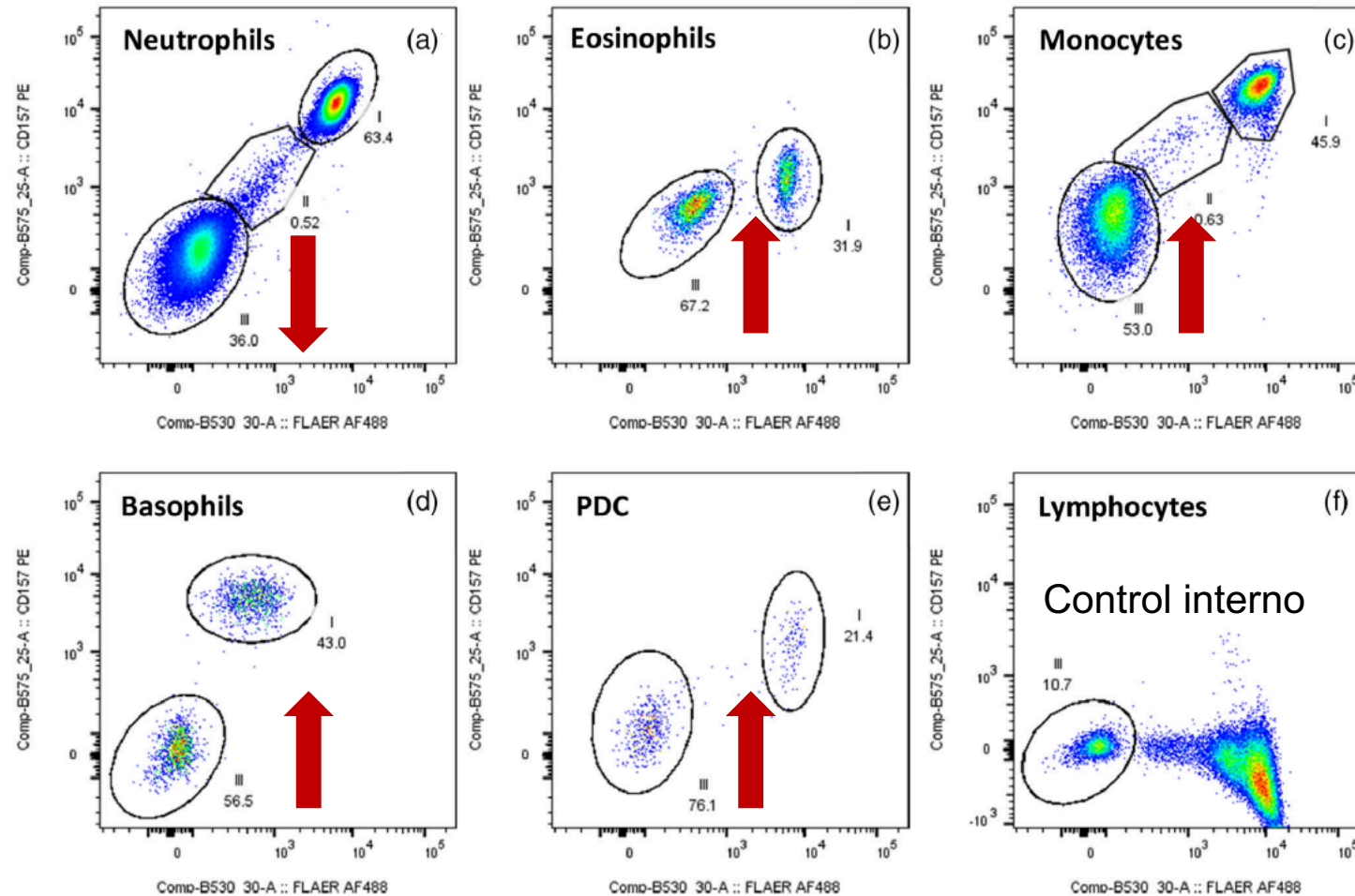
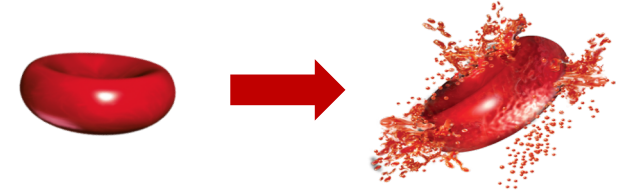


FIGURE 2 Representative dual parameter dot plots of FLAER versus CD157 from a case of classical PNH with leucocyte populations defined

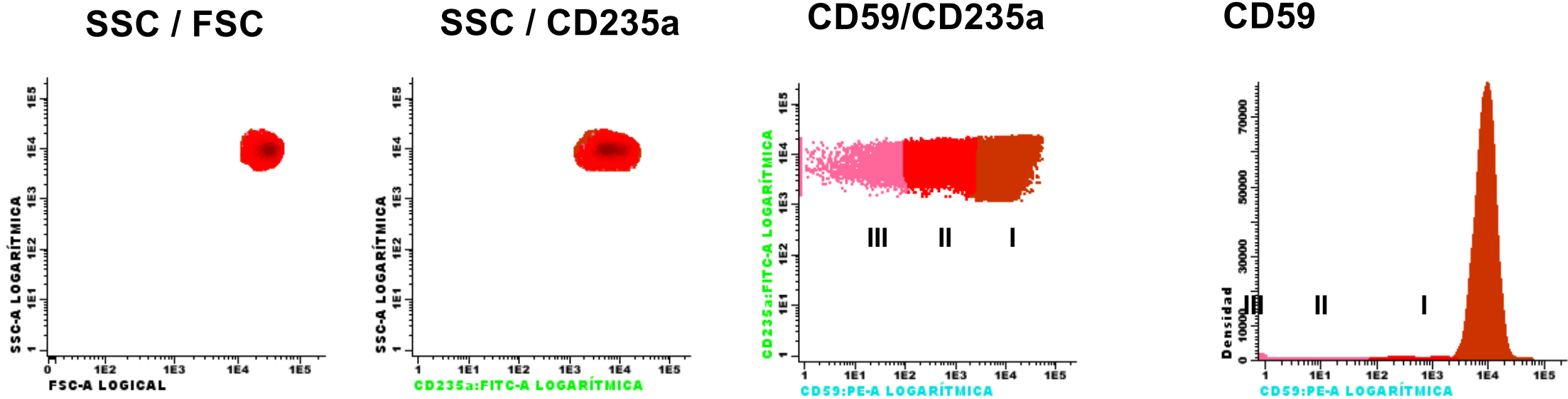
Tamaño del clon y perfil de expresión sin un significado clínico establecido

Clon eritroide: “el gran olvidado”

Análisis en sangre periférica: hematíes



Panel: **CD235 selección** / **CD59 proteína GPI**



FITC	PE
CD235a*	CD59**

Hematíes:	
- Tipo II	3,43%
- Tipo III	1,14%
- Clon	4,57%

- El tamaño del clon en hematíes depende de la hemólisis, transfusiones y terapia anti-complemento

* Clon KC16 (Beckman Coulter); ** Clon MEM43 (Invitrogen) / OV9A2 (eBio)

¿Trombosis y hemólisis?¹⁻⁵

Patrón de expresión de proteínas GPI en hematíes

Relación entre el tamaño y composición del clon eritroide con hemólisis y trombosis^{1,3}

- Grupos de riesgo de trombosis en pacientes con bajo nivel de hemólisis (LDH **< 2x LSN**)¹:
 - **Grupo 1**: granulocitos HPN > 30%, hematíes HPN < 10% (58% de ET)
 - **Grupo 2**: granulocitos de HPN > 30%, hematíes HPN > 10% con mayor proporción de hematíes de tipo II que de tipo III (18% de ET)
 - **Grupo 3**: granulocitos de HPN 10-30%, hematíes HPN < 10% (no ET)
- Aumento de la proporción de células tipo II en pacientes con HPN trombótica respecto a la hemolítica³ (HPN hemolítica 9,4 %, hemolítica/trombótica 18,2 % y trombótica pura 21,9 %)
- Mayor % de células tipo III en el grupo hemolítico (26,9%) frente al grupo trombótico (12,3%)³

Mecanismos no hemolíticos / mutación PIGA: pueden jugar un papel importante en la fisiopatología de la trombosis en HPN

Pacientes con **niveles bajos de hemólisis** pueden **presentar trombosis**, la incidencia no está clara y es difícil identificar a los pacientes de riesgo

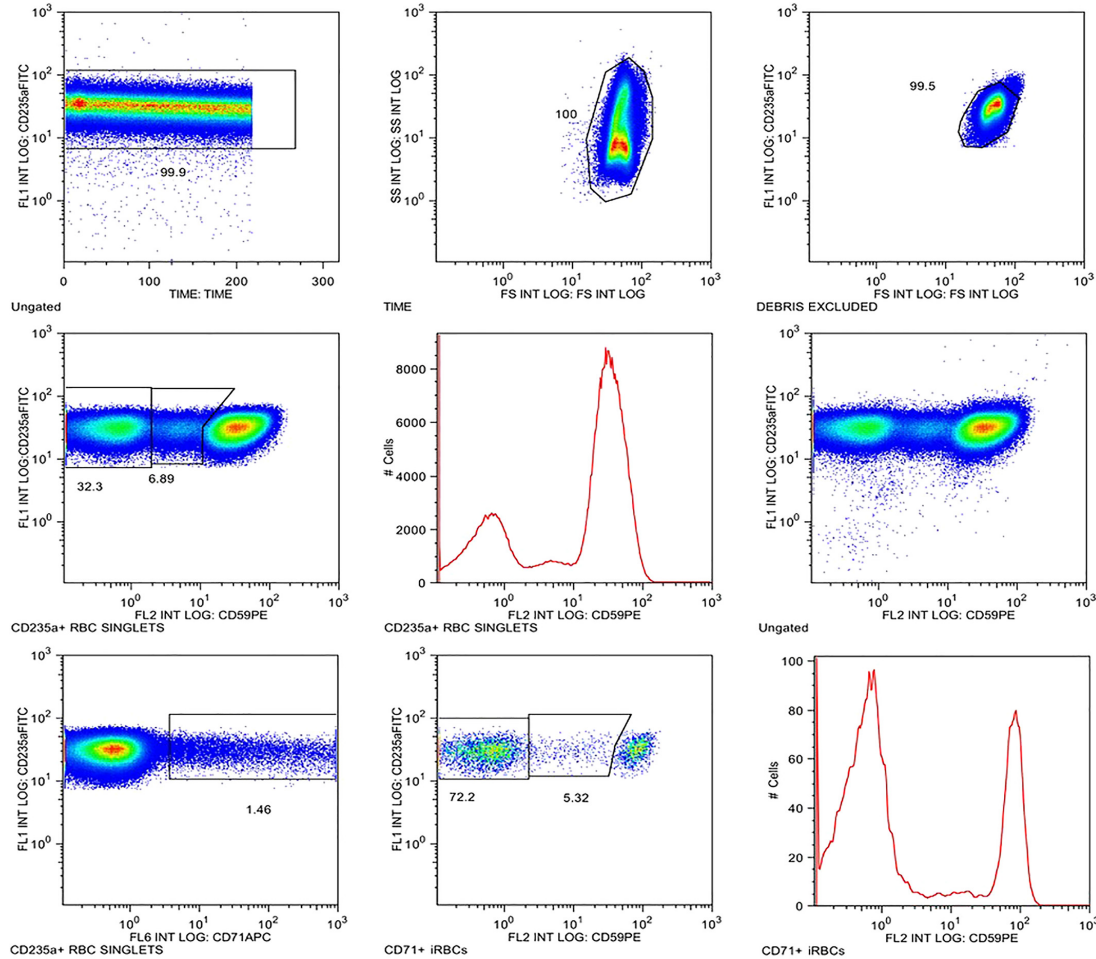
LSN: límite superior de normalidad; ET: episodios trombóticos

