

**Importancia del diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna como manejo de anemia aplásica con población celular hemática deficiente de GPI: Revisión Literaria**

**Daniela Alexandra Castro Córdoba**

**Asesora interna:**

**Esp. Ana lucía Oliveros Rozo**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Trabajo de grado**

**Bogotá, noviembre 2020**

**Agradecimientos**

*A mis papas y mi hermano que estuvieron dándome apoyo incondicional y fortaleciendo la inspiración que día a día aportaría a este trabajo de grado para cumplir mis sueños.*

*Mi hermana, que incentivo a plasmar nuevas ideas para contribuir a la sociedad y darme ánimo para levantarme cada día con ánimo para llevar a cabo mis 5 años de carrera profesional.*

*Mi alma máter, la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca la cual me instruyo y capacitó para cumplir con mi primer gran logro de ser una profesional integra, así mismo los docentes que me guiaron por el mejor camino para mi formación como bacterióloga.*

*A mi asesora interna, brindando todo su tiempo para capacitarme para la formación del trabajo de grado y confiando en mis capacidades profesionales para la creación del mismo desde el primer planteamiento propuesto para así construir el modelo deseado.*

## Tabla de contenido

|  | <b>Pag</b> |
|--|------------|
| <b>1. Título</b>   | <b>4</b>   |
| <b>2. Resumen</b>  | <b>4</b>   |
| <b>3. Descripción del trabajo de grado</b>   | <b>5</b>   |
| <b>3.1. Planteamiento del problema</b>   | <b>6</b>   |
| <b>3.2. Justificación</b>  | <b>6</b>   |
| <b>3.3. Objetivos</b>  | <b>7</b>   |
| <b>3.3.1. Objetivo general</b>   | <b>7</b>   |
| <b>3.3.2. Objetivos específicos</b>  | <b>7</b>   |
| <b>4. Antecedentes</b>   | <b>7</b>   |
| <b>5. Marco teórico</b>  | <b>12</b>  |
| <b>5.1.1. Definición de Hemoglobinuria paroxística Nocturna</b>                    | <b>12</b>  |
| <b>5.1.2. Fisiopatología de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>             | <b>13</b>  |
| <b>5.1.3. Complicaciones de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>             | <b>15</b>  |
| <b>5.1.4. Diagnóstico de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>                | <b>17</b>  |
| <b>5.1.5. Tratamiento para Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>                 | <b>21</b>  |
| <b>5.2.1. Definición de anemia aplásica</b>  | <b>23</b>  |
| <b>5.2.2. Diagnóstico de Anemia aplásica</b>                                       | <b>24</b>  |
| <b>5.2.3. Tratamientos de la Anemia aplásica</b>                                   | <b>25</b>  |
| <b>5.3.1. Anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>                | <b>27</b>  |
| <b>5.3.2. Fisiopatología anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b> | <b>27</b>  |
| <b>5.3.3. Diagnóstico anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>    | <b>29</b>  |
| <b>5.3.4. Tratamiento anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>    | <b>30</b>  |
| <b>5.4. Dificultad en el diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna</b>    | <b>30</b>  |
| <b>6. Metodología</b>  | <b>33</b>  |
| <b>6.1. Tipo de estudio</b>  | <b>33</b>  |
| <b>6.2. Población</b>  | <b>34</b>  |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>6.3. Muestra</b>                                 | <b>34</b> |
| <b>6.4. Criterios de inclusión</b>                  | <b>35</b> |
| <b>6.5. Criterios de exclusión</b>                  | <b>35</b> |
| <b>6.6. Procedimiento y análisis de información</b> | <b>35</b> |
| <b>7. Resultados</b>                                | <b>36</b> |
| <b>7.1 Análisis de resultados</b>                   | <b>41</b> |
| <b>8. Discusión</b>                                 | <b>48</b> |
| <b>9. Conclusiones</b>                              | <b>51</b> |
| <b>10. Recomendaciones</b>                          | <b>54</b> |
| <b>11. Referencias bibliográficas</b>               | <b>55</b> |
| <b>12. Anexos</b>                                   | <b>64</b> |

## **Tablas**

**Tabla 1.** Síntesis de información documental Importancia del diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna como manejo de anemia aplásica con población deficiente de GPI.

**Tabla 2.** Clasificación de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

**Tabla 3.** Anticuerpos monoclonales y fluorocromos utilizados por la técnica de citometría de flujo para el diagnóstico de clones compatibles con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna

## **Tabla de figuras**

**Figura 1.** Estructura de la proteína de anclaje GPI.

**Figura 2.** Proteínas reguladoras de complemento CD55 y CD59 ancladas a GPI

**Figura 3.** Esquema de activación de las tres vías de complemento

**Figura 4.** Regulación del sistema complemento por CD55 y CD59

**Figura 5.** Análisis de muestra por citometría de flujo en paciente con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna

**Figura 6** Algoritmo para la identificación de causas de aplasia en un paciente en estudio

## **1. Título: Importancia del diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna como manejo de anemia aplásica con población celular hemática deficiente de GPI: Revisión Literaria**

### **2. Resumen**

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) es una enfermedad de carácter clonal adquirido por parte de las células madre pluripotenciales de la médula ósea que dan lugar a células hematopoyéticas susceptibles a la acción por complemento, generando hemólisis intravascular a causa de la deficiencia de las proteínas reguladoras de complemento CD55, CD59 y otras que se encuentran ancladas a la proteína de anclaje en membrana celular Glicosilfosfatidilinositol (GPI) la cual no se encuentra sintetizada por mutaciones de gen PIG-A. El diagnóstico se basa en técnicas de complemento como test de Ham, Sucrosa y la técnica especializada Gold estándar como la citometría de flujo, seguidamente el manejo con Eculizumab, inmunosupresores y trasplante de células madres aumenta la supervivencia de los pacientes. Finalmente puede generar complicaciones como el desarrollo de anemia aplásica y estar presente en pacientes previamente diagnosticados con anemia aplásica.

