

Expresión de WASp por citometría de flujo para el diagnóstico de Wiskott-Aldrich: un método sencillo y rápido actualmente disponible en México

RA Cano-De la Vega,* Héctor Gómez-Tello,** SE Espinosa-Padilla,*** ME González-Serrano***

RESUMEN

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una inmunodeficiencia primaria bastante compleja ligada al cromosoma X. Debida a la mutación en el gen que codifica para la proteína WAS (WASp), que se expresa en células hematopoyéticas, participa en la formación del citoesqueleto de las células y, por lo tanto, en la movilidad celular, la interacción célula-célula, la regulación inmune, la señalización celular y la citotoxicidad. El WAS clásico consiste en la tríada: trombocitopenia con plaquetas pequeñas, infecciones recurrentes y eczema. El tratamiento está basado en un programa de nutrición adecuado, terapias antimicrobianas y gammaglobulina sustitutiva; el pronóstico del trasplante, única cura conocida, depende de que éste se realice en etapas tempranas de la vida, preferentemente en los primeros meses, lo que convierte al diagnóstico temprano en algo sumamente decisivo. El diagnóstico puede ser muy difícil, debido a los fenotipos clínicos atípicos y a la imposibilidad de realizar análisis de mutación del gen a todos los probables casos. Por ello, la expresión WASp por citometría de flujo es un método sencillo, rápido y aplicable para detectar la enfermedad, mismo que está actualmente disponible en la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

Palabras clave: Wiskott-Aldrich, citometría, diagnóstico, trasplante, inmunodeficiencia primaria.

ABSTRACT

The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a fairly complex X-linked primary immunodeficiency. Due to mutation in the gene encoding the WAS protein (WASp), which is expressed in hematopoietic cells, is involved in the formation of the cytoskeleton cells and thus in cell mobility, cell-cell interaction, immune regulation, cell signaling and cytotoxicity. WAS classic consists of the triad: thrombocytopenia with small platelets, recurrent infections and eczema. The treatment is based on a program of adequate nutrition, antimicrobial therapies and replacement gammaglobulin; prognosis of transplantation, only known cure, improves if it is performed early in life preferably in the first months, making early diagnosis very crucial. The diagnosis can be very difficult due to atypical clinical phenotypes and the inability to perform mutation analysis of the gene at all probable cases. Therefore WASp expression by flow cytometry is an easy, quick and applicable test to detect the disease; it is currently available in Immunodeficiency Research Unit of the National Institute of Pediatrics.

Key words: Wiskott-Aldrich, cytometry, diagnosis, transplant, primary immunodeficiency.

* Estudiante de Pregrado, Licenciado en Medicina. Universidad Autónoma Metropolitana.

** Hospital del Niño Poblano.

*** Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias. Instituto Nacional de Pediatría.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Wiskott-Aldrich es una inmunodeficiencia primaria bastante compleja y ligada al cromosoma X. Alfred Wiskott, pediatra alemán, expuso en 1937 por primera vez el síndrome, describió a tres hermanos con una microtrombocitopenia, eczema, diarrea e infecciones recurrentes, con patrón hereditario. Posteriormente Robert Aldrich, pediatra estadounidense, en 1954 comprobó que la herencia se encuentra ligada al cromosoma X, al estudiar 16 varones afectados en seis generaciones de una misma familia, caracterizados por una inmunodeficiencia humoral y celular con elevada probabilidad de producir autoinmunidad y/o malignidad. En 1994 se identificó al gen responsable: una mutación de la proteína WAS (WASp).¹

El gen se localiza en el cromosoma X (Xp11.22-p11.23) y codifica para una proteína conformada por 502 aminoácidos denominada WASp, que se expresa únicamente en el citoplasma de las células hematopoyéticas (*Figura 1*). Es multifuncional, ya que está implicada en la movilidad celular, la interacción célula-célula, la regulación inmune, la señalización celular y la citotoxicidad, que afectan a la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, y a la homeostasis de las plaquetas.²