Clon HPN eritroide

Análisis de reticulocitos en HPN

Tamaño y composición del clon eritroide

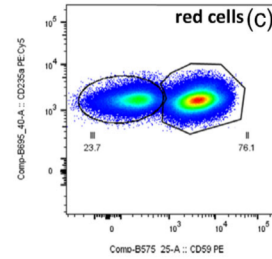
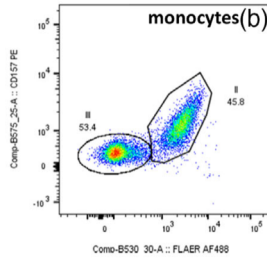
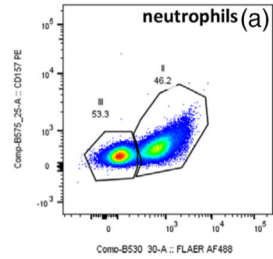
CD71 y **CD235a** permiten identificar reticulocitos y junto a **CD59** proporcionan una estimación del tamaño y composición del clon eritroide más clara y fiable en pacientes con clones medianos y grandes (>5-10%)¹



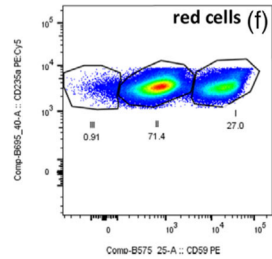
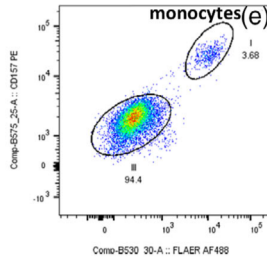
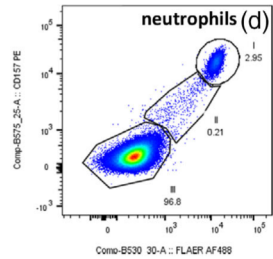
FITC	PE	APC
CD235a	CD59	CD71

Niveles variables de expresión de proteínas GPI

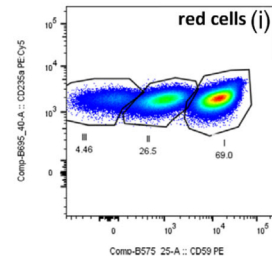
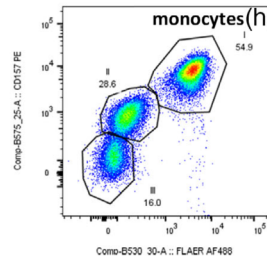
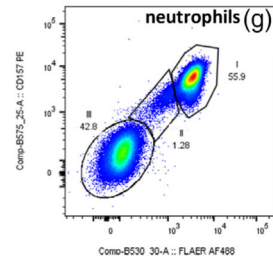
Case 1



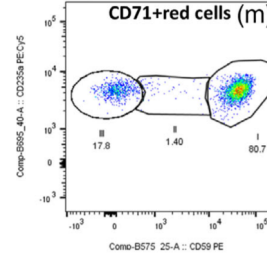
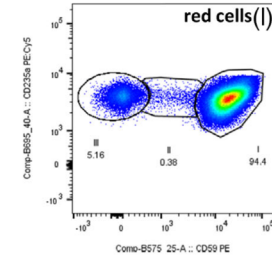
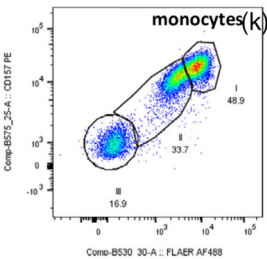
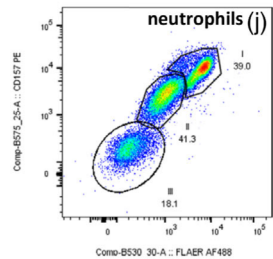
Case 2



Case 3



Case 4



Perfil de expresión de proteínas GPI

- El genotipo, número y tipo de mutaciones *PIGA* es determinante del fenotipo
- La correlación fenotípica con el subtipo clínico explica el amplio espectro de presentación
- Las alteraciones moleculares, genéticas y bioquímicas pueden originar distintos y complejos perfiles de expresión
- ¿Significado clínico y diagnóstico?

Citometría de flujo de alta sensibilidad: detección y cuantificación de células HPN

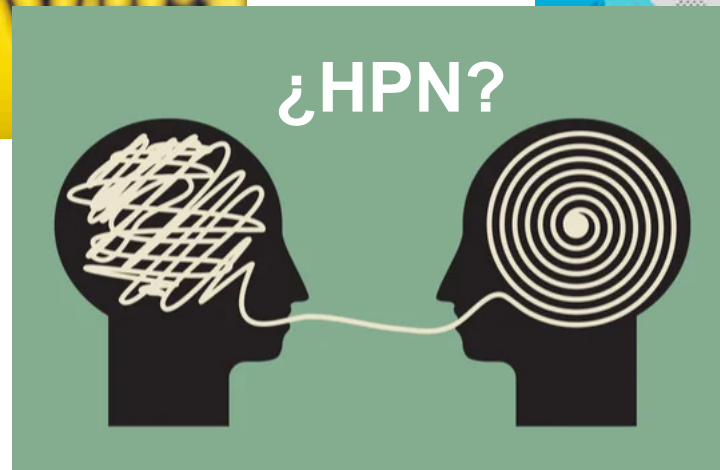
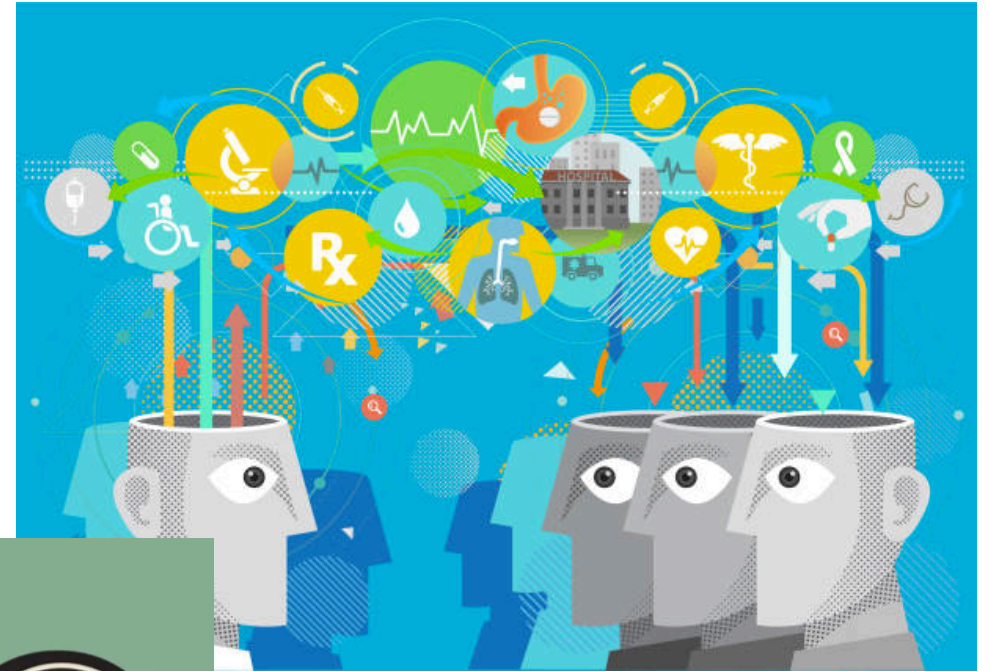
Característica	Recomendaciones de Guías de consenso ¹⁻⁵
Tipo de muestra	Sangre periférica fresca (EDTA)* (procesar en < 48 h)
Poblaciones de estudio Panel inicial Panel de confirmación	Neutrófilos (N), monocitos (M) Hematíes (H)
Marcadores GPI Neutrófilos (mínimo 2 reactivos) Monocitos (mínimo 2 reactivos) Hematíes y reticulocitos [^] (R)	CD24, CD157, FLAER CD14, CD157, FLAER CD59
Marcadores de identificación celular Neutrófilos Monocitos Hematíes Reticulocitos	CD10, CD15, CD45 CD64, CD45 CD235a CD71 y CD235a
Combinación de anticuerpos	≥ 5 (N y M) / 2 (H) / 3 (R)
Nivel de sensibilidad[#]	0,01% (H) / 0,05% (N) / 0,1- 0,5% (M)
Controles Internos Externos	Resto de células de la muestra (linfocitos) Archivos de análisis
Aplicabilidad^{&}	Diagnóstico y monitorización

* Preferible EDTA, heparina y ACD también es aceptable; GPI: glicosilfosfatidilinositol; FLAER: Fluoresceine-labelled aerolysin; [^]Estudio opcional; [#] límite inferior de cuantificación; [&] **Deficiencia de al menos dos proteínas GPI en al menos dos poblaciones celulares diferentes**

1. Borowitz MJ *et al.* International Clinical Cytometry Society. *Part B Clin Cytometry*. 2010; 78B: 211-230. 2. Sutherland DR *et al.* *Cytometry Part B Clin Cytom* 2018; 94B: 23-48. 3. Illingworth A *et al.* *Cytometry Part B Clin Cytom* 2018; 94B: 49-66. 4. Illingworth AJ, *et al.* *Int J Lab Hematol*. 2019;41 (suppl 1):73-81. 5. Sutherland DR *et al.* *Cytometry B Clin Cytom*. 2020; 98:179–192.

Informe clínico

Citometría de flujo y área clínica



- **Información clara y útil para ambas áreas médicas**

Informe clínico

Recomendaciones



Informe de citometría de flujo en HPN^{1,2}

Información requerida en el informe

1. Terminología recomendada: clon HPN cuando la proporción de células deficientes es $>1\%$; pequeño clon para poblaciones entre $0,1\%$ y 1% y células raras GPI deficientes cuando es $< 0,1\%$
2. Paneles validados de estudio: marcadores de identificación y reactivos GPI utilizados
3. Recuento celular de la muestra por CMF: linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos/otras células nucleadas; indicar si se identifican células inmaduras / atípicas en la muestra, especialmente en caso de citopenias*
4. Límite de detección (LOD) y límite inferior de cuantificación (LLOQ) de la técnica
5. Tamaño clonal en los neutrófilos y monocitos de forma global (tipos II+III):
 - Se puede informar el valor absoluto del tamaño del clon en neutrófilos y monocitos así como el % del tamaño del clon en eosinófilos*
6. Tamaño clonal en hematíes, así como los porcentajes de células tipo II y tipo III:
 - Si imposibilidad de discriminar tipo II y III, informar el total (II+III) indicando el motivo
7. La conclusión del informe para los casos de diagnóstico debe indicar claramente si existe un clon HPN o si se descarta
8. La conclusión del informe para los casos de seguimiento debe indicar la evolución de los clones
9. El informe debe indicar el intervalo recomendado para la repetición del estudio de citometría de flujo

*Inclusión opcional

Contenido



- Punto de partida
- Citometría de flujo en hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
 - Poblaciones leucocitarias
 - Clon eritroide: “el gran olvidado”
- **Monitorización de células HPN: ¿Tenemos algo nuevo?**
- Casos clínicos peculiares
- Conclusiones

Monitorización de células HPN: ¿Tenemos algo nuevo?