En la revisión se analizó un total de 68 artículos de los cuales 60 se sometieron a revisión estadística demostrando temas de HPN, anemia aplásica y relación de ambas, obteniendo mayor información en el año 2012, 2013 y 2015 en el continente americano; a partir de lo anterior se infirió en la importancia de diagnosticar HPN en pacientes con anemia aplásica, debido a que se puede ampliar el margen de tratamientos aplicados a estos pacientes como concomitantes entre Eculizumab e inmunosupresores, de la misma forma demostrar que los clones HPN pueden determinarse como biomarcadores de una respuesta positiva al tratamiento con inmunosupresores en pacientes con anemia aplásica. Por último, esta revisión literaria permitió resaltar que el diagnóstico en la técnica por citometría de flujo es complicado por poca accesibilidad y problemas pre analíticos y analíticos, sin embargo, es recomendable mejorar las técnicas y enfatizar en el diagnóstico de la misma para el manejo de anemia aplásica.

**Palabras clave:** Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, anemia aplásica, citometría de flujo, Eculizumab, Inmunosupresores.

### **3.Descripción del trabajo de grado**

En primera instancia, este trabajo de grado se basa en expresar la importancia en el diagnóstico de HPN en personas que presenten anemia aplásica mediante la búsqueda en bases de datos sobre referencias documentales que demuestren bases teóricas sobre los temas de interés, con el fin de determinar y afianzar el conocimiento de una metodología adecuada para el diagnóstico de la enfermedad y posteriormente aplicar tratamientos apropiados de la patología como alternativa en el manejo de la anemia aplásica los cuales serán plasmados en los resultados del mismo.

De la misma forma, tener conocimiento sobre los principales inconvenientes para el diagnóstico oportuno de HPN como resultado del análisis de la literatura consultada, de modo que se identifiquen las dificultades para el diagnóstico en el área de salud e investigación teniendo en cuenta falta de información sobre la enfermedad, dificultad de acceso a metodologías especializadas como la citometría de flujo, errores en la estandarización de procesos del mismo e identificación de errores pre analíticos y analíticos; con en base a lo anterior, se argumenta la falta de identificación de HPN en la población y así mismo en poblaciones con anemia aplásica que requieren un nuevo enfoque diagnóstico como la presencia de clones deficientes de GPI.

De acuerdo a lo anterior, se identificó la estrecha relación entre la HPN y la anemia aplásica, enfatizando este vínculo mediante un análisis exhaustivo de ambas patologías bajo los parámetros de significado, fisiopatología, métodos diagnósticos, interferencias, tratamientos y relación entre ellas.

Finalmente, se aplicó el procedimiento metodológico que incluye selección de documentos bajo parámetros descritos para llevar a cabo un desarrollo estadístico del año de publicación, lugar y temas aplicados. A partir de esto se procede a un análisis descriptivo que enfatice la importancia en la relación de las patologías bajo diferentes aspectos y así llevar a cabo una discusión teniendo como referencia estudios científicos previos frente al

análisis del trabajo de grado realizado. Por último, el contenido de conclusiones congrega las determinaciones analizadas en los resultados del trabajo y las bases documentales utilizadas como respuesta a los objetivos planteados y la pregunta problema propuesta.

### **3.1 Planteamiento del problema**

¿El diagnóstico de HPN favorece al manejo de anemias aplásicas con población celular hemática deficiente de GPI?

### **3.2 Justificación**

El trabajo de grado realizado tiene como base el análisis de documentos que informen sobre la enfermedad HPN considerada como patología huérfana o rara, la cual suele presentarse en un grupo pequeño de personas en diferentes poblaciones. A partir de esto, se enfoca en primera medida el desconocimiento que hay sobre esta enfermedad no sólo desde el punto de vista social, sino también la complejidad de identificar por parte del sector salud a una persona que la padece, dando como consecuencia un diagnóstico poco oportuno y un posible tratamiento inadecuado frente a las diversas complicaciones que se puedan presentar.

Así mismo, tener en cuenta la relación que presenta esta enfermedad con la anemia aplásica debido a que esta última, a partir de múltiples referencias documentales, expone casos de pacientes previamente diagnosticados con anemia aplásica que presentan células hemáticas deficientes de GPI compatibles con HPN, infiriendo en la necesidad de un análisis exhaustivo respecto a los parámetros clínicos, diagnósticos y terapéuticos para finalmente expresar la importancia de la estrecha relación que presentan estas dos patologías.

Actualmente en Colombia existe poca literatura acerca de la enfermedad y sus complicaciones, por esta razón es importante la recopilación en bases de datos y otras fuentes de información acerca de la sintomatología, manifestaciones clínicas, complicaciones, métodos diagnósticos, interferencias encontradas, tratamiento apropiado y la estrecha relación con anemia aplásica en donde es necesario un análisis de los parámetros clínicos de esta, en los que se estudien patrones de HPN como hemólisis, ausencia de GPI

entre otros, con el objetivo de establecer el papel que cumple el diagnóstico de esta enfermedad en el tratamiento óptimo de anemia aplásica.

Por último, el trabajo será fundamental para el desarrollo de futuros proyectos de investigación, análisis de casos clínicos y actividades académicas relacionadas con el tema. Además, la viabilidad del este se fundamenta gracias a que la universidad y sus servicios de bases de datos otorgan facilidad en la búsqueda de documentos que respaldan el trabajo final, así mismo herramientas como Google favorecen su desarrollo.

### **3.3 Objetivos**

#### **3.3.1. Objetivo general**

Indagar en bases de datos sobre la importancia en el diagnóstico oportuno de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna en relación a sintomatología, diagnóstico, tratamiento y complicaciones, relacionándola con el manejo de anemia aplásica con población celular hemática deficiente de GPI.