La molécula WASp se organiza en varios dominios funcionales; el dominio VCA, ubicado en el extremo COOH-, juega un papel clave en la regulación de la polimerización y la formación de filamentos de

actina, que forman a su vez el citoesqueleto de las células.²

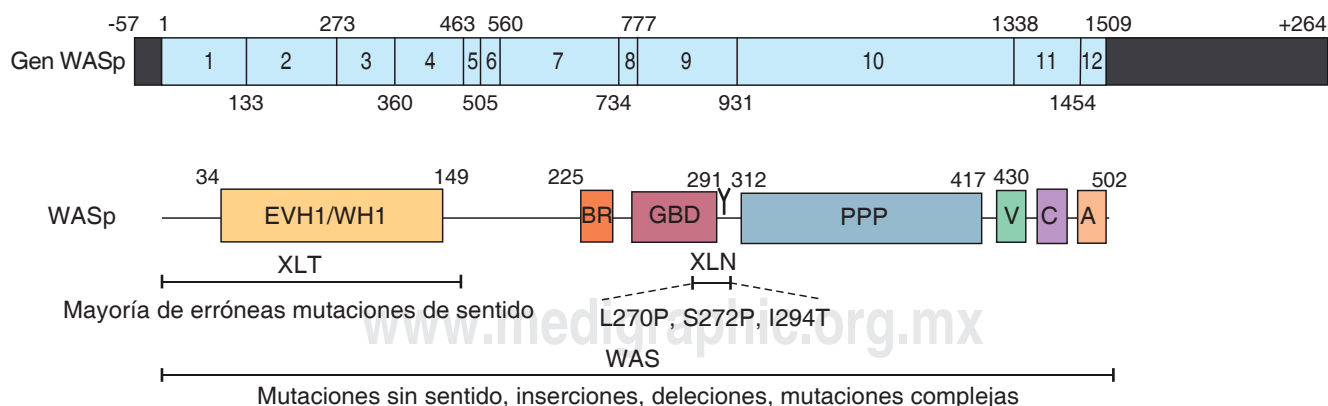
El WASp juega también un papel significativo en la migración celular, ya que facilita la formación de podosomas. Los podosomas son estructuras altamente dinámicas de adhesión, que se encuentran presentes principalmente en monocitos, macrófagos, osteoblastos y células dendríticas. En el WAS los macrófagos están desprovistos completamente de podosomas, presentando adhesión defectuosa y quimiotaxis suprimida.

Asimismo existe un defecto en la fosforilación de la tirosina en la posición 291, lo que dificulta la formación del complejo WASp-WIP, paso esencial para la generación de la copa fagocítica, crucial para la ingestión de cuerpos extraños por los macrófagos.²

Se han identificado más de 218 mutaciones únicas en el gen;⁴ la gama de mutaciones más comunes incluye: mutaciones en los exones 1-3, mutaciones en sitios de empalme, deleciones cortas y mutaciones sin sentido.

Estas mutaciones en el gen WASp se manifiestan en cuatro fenotipos distintos:

- 1) WAS clásico.
- 2) Variante XLT (trombocitopenia ligada al cromosoma X).
- 3) Trombocitopenia intermitente.
- 4) Neutropenia congénita ligada al X, sin ninguna característica clínica de los síndromes anteriores.¹



Arriba está representado el gen WAS que consta de 12 exones, abajo del gen se indica el número de nucleótido por el cual inicia cada uno de los exones. Abajo se ilustra WASp con sus dominios: EVH1/WH1, dominio homólogo a Ena-Vasp/dominio homólogo a WASp 1; BR, región básica; GBD, dominio de unión a Cdc42/Rac GTPase; Y, tirosina en la posición 291; PPP, región rica en prolina; V, dominio homólogo a verprolina; C, dominio central u homólogo a cofilina homology; A, dominio ácido; WIP, proteína de interacción a WASp; PIP₂, fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato; Cdc42, proteína de control de la división celular homóloga a la proteína 42; SH3, dominio homólogo a Src 3; Arp2/3, proteínas 2 y 3 relacionadas a actina.³

Figura 1. Representación esquemática del gen WAS y los dominios proteicos.