HPN: enfermedad dinámica con presentación muy heterogénea

- Una **evaluación clínica individualizada** es fundamental para prevenir las complicaciones y la mortalidad precoz
- +
- **Monitorización de células HPN:**
 - Progresión, regresión / remisión y estabilidad
 - La expansión del clon puede ser rápida e impredecible
 - Los cambios en el tamaño del clon pueden tener **implicaciones clínicas y terapéuticas**

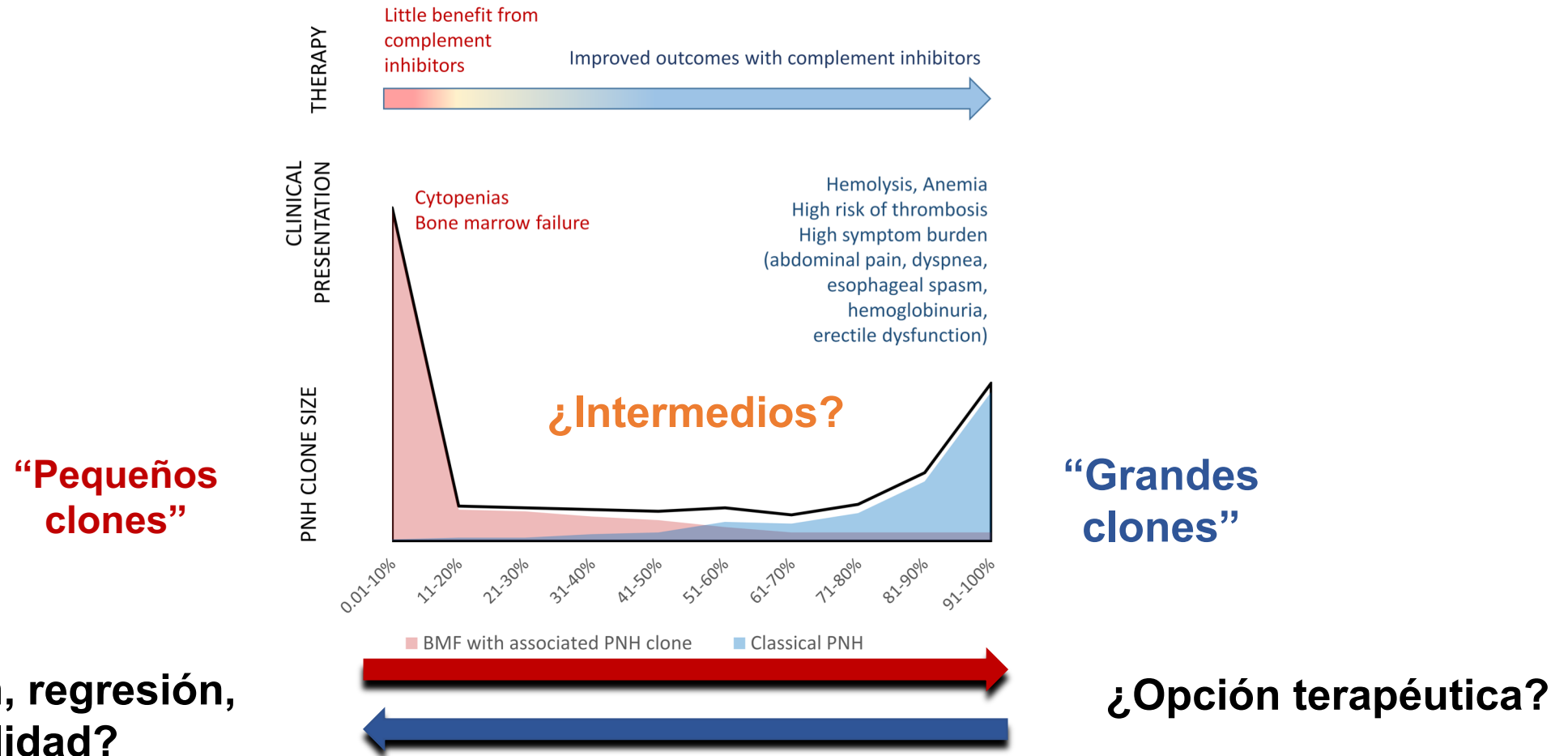


Integrar la información clínico-biológica con la detección de células HPN

Presentación clínica y patrón bimodal

Presentación clínica, tamaño del clon y tratamiento

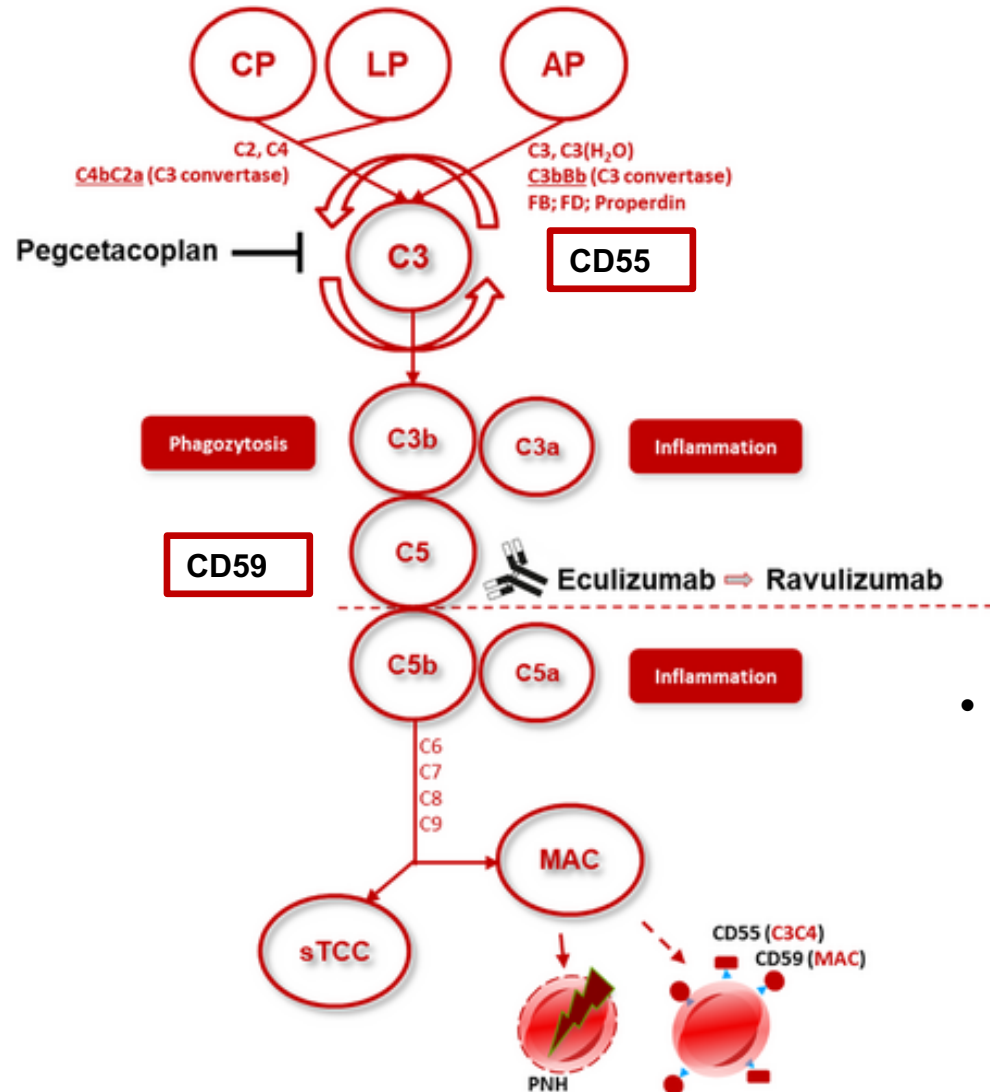
La presentación clínica de la HPN es heterogénea y los pacientes experimentan generalmente, una amplia gama de síntomas



Monitorización del tratamiento

Inhibidores del complemento

- Los hematíes normales están protegidos de la hemólisis extravascular dependiente de C3 y de la hemólisis intravascular mediada por MAC por CD55 y CD59 respectivamente



Actividad proximal: CD55

**Hemólisis
extravascular**

Actividad terminal: CD59

**Hemólisis
intravascular crónica**

- Conocer la eficacia del bloqueo del complemento proporciona información sobre el nivel de control de la enfermedad y puede ayudar en el manejo de los pacientes

MAC: complejo de ataque de membrana

Monitorización de inhibidores del complemento en HPN¹

Biomarcadores para monitorizar el bloqueo del complemento

- Actividad terminal del complemento:
 - CH50 y C5 libre en plasma
- Actividad proximal del complemento:
 - AH50, **opsonización** y niveles de C3, fragmentos Bb (activación vía alternativa)

Parámetros clásicos de laboratorio

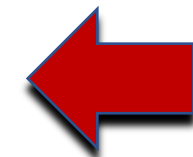
Routine laboratory assessments for monitoring patients with PNH and the effect of terminal versus proximal complement inhibition.

Parameter	Marker for:	Levels in untreated patients with PNH:	Effect of terminal complement inhibition:	Effect of proximal complement inhibition:
LDH	IVH	High	Highly reduced / normalized	Highly reduced / normalized
Bilirubin	EVH and, to a lesser extent, IVH	High	Slightly reduced	Highly reduced / normalized
Haptoglobin	IVH and EVH	Low	Moderately increased	Moderately increased
Hemoglobin	Clinical response	Low	Moderately increased	Highly increased / normalized
Absolute reticulocyte count	IVH, EVH, and BM reserve/function or degree of BM failure	High*	Slightly to moderately reduced	Highly reduced / normalized
PNH red blood cell clone size	IVH and EVH	Low	Slightly to moderately increased	Highly increased

Qualitative comparison based on expert opinion.