#### **3.3.2. Objetivos específicos**

- Recopilar información en bases de datos sobre la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, sintomatología, complicaciones, diagnóstico y tratamiento
- Describir los principales inconvenientes para el diagnóstico oportuno de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.
- Recopilar información en bases de datos sobre anemia aplásica, sintomatología, diagnóstico y tratamiento.
- Establecer el papel que cumple el diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna en una persona que presenta anemia aplásica para la respuesta óptima de un tratamiento.

### **4. Antecedentes**

La primera descripción que se presentó de esta enfermedad fue expresada por el Dr. Paul Strubing en 1882 <sup>1</sup>. Al presentarse un caso de una joven de 29 años el cual manifestaba fatiga, dolor abdominal y principalmente paroxismos nocturnos de hemoglobinuria. Tras la

situación presentada se mencionó un pseudónimo como síndrome de Marchiafava y Micheli que surge a partir de los médicos analistas, sin embargo, el término de HPN surge en el año de 1925.

En el año de 1937 en un estudio realizado por Ham, se propone la primera prueba para la identificación de células compatibles con HPN; a partir de una reacción realizada en eritrocitos pertenecientes a pacientes con la enfermedad frente a suero acidificado. En los resultados obtenidos se evidenció hemólisis de los eritrocitos tras la exposición, lo cual permitió concluir que éste fenómeno hemolítico está dado gracias a la lisis mediada por complemento y es activada por la acidificación del medio.<sup>1</sup>

Tras el avance tecnológico sobre el conteo de células hemáticas llevadas a cabo en el año de 1956, se diseñaron analizadores automáticos para determinar tanto cuantitativa como cualitativamente las células hemáticas. Entre estos encontramos el desarrollo del citómetro, que permite identificar fácilmente anomalías hematológicas con el objetivo de dar manejo y tratamiento adecuado de la situación clínica presentada.<sup>2</sup>

En 1967, fue señalada la asociación entre HPN y otros trastornos como el desarrollo de anemia aplásica. A partir de este planteamiento, se analiza y corrobora por medio de estudios posteriores la importancia en el diagnóstico oportuno de la HPN en personas con otras anomalías y qué beneficios otorga la terapia inmunosupresora en estos pacientes.<sup>3</sup>

En el año 2001, el trabajo realizado por Sánchez et. al.<sup>4</sup> describe las novedades de la HPN en relación a la patogénesis. Se enfatiza inicialmente en las mutaciones producidas en esta enfermedad a partir de: procesos de adición u omisión de nucleótidos para la codificación de GPI, mutaciones en las cuales hay sustitución de genes que afectan la viabilidad del GPI, cantidad de genes clones compatibles con HPN y mutaciones somáticas. Del mismo modo, la disminución de la fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa y ausencia de las proteínas reguladoras como CD55 y CD59 permiten el desarrollo de la enfermedad.

Se exponen hallazgos referentes a la asociación de la HPN con otros trastornos hematológicos. Entre estos encontramos: tromboembolismo venoso como principal complicación debido a las alteraciones en los mecanismos de coagulación y la prevalencia de insuficiencia de médula ósea siendo mayor en personas con HPN que presentaron

pancitopenia desde moderada a severa generando infecciones y otras anomalías relacionadas, resaltando la similitud entre el desarrollo de la HPN y los defectos cualitativos en los granulocitos y los linfocitos en estudio descritos el mismo año.<sup>5</sup>

Un estudio realizado 4 años después por Meletis et.al.<sup>6</sup>, describe las manifestaciones clásicas de anemia aplásica en pacientes con fenotipo compatible con HPN en sangre periférica, donde están presentes entre el 10 al 60 % de las células deficientes del gen PIG.

Con base a lo anterior, se analiza la presentación de un caso clínico donde un paciente con anemia aplásica presenta alta proporción de células deficientes de la proteína de anclaje GPI. La sintomatología se relaciona con eventos anémicos sin evidencia de infección; en las pruebas analíticas se exalta disminución de LDH, tests de Coombs y Ham con resultados negativos. Posteriormente el aspirado de médula ósea demostró hipoplasia celular y tras un análisis por sistema de micro tipado se demuestra ausencia de CD55 y CD59 en eritrocitos.<sup>6</sup>

Otra revisión realizada en esa época recopila información de 95 citometrías de flujo en el laboratorio del Departamento de Hematología del hospital universitario José Eleuterio González de Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales fueron solicitadas por sospecha de HPN en pacientes tanto hombres como mujeres entre 1 a 87 años. De acuerdo a esto, se identifican los fluorocromos más utilizados como: CD55, CD59, CD14 y CD16 para la detección de células compatibles con HPN en las diferentes líneas hematopoyéticas. Como resultado se identifica una deficiencia de CD55 en 62.1% en glóbulos rojos y 59.1% en monocitos, CD59 en el 47.9%, en glóbulos rojos y 10% en monocitos y finalmente tanto CD14 y CD16 se encuentran ausentes en 49.5% de las muestras analizadas.<sup>7</sup>

Posteriormente, el desarrollo en el manejo y diagnóstico de la HPN llevado a cabo en el 2005 por Parker et.al.<sup>8</sup> permitió inferir sobre las manifestaciones clínicas y complicaciones de la HPN, las cuales varían respecto a los pacientes. Gracias a esto, se desarrolló una clasificación de acuerdo con el tipo de manifestación y complicación que se presente facilitando el diagnóstico de la enfermedad. Las subcategorías encontradas son: HPN clásico, HPN en el contexto de otro trastorno específico de la médula ósea (anemia aplásica) y HPN subclínico en el contexto de otro trastorno de la médula ósea.