Los pacientes se dividen en dos grupos:

- Con mutaciones que permiten la expresión de la proteína de tamaño normal pero en cantidad reducida. Tienen fenotipo XLT (puntuación de 1-2 en el *score* clínico).
- Con mutación donde los linfocitos no pueden expresar WASp. Son propensos a tener fenotipo WAS clásico (puntuación 3-4 del *score* clínico).¹

Este sistema de puntuación está dado por los signos y síntomas clínicos (*Cuadro I*).

La puntuación del 1 al 5 está dada para evaluar la severidad clínica, 5 es causado por enfermedad autoinmune o malignidad, más común como progresión de WAS clásico.

WAS CLÁSICO

La incidencia real se desconoce porque está subdiagnosticada; sin embargo, se estima entre 1/20,000 nacidos vivos por año.⁴ En el registro del Instituto Nacional de Pediatría se cuentan 17 pacientes con este diagnóstico y 57 en el registro latinoamericano de inmunodeficiencias primarias. La tríada clásica consiste en: trombocitopenia con plaquetas pequeñas, infecciones recurrentes y eczema (*Figura 2*).¹

Las primeras manifestaciones se hallan presentes desde el nacimiento y estriban en petequias, hematomas y diarrea con sangre; esta diátesis hemorrágica es debida a la trombocitopenia. Existe un aumento del ries-

go de hemorragia intracraneal durante el parto vaginal, y tanto ésta como la hemorragia excesiva tras la circuncisión son un indicio para el diagnóstico precoz.

Las infecciones pueden ser de moderadas a graves, pero sobre todo recurrentes, incluyendo entre las más comunes: otitis media con drenaje de material purulento o neumonía causada por bacterias.

El eczema se presenta ya sea leve o severo y localizado o generalizado; bacteriano, vírico y/o fúngico, caracterizado por la pobre respuesta al tratamiento.^{2,5}

Al menos que se logre la reconstitución hematológica e inmune con el trasplante de células hematopoyéticas o la terapia génica, los pacientes con WAS son propensos a desarrollar con el paso del tiempo enfermedades autoinmunes, linfoma u otros tipos de cáncer, lo que lleva a la muerte temprana.⁵

El tratamiento está basado en un programa de nutrición adecuada, terapias antimicrobianas y el uso profiláctico de la terapia con inmunoglobulinas; la esplenectomía sólo está indicada en algunos casos y el trasplante de médula ósea es el único que ha mejorado significativamente la esperanza de vida de los pacientes con WAS.⁶

IMPORTANCIA DE UN DIAGNÓSTICO TEMPRANO

En el síndrome de Wiskott-Aldrich el éxito del trasplante de médula ósea depende en gran parte de que éste se realice en edades muy tempranas, preferiblemente antes de los dos años de edad, por lo que es importante reconocer los signos y síntomas iniciales para que sean diagnosticados y tratados oportunamente.⁷ Se observa una tasa de supervivencia del 80% en pacientes que reciben trasplantes de HLA-idénticos; cuando el trasplante es exitoso, los defectos hematológicos e inmunológicos se corrigen, y el eczema se resuelve.⁶

Debido a que el trasplante alogénico es la única cura conocida para el WAS, es mejor que el paciente reciba el trasplante lo antes posible, en los primeros meses de vida. Esto se debe a que los niños con WAS corren el riesgo de morir por una infección grave antes de que el trasplante permita que la función del sistema inmune sea restablecida, o en su defecto, un niño que ya ha tenido infecciones graves podría estar muy débil o

Cuadro I. Sistema de puntuación que define los fenotipos clínicos asociados con mutaciones WAS.