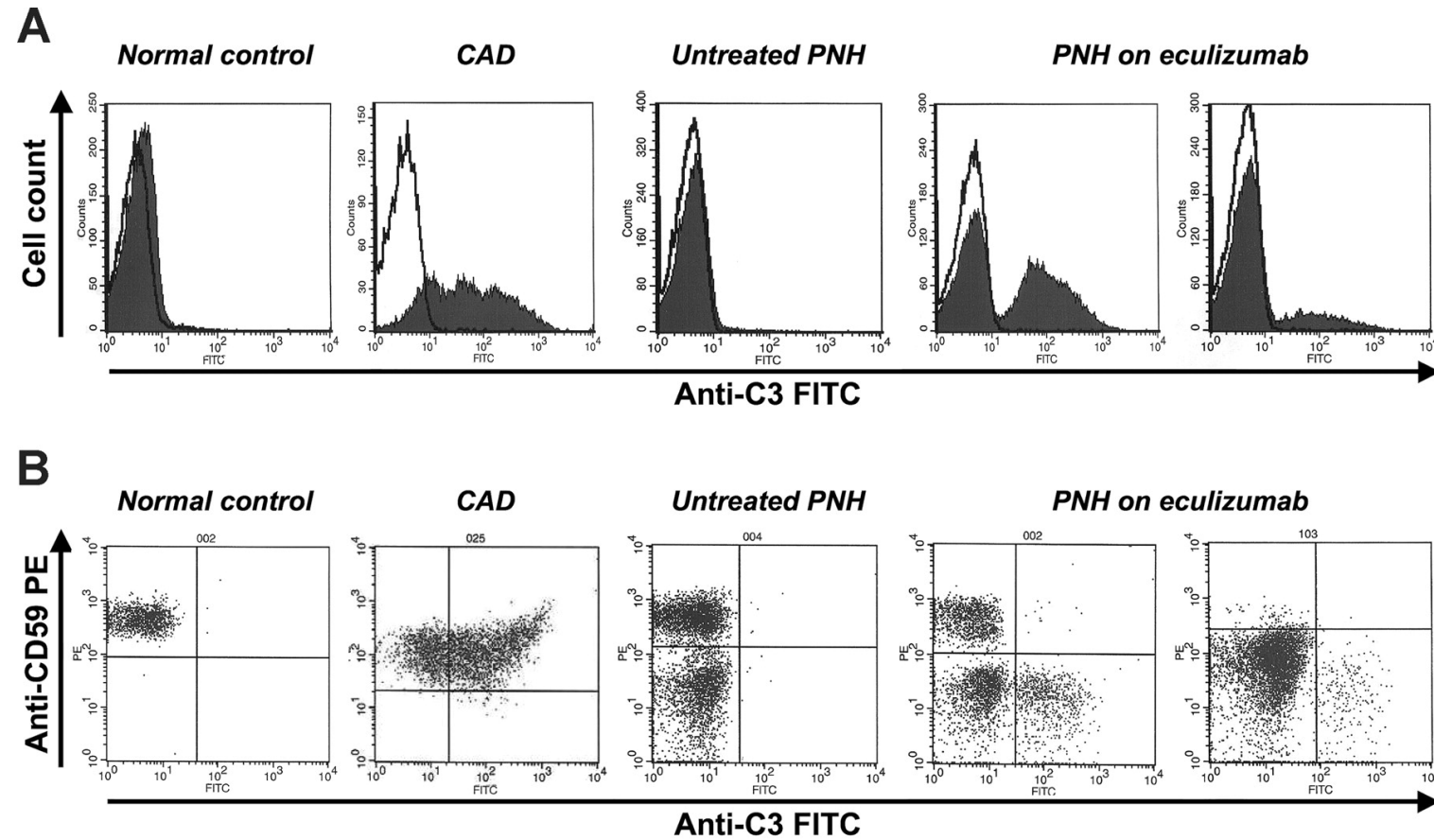
BM, bone marrow; EVH, extravascular hemolysis; IVH, intravascular hemolysis; LDH, lactate dehydrogenase; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

*High assuming no bone marrow failure.



Inhibidores terminales del complemento en HPN

¿Hemólisis extravascular?

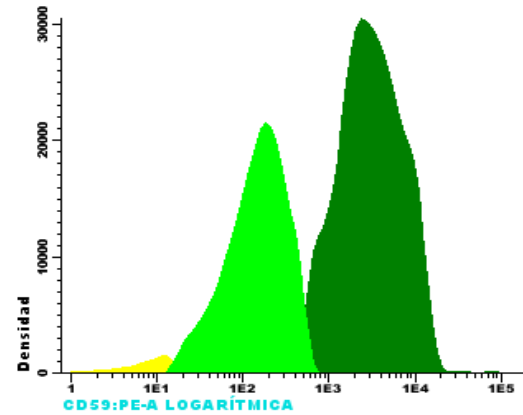
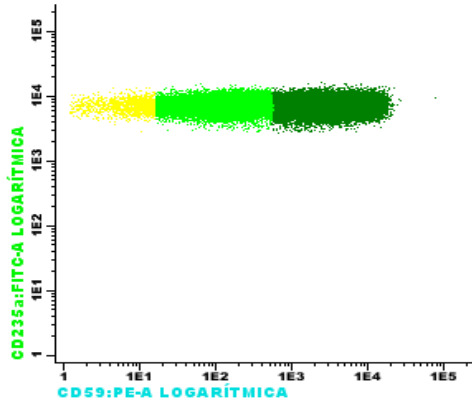


Monitorización del clon HPN eritroide

Inhibidores terminales del complemento

HPN clásica con iC5: clon de hematíes

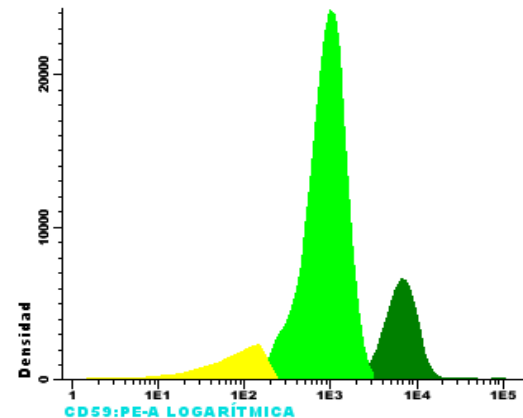
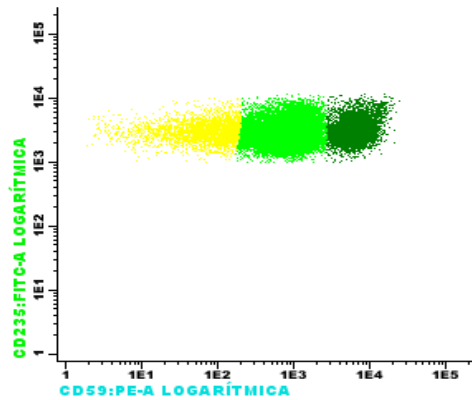
Pre tratamiento (01-02-2017)



Hematíes:

- Tipo II 12%
- Tipo III 33%
- **Clon HPN 45%**

Post-tratamiento (11-02-2022)



Hematíes:

- Tipo II 68%
- Tipo III 17%
- **Clon HPN 85%**

Los clones de HPN se expanden cuando la terapia anti-complemento es efectiva y los hematíes están adecuadamente protegidos contra los ataques dirigidos por C3 y C5

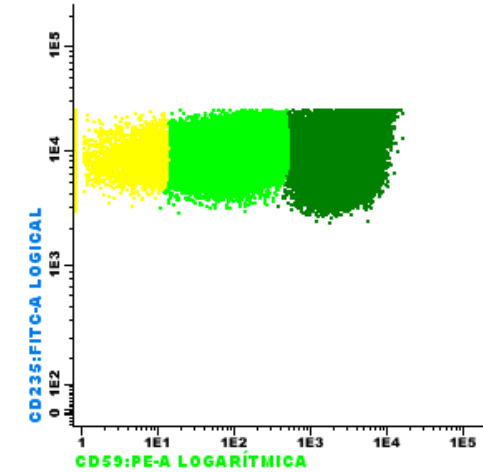
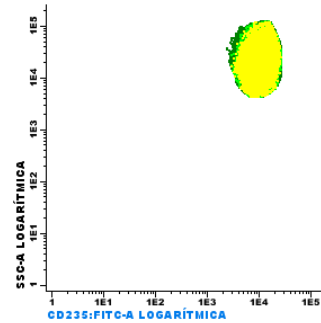
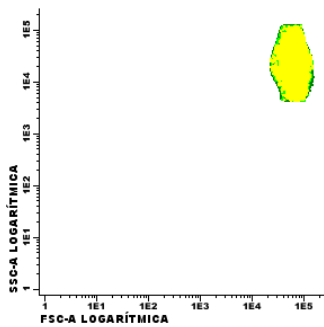
Monitorización del clon HPN eritroide

Inhibidores proximales del complemento

En terapia con iC5 (08-02-2023)

Clon HPN en neutrófilos: 42% y clon en monocitos: 58%

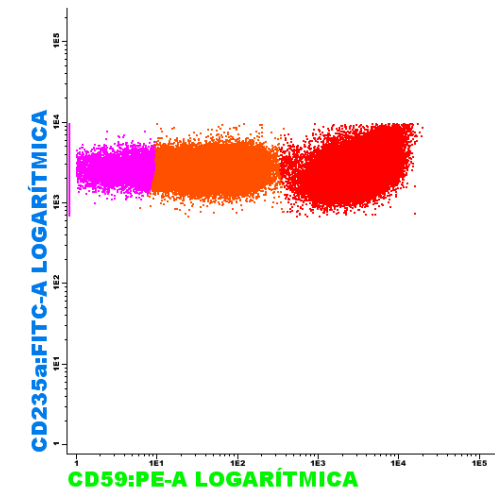
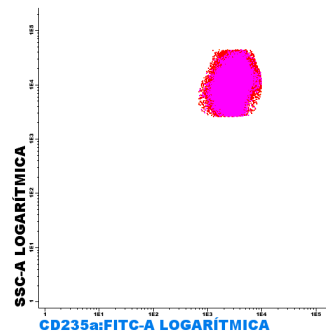
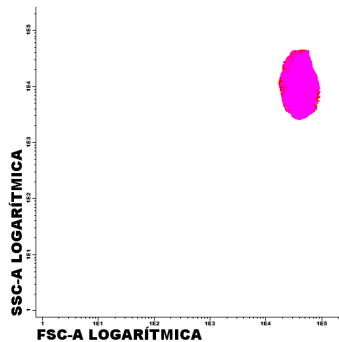
Clon hematíes maduros: **15,13%** (9,13% tipo II y 6% tipo III)



En tratamiento con iC3 (12-09-2023)

Clon HPN en neutrófilos: 52% y clon en monocitos: 49%

Clon hematíes maduros: **37%** (15% tipo II y 22% tipo III)