También resaltan los criterios diagnósticos esenciales mínimos como lo son: Evidencia de una población de células de sangre periférica anormales tales como la observación de policromatófila, macro o microcitosis e hipocromía, por otro lado, recuento sanguíneo completo, recuento de reticulocitos, concentración sérica de lactato deshidrogenasa (LDH), bilirrubina (fraccionada) y haptoglobina, aspirado de médula ósea, biopsia y citogenética, los cuales son utilizados como metodologías previas para verificar el estado del paciente y descartando diagnóstico diferencial con anemia hemolítica para proceder a metodologías especializadas para el diagnóstico de HPN.<sup>8</sup>

En el año 2006, se evidencia la presencia de una población menor de células sanguíneas tipo HPN en pacientes con anemia aplásica adquirida. Se identificaron un total de 122 pacientes de origen japonés, los cuales presentaban anemia aplásica idiopática sin recibir tratamiento con terapia inmunosupresora. Posteriormente, se administra dosis de ciclosporina durante al menos 6 meses y factor estimulante de colonias granulocíticas en algunos pacientes, y se realiza citometría de flujo para el análisis de muestras a partir de sangre heparinizada con el fin de detectar proporción de células tipo HPN, el cual fue positivo.<sup>9</sup>

Seguidamente, el trabajo realizado por Schubert et. al.<sup>10</sup> expone al Eculizumab como un inhibidor de complemento terminal, demostrándose reducción de la hemólisis intravascular y la necesidad de transfusión en pacientes que presentan HPN así mismo se manifestó un aumento de 2.5 veces en la masa de glóbulos rojos la cual se asocia a un aumento en los niveles de hemoglobina con el fin de disminuir la anemia presentada por hemólisis.<sup>10</sup>

La eficacia en los estudios anteriores, permitieron un gran avance en el tratamiento de la HPN, a partir de esto, en el año 2007 la Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobaron el uso del Eculizumab como tratamiento óptimo de la enfermedad.<sup>11</sup>

Tras el enfoque sobre el tratamiento para la HPN, se aumentan las investigaciones sobre la importancia en el tratamiento de estados adquiridos de insuficiencia de médula ósea. En el 2007, se analiza el uso de factores de crecimiento con el objetivo de potenciar los valores en los recuentos sanguíneos debido a que influyen en la tasa de respuesta a la terapia

inmunosupresora, sin embargo, el beneficio que otorgan estos solo se ve en aquellas personas que presentan una enfermedad menos grave.<sup>12</sup>

Otro tema relacionado se aborda en el año 2008, con el fin de realizar una guía sobre pruebas de HPN en la reunión científica anual de la Sociedad de Citometría clínica en Portland. Sin embargo, la dificultad de crearla de forma unánime para la inmunofenotipificación de las células compatibles con HPN se ve reflejada tras el manejo independiente de cada uno de los laboratorios para la identificación y tratamiento de la enfermedad. Así mismo, las limitaciones de información sobre los diversos procedimientos para las pruebas realizadas no permiten un enfoque único para que todos los centros médicos diagnósticos sigan las recomendaciones inmersas en la guía.<sup>13</sup>

Por otra parte, una recopilación de publicaciones periódicas el mismo año, ponen de manifiesto a la globulina anti-timocitos de caballo (h-ATG) y la ciclosporina como tratamientos sustitutos frente a las opciones como trasplante de médula ósea y andrógenos recomendados en pacientes que presentan anemia aplásica severa sin causa determinada. Se enfatizó en los análisis realizados en 316 pacientes con anemia aplásica, con el objetivo de identificar factores que puedan predecir una respuesta adecuada a la terapia inmunosupresora.<sup>14</sup>

Así mismo en México en el año 2008, se elabora una revisión de casos clínicos en pacientes con diagnóstico de AA/HPN, quienes acudieron al servicio de Hematología general entre los años 1978 - 2004 diagnosticados con HPN mediante el test de Ham, y anemia aplásica tras los resultados otorgados por biopsia de médula ósea. Estos pacientes fueron tratados con andrógenos con el fin de disminuir los eventos hemorrágicos tras presentar poca respuesta al tratamiento inmunosupresor con globulina anti linfocítica y ciclosporina. Posteriormente, se someten a evaluación por citometría de flujo ultra sensible la cual permite detectar pequeñas poblaciones de células deficientes en proteínas de superficie ancladas por GPI.<sup>3</sup>

Otra revisión se realizó en Colombia en el año 2012, debido a la presentación de un caso clínico en un paciente de 26 años con trastorno básico de HPN reflejado en manifestaciones variables, entre estas se destaca la anemia aplásica. Frente a los exámenes realizados se presenta disminución en los niveles de hemoglobina, leucocitos y plaquetas, así mismo, un

test de Coombs negativo y test de Ham positivo sustentan la presencia de la patología. Finalmente, se concluye el caso con muerte del paciente debido a infecciones repetidas, petequias y anemia tras la pancitopenia generada por la HPN.<sup>15</sup>

Por otra parte, la guía clínica realizada por el consenso español para diagnóstico y tratamiento de HPN en el año 2014 realizó una actualización con el fin de informar a la comunidad científica sobre la importancia en el diagnóstico de HPN, así mismo explica la detección del clon HPN mediante el uso de la citometría de flujo, cómo evaluar a las personas que sospechan de la enfermedad y finalmente llevar a cabo el registro nacional e internacional que se debe realizar a tras un nuevo diagnóstico.<sup>16</sup>

En el año 2018, el servicio de HPN del Reino Unido informa la recopilación de información con respecto a diferentes pacientes que presentan HPN de acuerdo con los resultados dados en la prueba de diagnóstico, se sabe que hay alta proporción con insuficiencia en médula ósea. Por otra parte, se evaluó el requerimiento de Eculizumab para el manejo de la anemia aplásica, también aquellos que recayeron mientras lo tomaban y finalmente los pacientes que necesitan otro soporte para el manejo de la patología como lo es la terapia inmunosupresora.<sup>17</sup>

Con respecto a las actualizaciones realizadas en la misma época, se conocen nuevas estrategias las cuales permiten la inhibición del complemento tras dirigir agentes a C5 y C3 que interceptan la cascada del complemento o en su defecto la alteración a nivel de los componentes involucrados en el inicio del proceso inmune. Entre estos encontramos moléculas pequeñas con capacidad de interferir al sistema de complemento, cuando esta es administrada por vía subcutánea.<sup>18</sup>

## **5. Marco Teórico**

### **5.1.1 Definición de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

La HPN se conoce como una enfermedad de carácter clonal adquirido por parte de las células madres pluripotenciales de la médula ósea, las cuales dan lugar a células hematopoyéticas susceptibles a la acción por complemento que genera hemólisis intravascular<sup>19</sup> 8. Tras esta situación, se presenta sintomatología relacionada con paroxismos continuos de hemoglobinuria evidenciado en las primeras horas de la mañana,

sin embargo no es preciso que esta anomalía se presente en eventualidades nocturnas, pueden ser durante el día.