	XLN	iXLT	XLT	WAS clásico			
Puntuación	0	< 1	1	2	3	4	5
Trombocitopenia	-	±	+	+	+	+	+
Plaquetas pequeñas	-	+	+	+	+	+	+
Eczema	-	-	-	(+)	+	++	-(+)/+/++
Inmunodeficiencia	-(+)	-	-(+)	(+)	+	+	(+)/+
Infecciones	-(+)	-	-	(+)	+	+/++	-(+)/+/++
Autoinmunidad o malignidad	-	-	-	-	-	-	+
Neutropenia congénita	+	-	-	-	-	-	-
Mielodisplasia	±	-	-	-	-	-	-

XLN: neutropenia ligada al X, iXLT: trombocitopenia ligada al X intermitente, XLT: trombocitopenia ligada al X, WAS clásico: síndrome de Wiskott-Aldrich clásico.

Trombocitopenia con plaquetas pequeñas



Figura 2. Tríada clásica de WAS.

con secuelas debido a las infecciones y hemorragias frecuentes, para tolerar un trasplante.⁸

Un mejor pronóstico de WAS gracias al trasplante de médula ósea convierte al diagnóstico temprano en algo crucial. Sin embargo, el diagnóstico precoz es a veces muy difícil, debido a que los pacientes muestran fenotipos clínicos atípicos y es difícil realizar el análisis de mutación del gen en todos los casos posibles.

El estudio de la expresión WASp en linfocitos T CD3+ por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-WASp es un método sencillo, rápido y aplicable para la detección de WAS.⁵

DATOS DE LABORATORIO

WASp se expresa en células madre CD34+, así que toda la estirpe de células derivadas es funcionalmente anormal.

Los hallazgos de laboratorio más comunes son:

- Número de linfocitos circulantes normal, discreta o francamente disminuido. A expensas de linfocitos T.
- Linfocitos B normal o moderadamente disminuidos.
- Proliferación *in vitro* de linfocitos T para antígenos específicos y anti-CD3 es reducida.
- Niveles séricos de IgA e IgE están aumentados.
- Niveles de IgG e IgM por lo general dentro del rango normal.
- Respuesta de anticuerpos ante los antígenos T-independientes puede verse afectada (por ejemplo antígenos polisacáridos).
- Anemia hemolítica con Coombs positivos, en caso de autoinmunidad.
- Linfopenia y anemia ferropénica por la pérdida de glóbulos rojos.
- Trombocitopenia con recuentos de plaquetas entre 10,000 y 400,000.³
- Plaquetas morfológicamente pequeñas.⁹

Dos de los componentes de la tríada clásica (eczema e infecciones recurrentes) a menudo están ausentes en la evaluación inicial o son de complejo diagnóstico, incluso en aquellos pacientes que desarrollan posteriormente un fenotipo clásico. Por lo tanto, son de primera necesidad las pruebas de laboratorio para establecer el diagnóstico.

La ausencia o una cantidad reducida de WASp en linfocitos de pacientes con WAS por citometría de flujo es una prueba que permite el diagnóstico rápido en comparación al diagnóstico definitivo que se obtiene mediante la detección de la mutación en el gen que codifica para WASp.¹⁰

CITOMETRÍA DE FLUJO

Representa un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión.¹¹

El fundamento básico de este estudio es simple: pasar células en suspensión alineadas por delante de un haz luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora.

Dentro de las aplicaciones clínicas de la citometría de flujo se encuentra la inmunofenotipificación, que es el proceso para determinar marcadores expresados en la superficie celular. Esta detección se hace empleando anticuerpos monoclonales antígeno-específicos marcados con un fluorocromo dirigidos al marcador que queremos evaluar.

La citometría de flujo también permite conocer aspectos físicos de la célula (como tamaño y complejidad) y determinar la presencia de determinados antígenos en la superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo.¹¹

Por ejemplo, en el estudio de los pacientes con WAS, empleamos un anticuerpo monoclonal dirigido contra WASp y otro anticuerpo monoclonal específico para CD3, de este modo podemos identificar a los linfocitos T que son CD3+ y buscar directamente sobre ellos la presencia o ausencia de WASp. En la *figura 3* se representa esquemáticamente el procedimiento para determinar la presencia o ausencia de WASp en linfocitos T por citometría de flujo.

Estas características la vuelven muy útil en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias (*Cuadro II*).