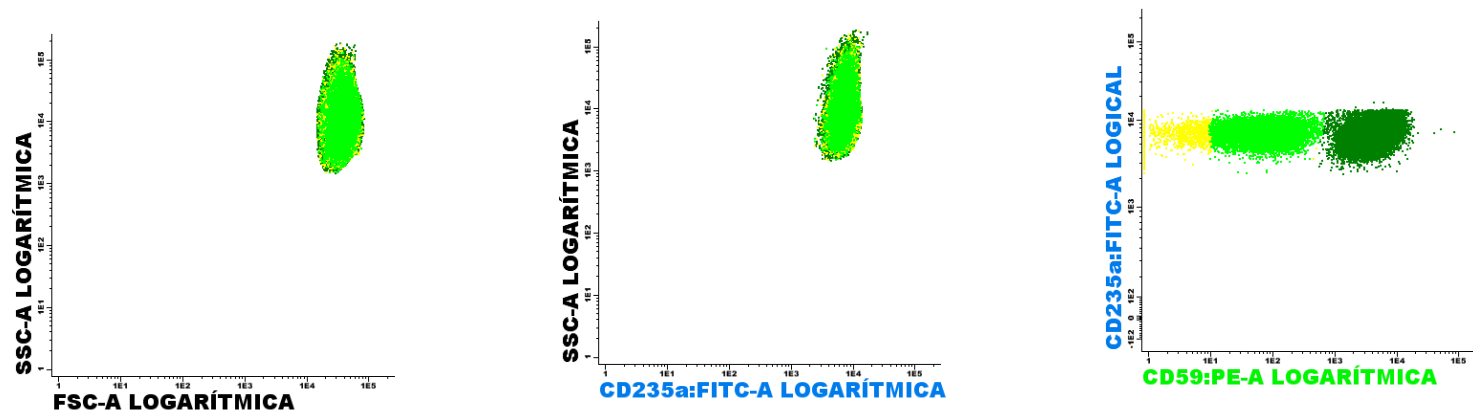


Monitorización del clon HPN eritroide

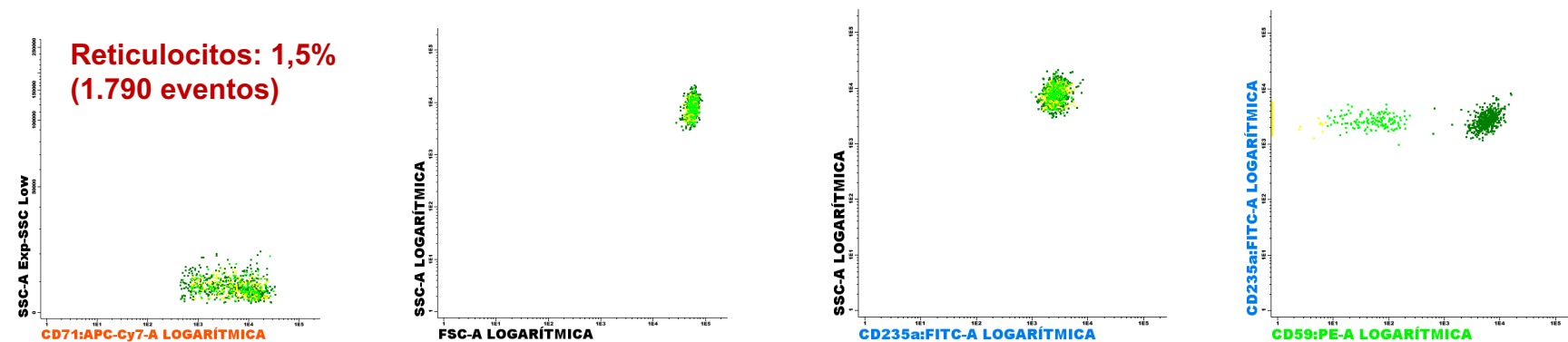
Inhibidores proximales del complemento

En tratamiento con iC3: 12-09-23

Clon HPN en **hematíes maduros**: 36,9% (13,7% tipo II y 25,4% tipo III)



Clon HPN en **reticulocitos**: 46,2% (19,8% tipo II y 26,4% tipo III)



Monitorización de células HPN por citometría de flujo

Integrar la evaluación clínico-biológica del paciente con la monitorización del clon

Recomendaciones

1. HPN con evidencia de hemólisis: cada 6 meses tras la detección inicial, si enfermedad estable anual; **con terapia anti-complemento**: reevaluar tamaño del clon cada 3-6 meses según clínica y evolución del clon, si estable anual
2. Tras la recuperación del trasplante de progenitores hematopoyéticos y cuando se realicen **cambios de inhibidores del complemento**
3. **Aplasia medular**: reevaluación del clon cada 3 o 6 meses durante dos años después del diagnóstico según se detecten o no células de HPN, con seguimientos anuales cuando el clon permanezca estable
4. Valorar cuando se observe algún **cambio clínico o analítico** sugestivo de actividad o progresión de la enfermedad

Contenido



- Punto de partida
- Citometría de flujo en hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
 - Poblaciones leucocitarias
 - Clon eritroide: “el gran olvidado”
- Monitorización de células HPN: ¿Tenemos algo nuevo?
- **Casos clínicos peculiares**
- Conclusiones

Caso clínico I

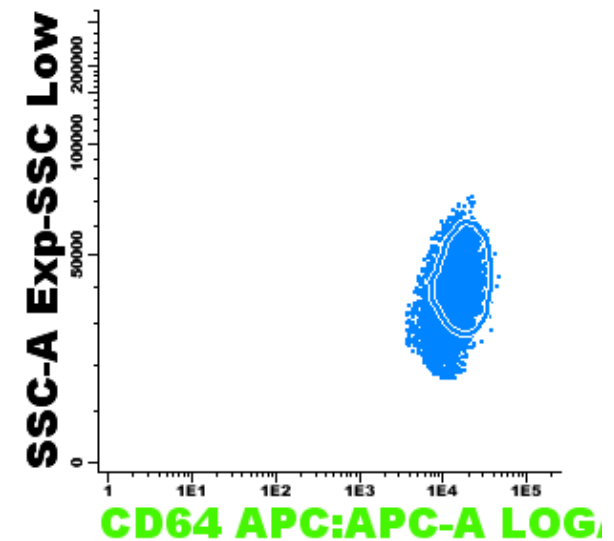
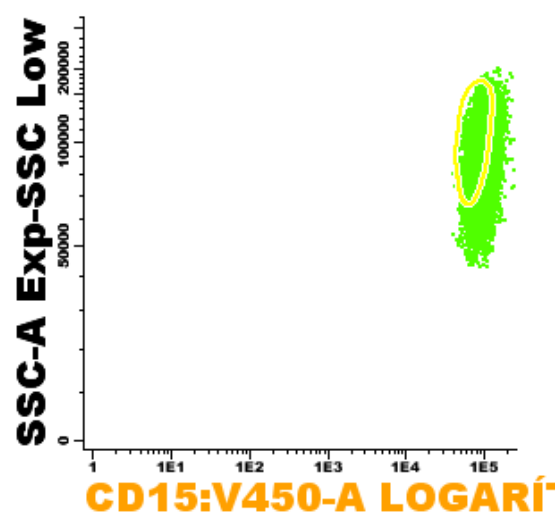
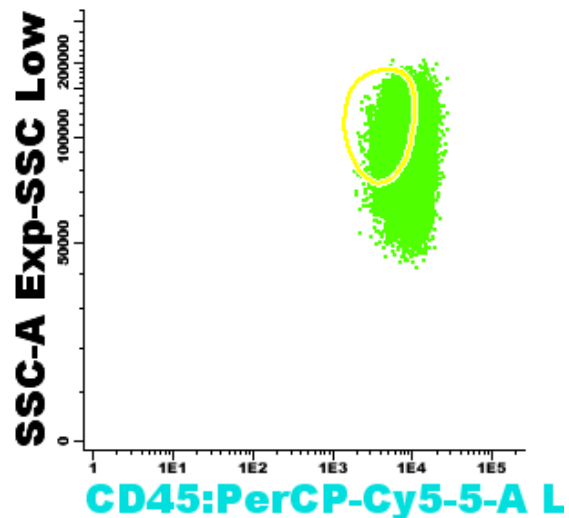
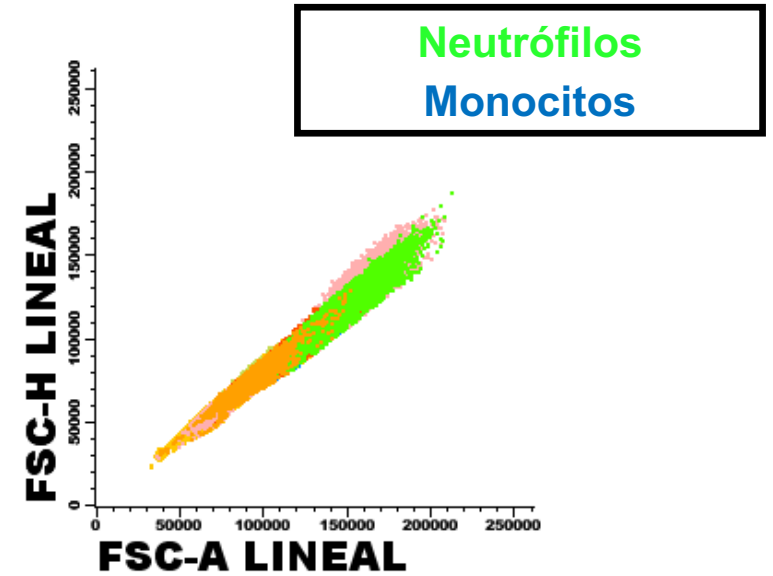
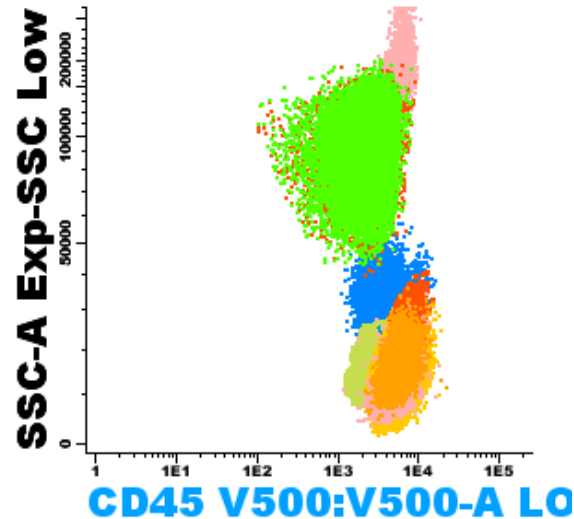
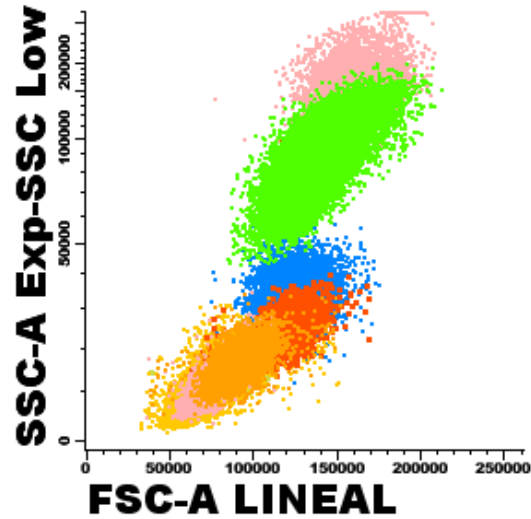
Información clínica inicial

- Paciente de 2 meses con clínica neurológica en progresión: hipotonía, movimientos anormales sin seguimiento ni fijación visual; posteriormente, presenta convulsiones y se confirma retraso en el desarrollo con dismorfia facial
- Parto vaginal sin incidencias; peso adecuado al nacer sin evidencia de malformaciones; madre de 32 años, sin consanguinidad de los padres
- Primo de la madre con discapacidad intelectual severa y epilepsia
- Hemograma: dentro de la normalidad sin parámetros de hemólisis
- Estudio molecular: **mutación del gen *PIGA***
- Se solicita estudio de citometría de flujo para análisis de proteínas GPI