La reacción inmune se origina principalmente por la deficiencia de proteína de anclaje presente en la membrana de células hemáticas Glicosilfosfatidilinositol (GPI) dando como resultado el déficit de proteínas inhibitorias de complemento principalmente CD55 y CD59, las cuales requieren anclarse a la proteína GPI con el fin de regular el sistema complemento y no producir hemólisis inmediata.<sup>20</sup>

Las principales manifestaciones clínicas que surgen son: sintomatología de anemia hemolítica, dolor abdominal, ictericia, signos de insuficiencia medular como hemorragias e infecciones frecuentes, hemoglobinuria, trombofilia, embolismo y también signos y síntomas de alteración neurológica<sup>5 8</sup>. No obstante, estas manifestaciones se presentan de manera muy variable.

De acuerdo con a las manifestaciones, características clínicas y el desarrollo de la HPN en los pacientes, se realiza una clasificación la cual incluye tres subcategorías que incorporan las variaciones que se puedan presentar<sup>8</sup> (Anexo 2). En la HPN clásica se evidencian pacientes con características de hemólisis intravascular como (reticulocitosis, aumento en la concentración de LDH, aumento de bilirrubina indirecta y disminución de Haptoglobina.<sup>3 6 8</sup>

Del mismo modo la HPN en el contexto de otro trastorno específico de médula ósea, incluye a pacientes con antecedentes de anormalidad subyacente de la médula ósea como por ejemplo: anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, mielopatías entre otros.<sup>8 26 27</sup>

Finalmente, los pacientes que hasta el momento no han presentado ninguna característica clínica ni evidencia en análisis de laboratorio, son considerados en la subcategoría de HPN subclínica, debido a que presentan una pequeña población de células deficientes de CD55 y CD59 y no producen el efecto hemolítico esperado, sin embargo, esta subcategoría también se ve relacionada con el desarrollo de síndromes de insuficiencia en médula ósea y únicamente son diagnosticados por la técnica de citometría de flujo ultrasensible.<sup>8</sup>

### **5.1.2 Fisiopatología de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

El desarrollo de la enfermedad está relacionado con la biosíntesis de la proteína GPI la cual permite el anclaje de proteínas reguladoras de complemento como lo son principalmente: factor acelerador de la descomposición del complemento (CD55), inhibidor de membrana de lisis reactiva (CD59) y otras proteínas relacionadas como receptor FcγIIIa CD16, receptor activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPAR), CD52 y factor de restricción homóloga/C8bp, ya que sin ellas se produce la hemólisis mediada por complemento y de acuerdo al tipo de proteína de membrana ausente se determina el grado de la alteración de la enfermedad.<sup>21</sup>

La síntesis de la proteína GPI implica al menos 10 reacciones y una gran variedad de genes, el primer paso para este proceso se lleva a cabo en el retículo endoplásmico donde se transfiere una proteína con péptido señal de unión conocida como la N- acetil glucosamina al fosfatidilinositol, seguidamente se produce una catálisis de este complejo por una enzima codificada por los siguientes genes: PIG-A, PIG-C, PIG-H, GPI1, PIGY, PIGP y DPM2.<sup>19</sup>

En segunda medida, se procede a realizar la des acetilación del complejo N-acetil glucosamina-fosfatidilinositol para formar N-glucosamina-fosfatidilinositol el cual sigue su camino por el retículo endoplásmico con el fin de acetilar el inositol, así mismo la adición de residuos de manosa y fosfoetanolamina para obtener como resultado final la molécula proteica GPI compuesta por una molécula de fosfatidilinositol (PI), glucosamina inmersa en un núcleo de glucano, tres manosas y un fosfato de etanolamina. Finalmente, ésta será insertada en la bicapa lipídica de la membrana plasmática de las células hemáticas.<sup>19</sup> (Anexo 3)

Con base en lo anterior, existen varios genes involucrados para la síntesis de la proteína GPI, sin embargo, se infirió tras varios estudios que el defecto en la formación de la proteína GPI se atribuye principalmente a la mutación somática del gen PIG-A<sup>20 22</sup>.

El gen PIG-A es un gen ligado al cromosoma X, cuyo producto generado es necesario para la transferencia de N-acetil glucosamina al fosfatidilinositol para formar el complejo N-acetil glucosamina-fosfatidilinositol, el cual se considera como primer paso para el desarrollo de la proteína de anclaje GPI<sup>19 20</sup>. Como consecuencia de ello, se da la deficiencia de proteínas ancladas a GPI, entre estas encontramos más de 12 proteínas

dependientes del anclaje, principalmente CD55 y CD59 quienes explican la mayoría de las manifestaciones clínicas de la HPN.<sup>20</sup> (Anexo 4)

El sistema de complemento es un componente del sistema inmune, que posee actividad contra organismos invasores y/o elementos extraños que se encuentren presentes en el organismo. Entre todas las moléculas pertenecientes en el complemento cabe resaltar que la molécula C3 es un elemento clave en el complemento, debido a que su activación es el primer paso para desencadenar la cascada para ejercer su acción correspondiente sobre el organismo.<sup>22</sup>