CASO CLÍNICO

Masculino de tres meses, nacido en Puebla por parto eutócico, producto de gesta: 1, peso: 2.95 kg y talla: 49 cm. Con antecedentes de consanguinidad de tercera línea, sin antecedente de varones afectados en la rama materna. Aplicación de BCG y hepatitis B sin complicaciones.

El padecimiento actual inició a los dos meses con palidez de tegumentos progresiva y fatiga a la alimentación; acudió al médico quien diagnosticó anemia microcítica e hipocrómica.

Posteriormente se detectó hemoglobina 6.1, hematocrito 18.4, leucocitos 19,000, VCM 61, plaquetas 1,000; ingresó al hospital y se transfundieron dos concentrados eritrocitarios, fue egresado por mejoría.

Nuevamente, la madre notó palidez y el bebé inició regurgitaciones con rasgos de sangre y dos eventos de hematemesis franca. Fue referido al hospital donde se corroboraron dos evacuaciones melénicas abundantes,

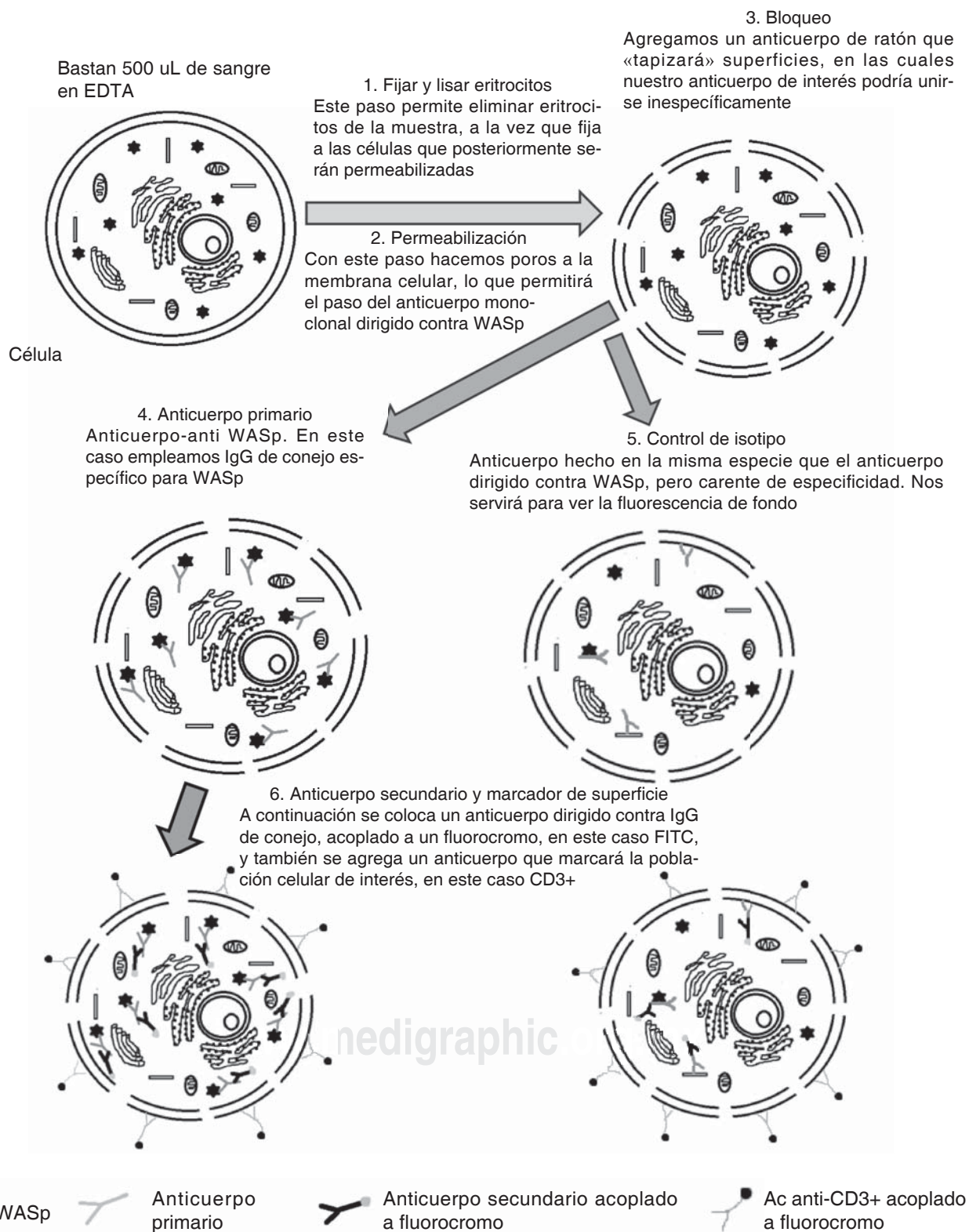


Figura 3. Método empleado en el INP para determinar la expresión de WASp por citometría de flujo.

Cuadro II. Ventajas de la citometría de flujo.

Analiza un número estadísticamente significativo de células (1×10^3 - 1×10^5 células)
 Realiza múltiples marcajes de una sola célula
 Examina en corto tiempo (5,000 eventos por segundo)
 Alta sensibilidad y objetividad
 Obtiene medidas cuantitativas: discrimina las células según la cantidad de marcador
 Define subpoblaciones complejas¹¹

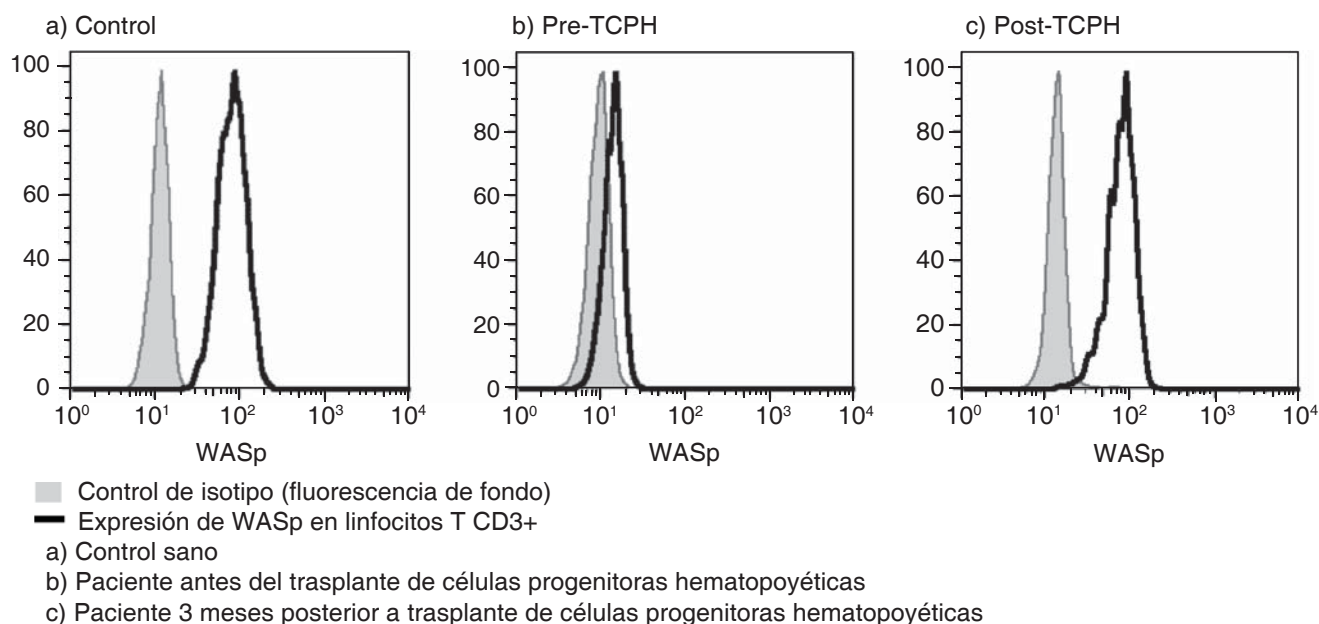


Figura 4. Expresión de WASp en linfocitos T CD3+ por citometría de flujo.

palidez, sin ictericia, fontanela anterior abierta, amígdalas palatinas no visibles, púrpura húmeda en paladar y dos úlceras de 2 mm, sin adenomegalias, con soplo holosistólico eyectivo en foco pulmonar, extremidades superiores con petequias, eczema en pabellones auriculares.