Caso clínico I: paciente

Análisis de leucocitos

Panel de leucocitos: FLAER/CD157/CD45/CD64/CD15



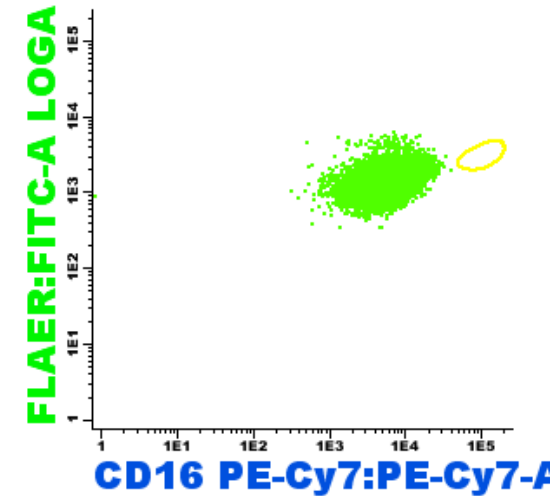
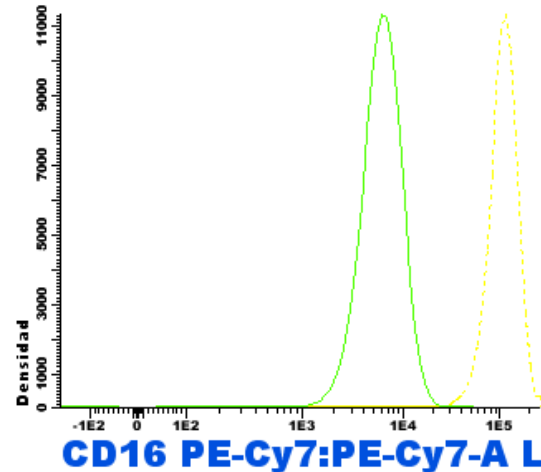
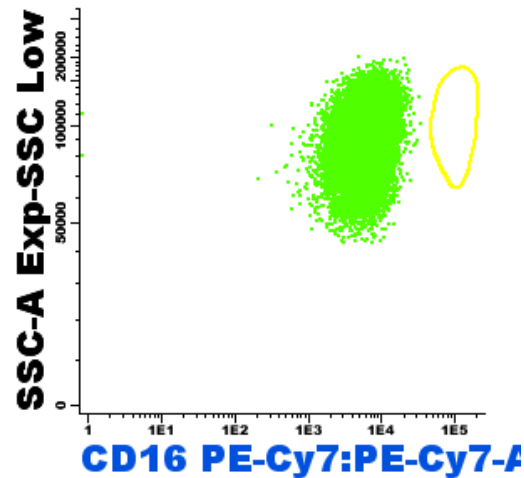
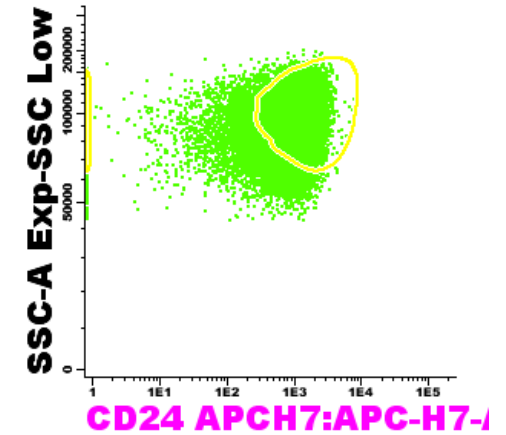
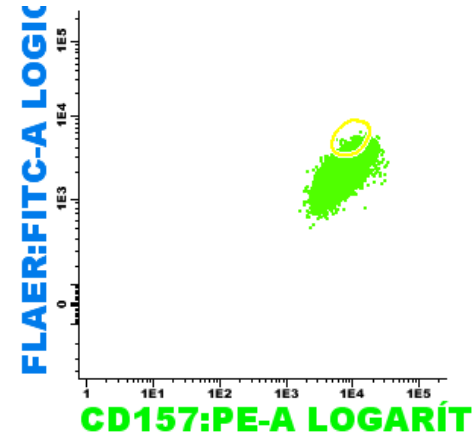
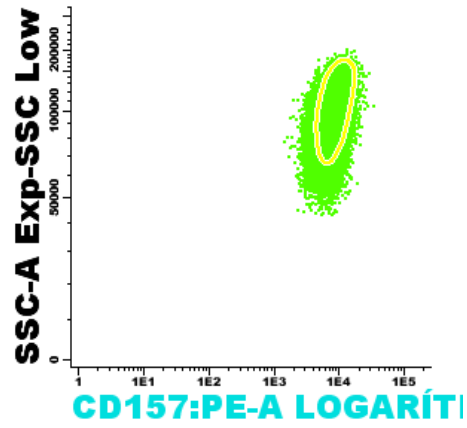
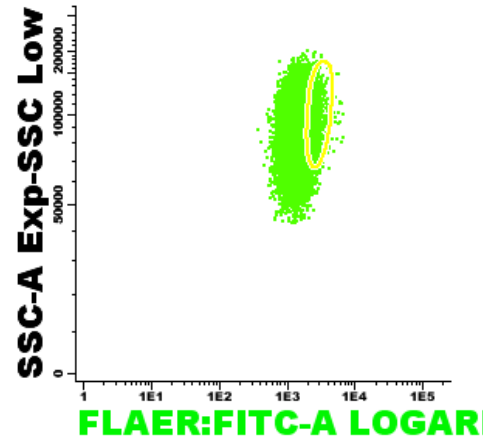
Caso clínico I: paciente

Análisis de neutrófilos

FLAER/CD157/CD45/CD64/CD15

FLAER/CD157/CD20/CD16/CD64/CD24/CD15/CD45

Neutrófilos
< Expresión CD16: ¿100% tipo II?
Discreta disminución de FLAER y CD24
Expresión normal de CD157

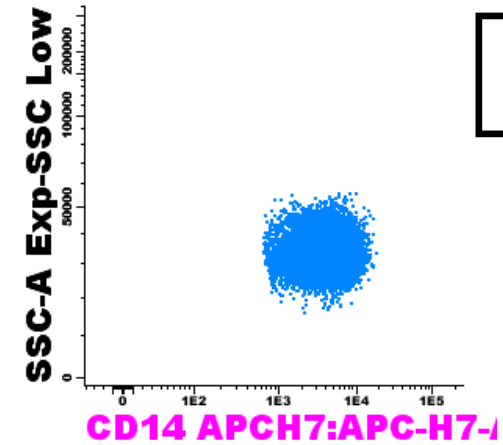
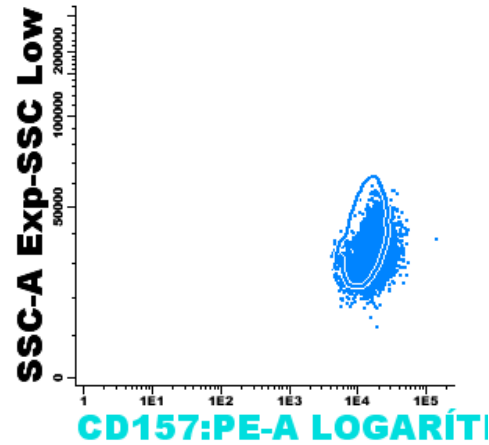
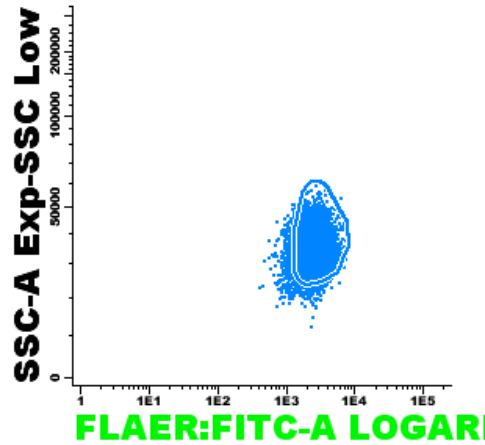


Caso clínico I

Análisis de monocitos y hematíes

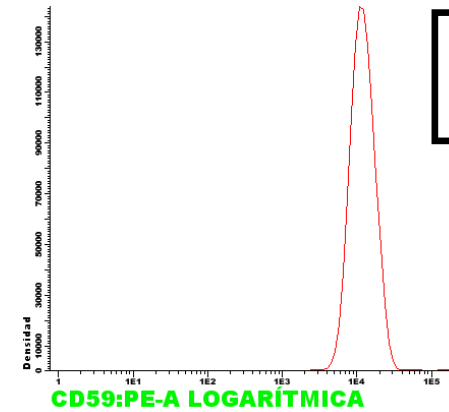
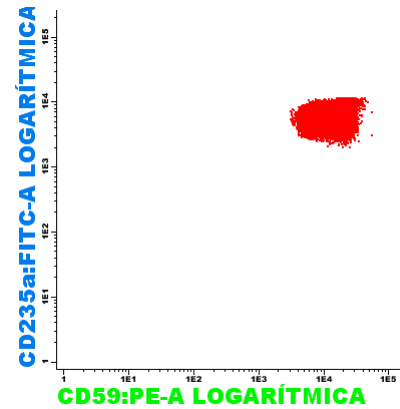
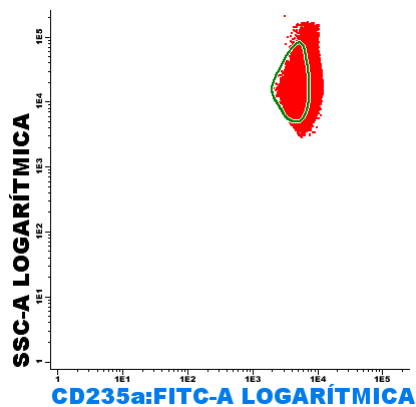
FLAER/CD157/CD45/CD64/CD15

FLAER/CD157/CD20/CD16/CD64/CD24/CD15/CD45



Monocitos
- 100% tipo I

CD235a / CD59



Hematíes:
- 100% tipo I

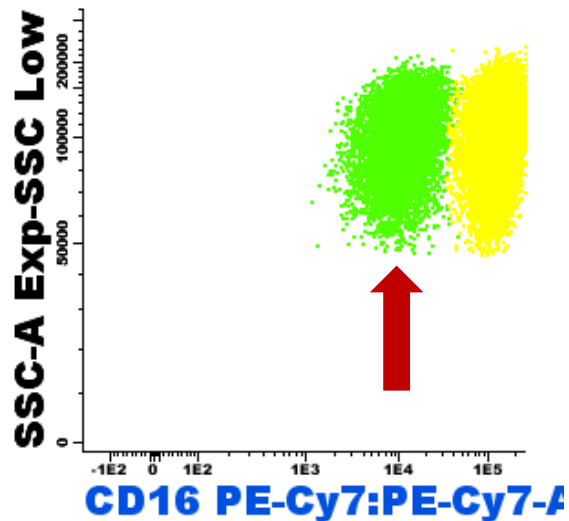
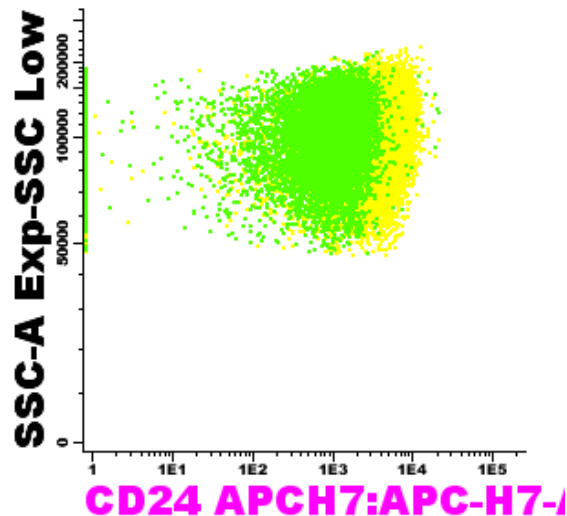
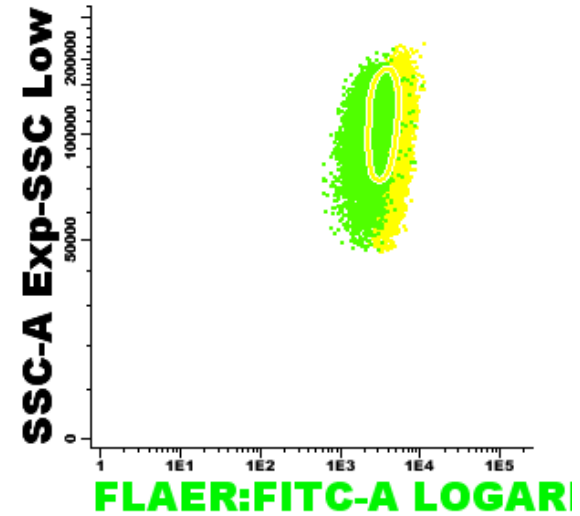
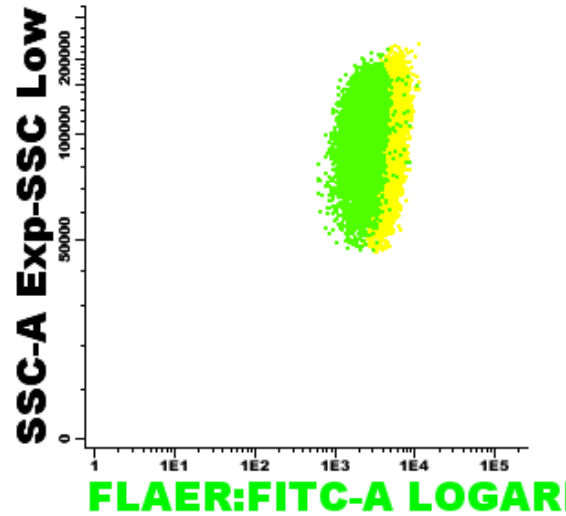
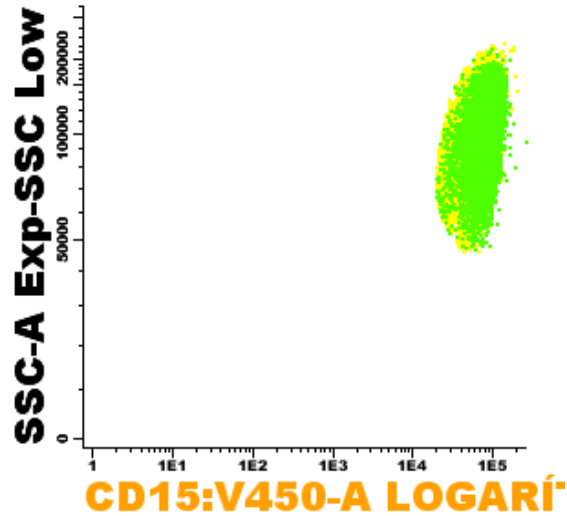
- Monocitos y hematíes sin déficit de expresión de proteínas GPI