La reacción generada por este sistema está compuesta por tres fases: el reconocimiento de la amenaza, el procesamiento y finalmente la respuesta por parte del sistema ya sea en la vía clásica o vía de las lectinas para conducir a un proceso de lisis celular por ayuda de componentes como C5 y C9.<sup>23</sup> (Anexo 5)

De acuerdo con lo anterior, se establecen las funciones de las proteínas reguladoras de complemento como CD55 y CD59 quienes actúan sobre el sistema de la siguiente manera: CD59 mediante la interacción directa con el complejo de ataque de membrana para prevenir la formación de poros por bloqueo de segregación de C9 y CD55 mediante la aceleración de la destrucción de la convertasa C3, que se encuentra unida a la membrana con el objetivo de reducir la cantidad de C3.<sup>20</sup> Visto lo anterior, la ausencia de ambas proteínas se manifiesta con hemólisis intravascular. (Anexo 6)

### **5.1.3 Complicaciones de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

Las manifestaciones clínicas presentadas en pacientes con HPN pueden desencadenar un conjunto de complicaciones, las cuales dependen de la fisiopatología de la enfermedad que se esté desarrollando en el organismo que causan las manifestaciones agravantes del estado del individuo que padece la enfermedad.

El tromboembolismo venoso representa una de las complicaciones con mayor pronóstico negativo en estos pacientes, debido a que se presenta en eventos intraabdominales principalmente hepáticos y en las venas mesentéricas, no obstante, estos eventos

trombóticos también pueden reflejarse en las venas portales, esplénicas, renales y cerebrales.<sup>5</sup>

Otra de las complicaciones más comunes que se pueden presentar en pacientes con HPN, es el incremento a la susceptibilidad a las infecciones debido a las alteraciones presentadas tanto en la línea granulocítica como linfocítica de las células hemáticas, como consecuencia, de la lisis mediada por complemento. Del mismo modo, este evento está relacionado con la coexistencia en el fallo de médula ósea, sin embargo, es necesario tener en cuenta otras anomalías presentes para determinar si este también genera susceptibilidad a las infecciones.<sup>5</sup>

Por otro lado, la trombocitopenia puede presentarse de manera severa, generando hemorragias masivas y complicaciones posteriores que aumenta la mortalidad por la HPN.<sup>5</sup> Así mismo, se presenta daño renal progresivo el cual termina en insuficiencia renal generada por depósitos de hemoglobina libre en el riñón.<sup>22</sup>

De manera análoga, la hemoglobina libre también provoca el agotamiento del óxido nítrico el cual tiene un papel fundamental en el mantenimiento del tono muscular liso y la función endotelial normal. Vista la reducción de este compuesto, es probable que la regulación del tono muscular se encuentre alterada provocando espasmos e isquemia del músculo liso que pueden manifestarse con dolor en el pecho, dolor abdominal, disnea e hipertensión arterial o disfagia.<sup>22</sup>

En último lugar, la HPN está relacionada con el desarrollo de anemia aplásica por varios mecanismos patogénicos, sin embargo, no se han descrito con exactitud. Entre estos mecanismos se encuentran el defecto primario de las células madre tras la mutación somática, posteriormente la inhibición inmune de la hematopoyesis y el microambiente anormal que se está presentando en la médula ósea por otros factores predisponentes.<sup>6</sup>

El mecanismo relacionado al defecto primario de las células madre hematopoyéticas con PIG-A, permite inferir en que estas mismas condicionan su crecimiento o supervivencia en el ambiente medular con el fin de expandir el clon mutante del gen en algunos casos, pero, de no ser así la expansión de células hematopoyéticas esperadas no se da y por ende daría lugar a la anemia aplásica.<sup>24</sup>

Cabe resaltar, en los eventos en donde se presenta anemia aplásica como una complicación hematopoyética a raíz de la HPN, se dice que la deficiencia de la proteína GPI es detectable entre el 10-57% en pacientes con anemia aplásica después que han sido sometidos a tratamientos inmunosupresores. De lo contrario, se considera a la HPN como una complicación hematopoyética clonal tardía de la anemia aplásica, dando a inferir un proceso de diagnóstico y tratamientos inadecuados.<sup>5</sup>

#### **5.1.4 Diagnóstico de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

Para el diagnóstico oportuno de HPN, es necesario tener en cuenta varios factores que permiten la identificación adecuada de la patología como, por ejemplo: sintomatología, manifestaciones clínicas y análisis exhaustivo en relación con los resultados obtenidos según las pruebas realizadas referentes a los parámetros hemáticos, química sanguínea, raspado y biopsia de médula ósea. No obstante, se relacionan las medidas antes mencionadas con la prioridad de realizar estudios más especializados que confirmen el desarrollo de la enfermedad.<sup>3 40</sup>

#### **Manifestaciones y exámenes clínicos**

Como criterios esenciales mínimos, en primer lugar, es necesario enfatizar estudios de apoyo como el análisis del historial médico con énfasis en los síntomas de HPN, enfermedad tromboembólica, disfagia, odinofagia, dolor abdominal entre otros.<sup>8</sup> Seguidamente un recuento sanguíneo completo que incluye recuento de reticulocitos donde se muestra una anemia de carácter normocítico normocrómico, con altos niveles en los reticulocitos, sin embargo, este recuento depende del estado de la médula ósea.<sup>8 27</sup> Los análisis de química sanguínea como concentración sérica de lactato deshidrogenasa la cual se encuentra en niveles elevados, bilirrubina (fraccionada), haptoglobina disminuida, estudios de hierro en suero, concentración sérica de creatinina, nitrógeno ureico en sangre, concentración de eritropoyetina y estudios complementarios que determinen la presencia de hemólisis intravascular en el individuo.<sup>8 27</sup> Por otro lado, los estudios para procesos autoinmunes como el test de Coombs, permiten descartar la presencia de anticuerpos causantes de hemólisis.<sup>3</sup>