Laboratorios: hemoglobina 7.4, hematocrito 22%, CMHC 32.9, VGM 86, leucocitos 16,800, linfocitos 18%, neutrófilos 74%, plaquetas 57,000, VPM 7.6. Pruebas de función hepática normales. Amiba en fresco positiva a *Entamoeba histolytica*. Hemocultivo periférico positivo a *S. hominis*. IgE 1,360 UI/mL, IgG 695 mg/dL, IgA 79 mg/dL, IgM 17 mg/dL. Anticuerpos contra CMV: IgG 39.1 AU/mL e IgM 0.11 AU/mL. Linfocitos 2,444, CD3 28% (689), CD4 23% (579), CD8 3.3% (81). Mucosa friable y que sangraba con facilidad al paso del endoscopio.

Se sospechó síndrome de Wiskott-Aldrich, y se solicitó apoyo a la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría para corroborar el diagnóstico. Se realizó determinación de WASp, confirmándose el diagnóstico por la ausencia de expre-

sión de proteína WASp en linfocitos T CD3+. El paciente fue trasplantado exitosamente a la edad de un año dos meses y el estudio de control mostró expresión normal de WASp, lo que concuerda con el quimerismo al 100% postrasplante (Figura 4).

BIBLIOGRAFÍA

1. Albert MH, Notarangelo LD, Ochs HD. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Current Opinion in Hematology*. 2011; 18(1): 42-48.
2. Notarangelo LD, Miao CH, Ochs HD. Wiskott-Aldrich syndrome. *Current Opinion in Hematology*. 2008; 15(1): 30-36.
3. Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013; 1285: 26-43.
4. Piirila H, Valiaho J, Vihinen M. Immunodeficiency mutation databases (ID bases). *Human Mutation*. 2006; 27(12): 1200-1208.
5. Román-Jiménez YN, Blancas-Galicia. Síndrome de Wiskott-Aldrich. *Revista Alergia México*. 2010; 57: 171-175.
6. Dibbern DA Jr, Kaliner MA. Wiskott-Aldrich syndrome, treatment and management. *Drugs and Diseases [Inter-*

- net]. 2012; 8-11. Available in: emedicine.medscape.com/article/137015-treatment.
7. Kanegane H, Nomura K, Miyawaki T, Sasahara Y, Kawai S, Tsuchiya S et al. X-linked thrombocytopenia identified by flow cytometric demonstration of defective Wiskott-Aldrich syndrome protein in lymphocytes. *Blood*. 2000; 95(3): 1110-1111.
 8. American Society for Blood and Marrow Transplantation 2011. Recommended timing for transplant consultation [Internet]. Available in: Marrow.org/md-guidelinesm.
 9. Kawai S, Minegishi M, Ohashi Y, Sasahara Y, Kumaki S, Konno T et al. Flow cytometric determination of intracytoplasmic Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood lymphocyte subpopulations. *Journal of Immunological Methods*. 2002; 260(1-2): 195-205.
 10. Yamada M, Ohtsu M, Kobayashi I, Kawamura N, Kobayashi K, Ariga T et al. Flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein in lymphocytes from WAS patients and their familial carriers. *Blood*. 1999; 93(2): 756-757.
 11. Barrera-Ramírez DS, Pérez-Ramos, Zamora C. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2004; 17: 42-55.

Dirección para correspondencia:
ME González-Serrano
Insurgentes Sur Núm. 3700 C,
Col. Insurgentes Cuicuilco,
Deleg. Coyoacán, México, D.F.
Tel: (55) 10840900, ext. 1866
E-mail: mgonzalezs@pediatria.gob.mx