Caso clínico I: madre del paciente

Análisis de neutrófilos

FLAER/CD157/CD45/CD64/CD15

FLAER/CD157/CD20/CD16/CD64/CD24/CD15/CD45



Neutrófilos
< Expresión CD16: ¿30% tipo II?
Discreta disminución de FLAER y CD24
Expresión de CD157: normal

Monocitos y hematíes normales

Caso clínico I

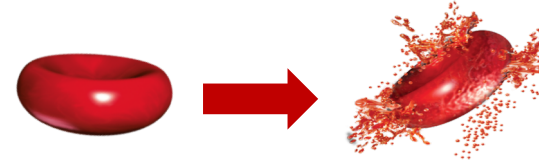
Información clínica final



- **Diagnóstico: Encefalopatía epiléptica y del desarrollo relacionado con un déficit del gen *PIGA***
- Estudio molecular (*NGS*): se detectó la variante genética patológica en hemicingosis c.130C>G [p.Pro44Ala] en el gen *PIGA* de herencia recesiva ligada al cromosoma X. Esta variante se clasifica de significado incierto, pero con cierta evidencia de patogenicidad
- Madre portadora en heterocingosis de la variante c.130C>G (p.Pro44Ala) en el gen *PIGA* en correlación con una expresión alterada del marcador CD16

Caso clínico II

Información clínica inicial



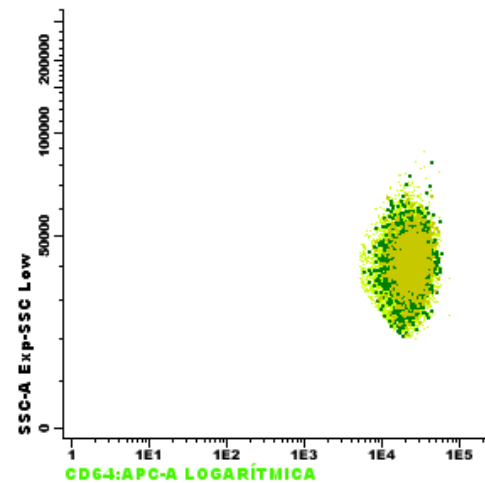
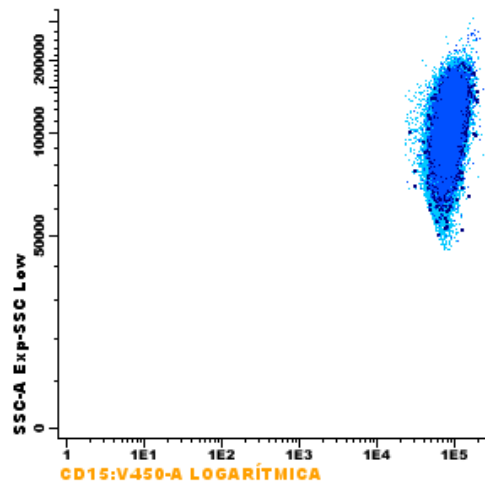
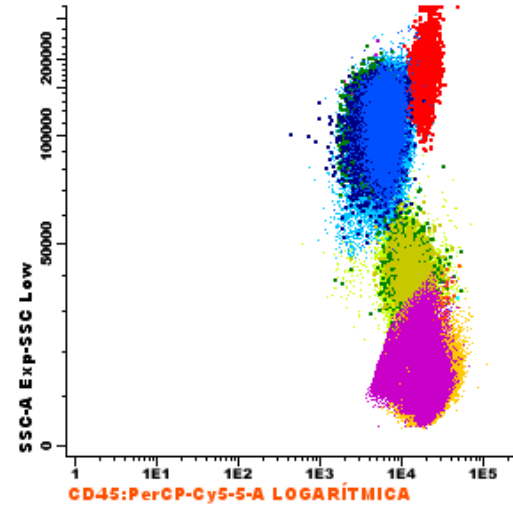
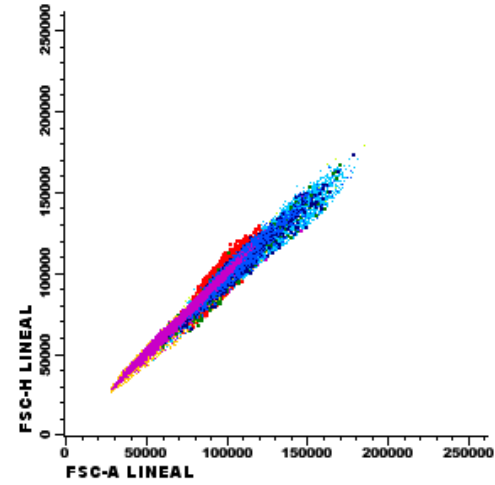
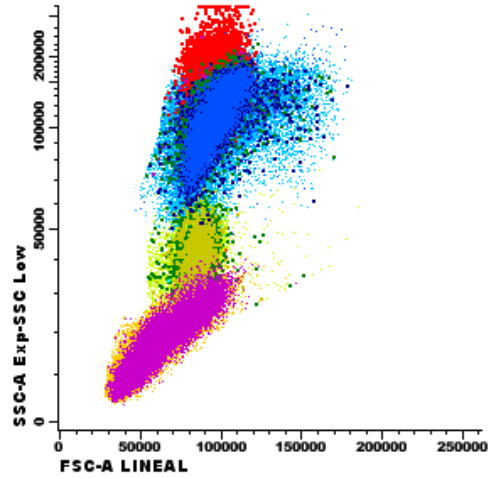
¿Anemia hemolítica?

- Paciente de 5 años
- Hemograma: hemoglobina 7,2 g/dL; plaquetas: 121.000/mm³; leucocitos 7.000/mm³ (neutrófilos 3.970); reticulocitos: 18%
- Bioquímica sérica: LDH*: 2.930 U/L; haptoglobina: < 8 mg/dL; Bilirrubina total 1,5 mg/dL (indirecta: 1,13)
- Prueba de Coombs directo negativa
- Clínica de anemia
- Se solicitó estudio de citometría de flujo
- Pendiente de análisis molecular

Caso clínico II

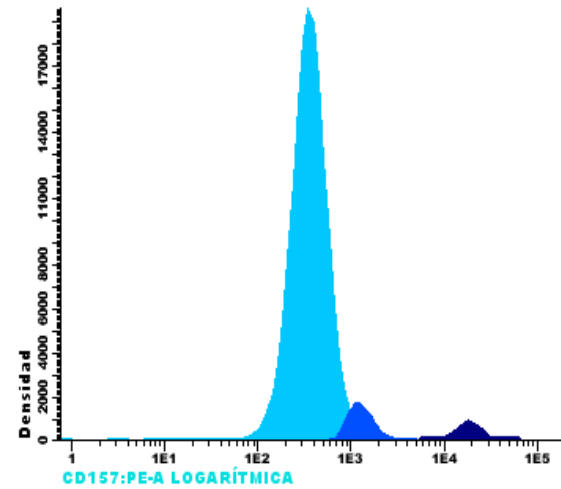
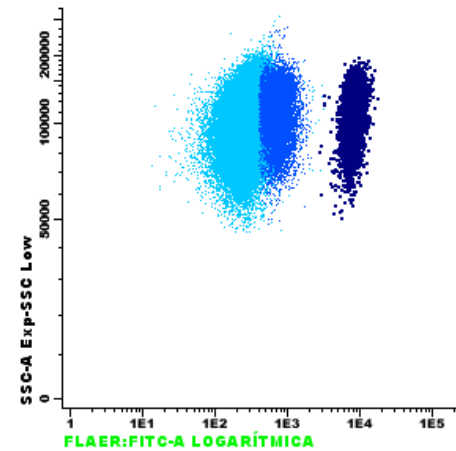
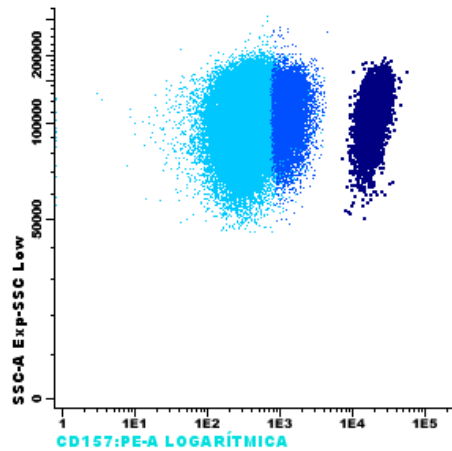
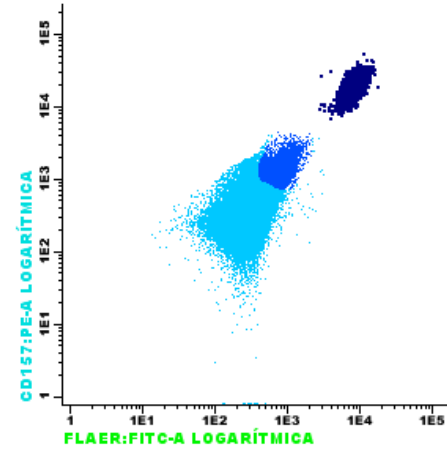
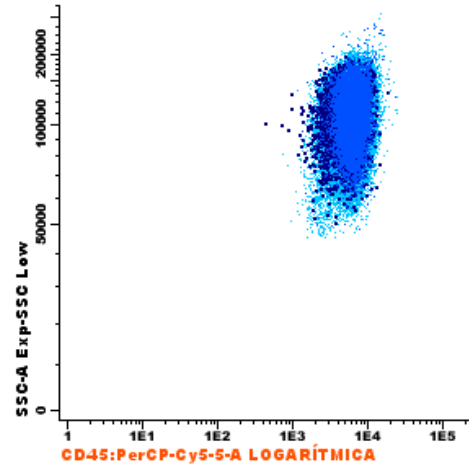
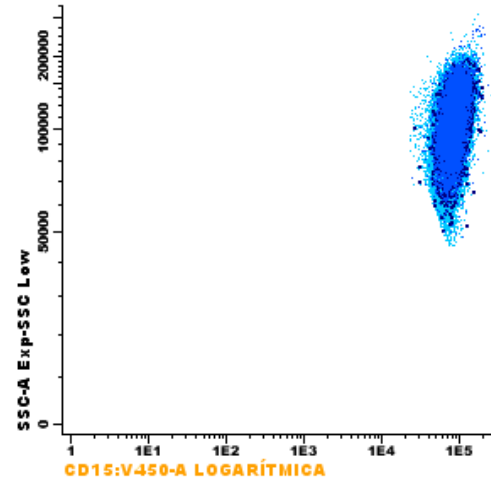
Análisis de leucocitos