Exámenes más invasivos como el aspirado de médula ósea son necesarios para el diagnóstico, se recomienda el análisis de este por medio de coloraciones supra vitales y otras como tinción de Perls en casos donde se manifieste problemas en agregados de ferritina entre otros, también es fundamental un análisis citogenético y biopsia medular.<sup>27</sup>

### **Citometría de flujo:**

La citometría de flujo de alta sensibilidad es capaz de detectar la expresión de determinadas proteínas de superficie de las células entre estas, proteínas ancladas a GPI en poblaciones de células en sangre periférica, convirtiéndose en la prueba Gold estándar para el diagnóstico de HPN.<sup>27 54</sup> Esta metodología se fundamenta en la dispersión de luz a través de un fotomultiplicador el cual determina las frecuencias de los genotipos de HPN demostrando sensibilidad, reproducibilidad, selección y valoración de los clones para el diagnóstico.<sup>35</sup>

Así mismo permite identificar, cuantificar y subclasificar de estas células deficientes de GPI en (células tipo I, tipo II y tipo III) la cual presenta una subpoblación variada dentro de células hematopoyéticas y también con la etapa de estas células, con el fin de tener un conocimiento detallado de la distribución celular de la proteína de anclaje de GPI y la expresión de esta en las diferentes células hematopoyéticas.<sup>54</sup>

Posteriormente, se seleccionan los anticuerpos de activación para el marcaje específico de las células como lo son los glóbulos rojos, para realizar este procedimiento se usa un conjugado de anticuerpos CD23a FITC y PE los cuales permiten la identificación específica de los glóbulos rojos maduros.<sup>36</sup> Del mismo modo, la metodología determina la pérdida de las estructuras CD55 y CD59 las cuales se encuentran unidas a GPI como pronóstico de eritrocitos compatibles con HPN, para la búsqueda de estos resultados se utilizan conjugados de CD59 FITC , CD59PE y anticuerpos CD235a FITC.<sup>36 54</sup>

Se establece que el análisis de glóbulos rojos de un paciente con HPN proporciona información de las poblaciones tipo III (con deficiencia completa de las proteínas de anclaje), tipo II (con deficiencia parcial) y tipo I (aquellas que presenta expresión normal).<sup>54</sup> (Anexo 7)

El análisis de expresión de GPI en glóbulos blancos específicamente granulocitos y monocitos, proporciona información relevante sobre el estado de un paciente portador de la enfermedad, debido a que la vida de los granulocitos es más estable que los glóbulos rojos y por lo tanto reflejan una mayor precisión en el tamaño de clon de HPN.<sup>54</sup>

Para el desarrollo de ensayos que permitan la identificación de proteínas de la línea granulocítica y monocítica se resalta la necesidad de utilizar un anticuerpo para cada linaje tales como: FLAER CD24, CD15 y CD45 para delinear granulocitos y FLAER CD 14, CD64 y CD45 para delinear monocitos, posteriormente se identifica el déficit de proteínas de anclaje de varios linajes celulares por medio de los marcadores relacionados a estas líneas celulares como lo son CD24, CD16 y CD66b. En relación con lo anterior, se determina que el ensayo en granulocitos puede detectar de manera confiable los fenotipos de HPN al nivel de 0.02% o más, mientras que en monocitos puede detectar de manera confiable los fenotipos de HPN a > de 0.04%.<sup>36 37 54</sup> (Anexo 8) (Anexo 9)

Del mismo modo, anuncios recientes evaluaron la disponibilidad del anticuerpo CD157 como estructura GPI enlazado la cual es expresada tanto en granulocitos como en monocitos, identificado como un reactivo potencial para la detección de células deficientes de GPI y compararlos directamente con los anticuerpos previamente mencionados de modo que facilita el diagnóstico de clones HPN como servidor simultaneo y efectivo.<sup>55</sup>

El objetivo de la toxina FLAER conocida como una toxina bacteriana de carácter proteico secretada por la bacteria *Aeromonas hydrophila*, es unirse a las estructuras de la superficie celular y como una protoxina inactiva, que se convierte en la forma activa, mediante la eliminación proteolítica de un péptido C-terminal.<sup>54</sup> Al formarse la Aero lisina, da como resultado la oligomerización sobre las estructuras de la superficie resultando en la lisis celular, sin embargo, se realizaron mutaciones puntuales con el fin de obtener una proteína capaz de unirse a GPI tras su previa activación pero evitando su actividad lítica demostrando una proaerolisina mutante con marcador fluorescente para teñir células que contienen proteína GPI y dejar sin color aquellas que son compatibles con HPN.<sup>37 38 54</sup>

En relación con el análisis de los linfocitos en citometría de flujo para determinar el tamaño de clon HPN, se establece que estas células tienen una vida útil prolongada con la presencia de la proteína de anclaje exceptuando aquellos que tras el inicio de la enfermedad presentan

deficiencia de la proteína GPI. A partir de esto se infiere que un diagnóstico de HPN no puede estar sujeto únicamente al análisis por citometría de flujo dirigida a los linfocitos.<sup>54</sup>

### **Pruebas basadas en complemento**

Las pruebas especializadas conocidas para realizar el diagnóstico oportuno de HPN se basan en la prueba de suero acidificado que activa las vías alternativas de complemento (Test de Ham), dando como consecuencia un proceso hemolítico de los glóbulos rojos. El fundamento de esta prueba se basa en que el grado de hemólisis aumenta por acidificación de suero de los pacientes que presentan algunas características en los glóbulos rojos a diferencia de muestras normales, debido a que un sistema de cambio de pH es un factor de modificación para procesos hemolíticos incluyendo reacciones antígeno, anticuerpo y complemento.<sup>39</sup>