Panel de leucocitos: **FLAER/CD157/CD45/CD64/CD15**



Caso clínico II

Análisis de neutrófilos

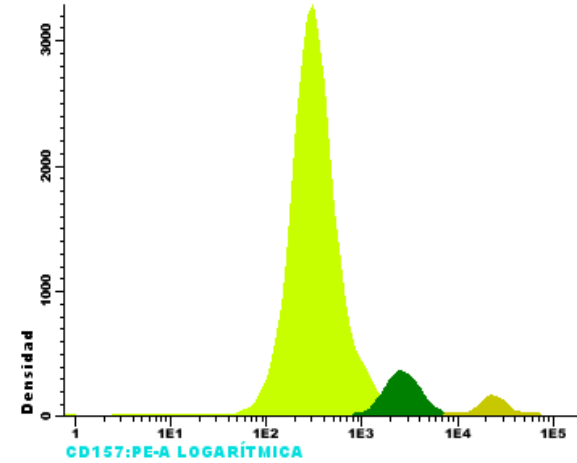
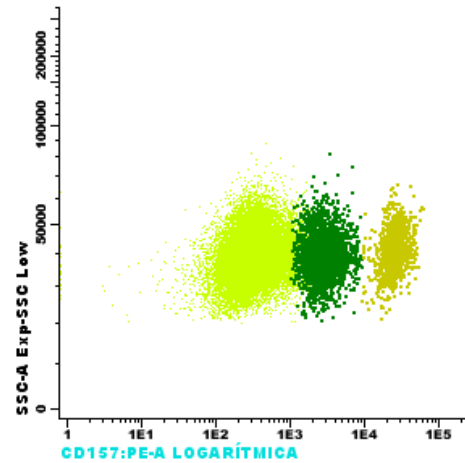
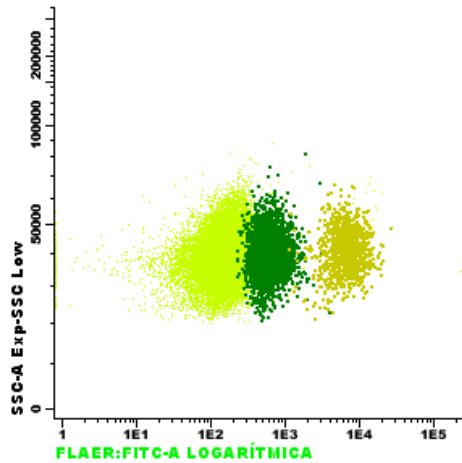
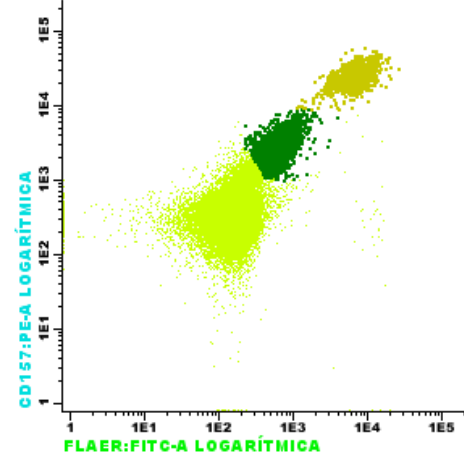
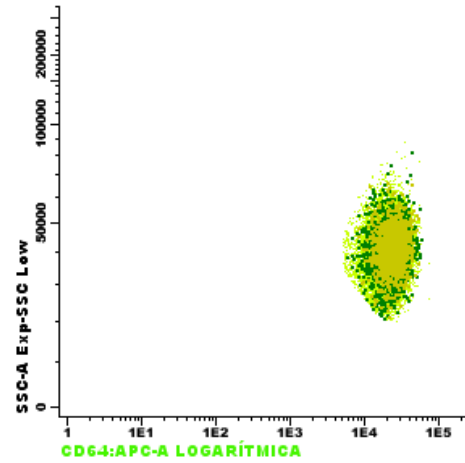
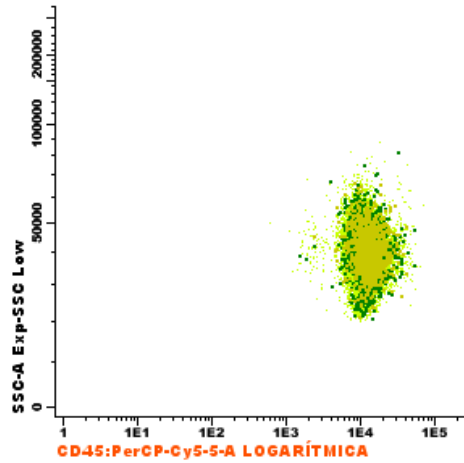


Neutrófilos

- Tipo II 6%
- Tipo III 91%
- Clon HPN 97%

Caso clínico II

Análisis de monocitos



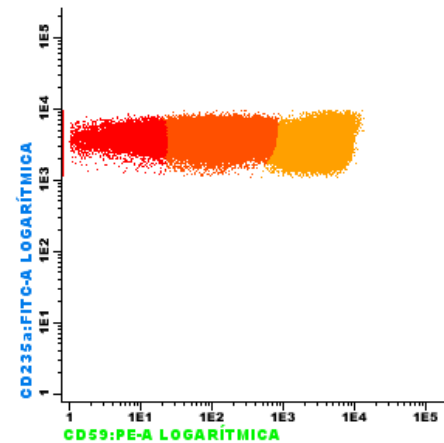
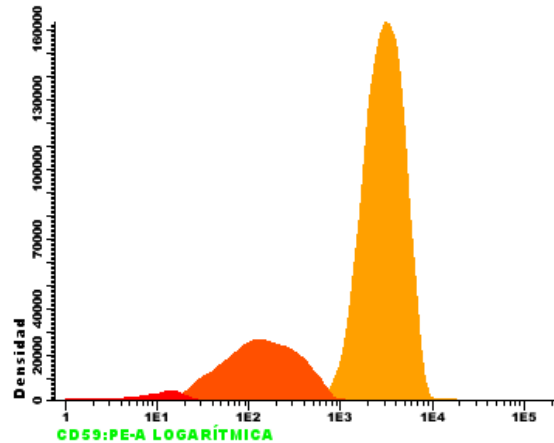
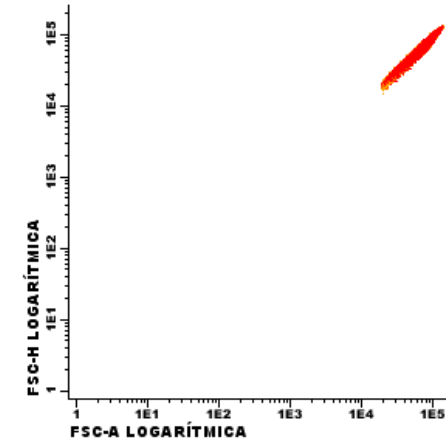
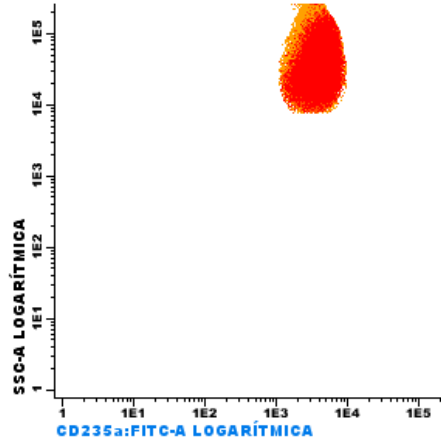
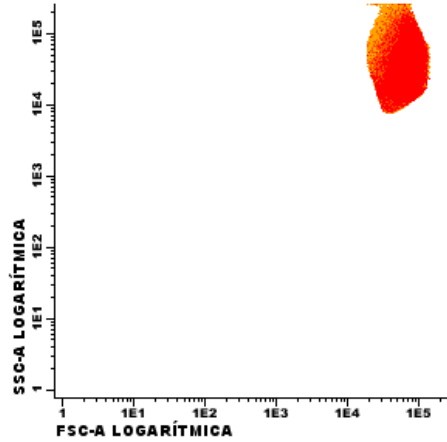
Monocitos:

- Tipo II 8%
- Tipo III 89%
- Clon HPN 97%

Caso clínico II

Análisis de hematías

Panel de hematías: **CD235** / **CD59**



Hematías:

- Tipo II 21%
- Tipo III 10%
- Clon HPN 31%

Caso clínico II

Información clínica final

- Diagnóstico de HPN clásica / clínica / hemolítica
 - Clon HPN en neutrófilos: 97%
 - Clon HPN en monocitos: 97%
 - **Clon HPN en hematíes: 31% (tipo II 21% y tipo III: 10%)**
- **Sin detección de variantes clínicamente significativas del gen *PIGA***
- Se inició tratamiento con inhibidor de C5

Contenido



- Punto de partida
- Citometría de flujo en hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
 - Poblaciones leucocitarias
 - Clon eritroide: “el gran olvidado”
- Monitorización de células HPN: ¿Tenemos algo nuevo?
- Casos clínicos peculiares
- Conclusiones

Conclusiones

- La citometría de flujo es imprescindible en la evaluación inicial y monitorización de células HPN
- La comunicación fluida entre clínica y laboratorio permite conseguir un diagnóstico preciso y un adecuado seguimiento
- El tamaño del clon está estrechamente relacionado con la presentación clínica
- Perfil de expresión y discrepancias en el tamaño del clon entre neutrófilos y monocitos sin un significado clínico completamente establecido
- Importancia del clon HPN eritroide en el pronóstico y monitorización de la terapia anti-complemento: ¿estudio en reticulocitos?
- La monitorización del bloqueo del complemento debe adaptarse al tipo de inhibidor administrado
- Un mayor conocimiento del tamaño y composición del clon HPN pueden mejorar la toma de decisiones clínicas y los resultados de de la terapia

Gracias por su atención





6^o CURSO PRÁCTICO
CITOMETRÍA
DE **FLUJO**

ACTUALIZACIÓN EN NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS Y RELEVANCIA
DE LAS POBLACIONES
RESIDUALES NO TUMORALES