Nos obstante el Test de Ham tiene una eficacia limitada, debido a que múltiples resultados fueron reportados como falsos negativos en estudios previamente analizados en pacientes que presentaban HPN debido a que no se detectan de manera confiable pequeñas poblaciones de glóbulos rojos afectados por la prueba con un límite de detección entre 4.2% y 5% , sin embargo, este método se sigue utilizando para el diagnóstico de HPN en lugares donde no es asequible la citometría de flujo.<sup>41 54</sup>

La prueba de Sucrosa, se encuentra entre los métodos con capacidad de diagnosticar a un paciente con HPN, no obstante, no es altamente específico y requiere de estudios complementarios y análisis especializados por citometría de flujo para un diagnóstico oportuno ya que presenta positividad en otras afecciones como anemia megaloblástica y anemia hemolítica autoinmune.<sup>54</sup> La base de esta prueba es la fijación del complemento en los eritrocitos cuando el medio presenta disminución de la potencia iónica generando hemólisis exagerada de los eritrocitos, propiedad característica en células susceptibles a la acción por complemento.<sup>42</sup>

### **Tarjeta de gel de sephacryl (GCT)**

La prueba tarjeta de gel de sephacryl, se basa en el principio de la hemaglutinación después de una reacción antígeno anticuerpo tras la detección de una población de glóbulos rojos deficientes en CD55 y CD59. Esta prueba presenta una sensibilidad que varía entre el 2% al

10% para HPN tipo III (deficiencia completa de proteína de anclaje), a causa de esto no se pueden realizar análisis de carácter cuantitativo y presenta pequeñas limitaciones con el diagnóstico de los otros tipos de HPN tipo I y tipo II, no obstante, esta prueba ha remplazado los ensayos basados por complemento en diversos laboratorios que no tienen accesibilidad a la citometría de flujo.<sup>54</sup>

### **5.1.5 Tratamiento para Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

#### **Manejo con inmunosupresores**

El manejo adecuado de la HPN es notorio tras la implementación de tratamientos, los cuales son destinados a tratar las consecuencias que presenta la patología más que las causas debido que es conocido como un trastorno de las células pluripotenciales.<sup>4</sup> Múltiples estudios demostraron el manejo terapéutico de HPN con el uso de glucocorticoides con el fin de disminuir la acción por complemento,<sup>4</sup> por otra parte el uso de andrógenos facilitó el aumento en la concentración de hemoglobina, evidenciado por pacientes que presentaron anemia aplásica en asociación con HPN a causa de necesidades de transfusión elevadas.<sup>3 4</sup>

Otros tratamientos aplicados a pacientes con HPN están relacionados con el desarrollo de otras patologías como el fallo medular. El tratamiento inmunosupresor con globulina anti-timocitos (ATG) y ciclosporina, produce una intensa depleción de las células T en sangre, bazo, ganglios debido a la lisis mediada por complemento; mientras modula los mecanismos de activación, homing y citotoxicidad de las células T.<sup>28</sup>

Se establece a través de varios estudios realizados en adultos y niños con anemia aplásica la presencia de poblaciones menores de HPN se asocia con una respuesta favorable a tratamientos inmunosupresores aplicados tras el diagnóstico de ambas patologías.<sup>50</sup>

#### **Manejo con trasplante de células madre**

Seguidamente, se han relacionado nuevos protocolos de tratamiento para pacientes que padecen la enfermedad en ausencia de un tratamiento efectivo alternativo. Hoy en día el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas puede considerarse como posible manejo de HPN con el objetivo de tratar los progenitores hematopoyéticos deficientes de GPI, sin embargo, este proceso está asociado a casi el 30% de la mortalidad debido a

múltiples infecciones en el paciente que es sometido al tratamiento, resaltando la enfermedad aguda contra injerto huésped.<sup>43</sup>

No obstante, anteriormente el trasplante de células madre hematopoyéticas fue propuesta como la opción preferida para los pacientes con HPN que se encontraban en tratamientos para el manejo del sistema inmune como el Eculizumab y desarrollaron insuficiencia abierta de médula ósea. Estudios demostraron la viabilidad del uso del Eculizumab en pacientes que presentan HPN y anomalías medulares conforme al tiempo óptimo para llevar a cabo el enfoque multidisciplinario de los tratamientos con terapia anti complemento sometidos al trasplante de células madre hematopoyéticas dando como resultado una respuesta satisfactoria al tratamiento.<sup>44</sup>

### **Manejo con Eculizumab**

Un gran avance terapéutico ha sido el anticuerpo monoclonal conocido como Eculizumab, el cual fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y debe ser incluido en pacientes que presentan elevadas actividades de la enfermedad produciendo alivio a la hemólisis y mejora tanto los síntomas como la calidad de vida sin abordar el defecto genético subyacente.<sup>45 46</sup>

El mecanismo de acción dada por el tratamiento se fundamenta en el anticuerpo monoclonal humanizado el cual actúa bloqueando la proteína C5 del complemento,<sup>45 47</sup> componente previamente activado por C3, dando lugar a un evento lítico celular a partir de la formación de poros en la membrana celular.<sup>23</sup> La inhibición de la actividad final por complemento permite la estabilidad de la hemoglobina y reduce los requisitos de transfusión y los síntomas relacionados con la fisiopatología de la enfermedad.<sup>45</sup>

En la actualidad se ha determinado que el tratamiento con Eculizumab permite un cambio de vida en correlación con las personas que presentan HPN con una supervivencia media de 10 a 15 años de vida tras el diagnóstico realizado, evidenciándose efectividad con análisis alentadores en la reducción de fatiga, disminución en el riesgo relativo de tromboembolismo y complicaciones crónicas como fallo renal;<sup>45</sup> del mismo modo, este componente consigue la normalización de los niveles de lactato deshidrogenasa en casi todos los pacientes que presenta HPN.<sup>48</sup>

Por otro lado, cabe resaltar que el Eculizumab a pesar de presentar una disminución relevante en la hemólisis intravascular en pacientes con HPN consecuente al bloqueo de la cascada terminal del complemento en C5, deja en evidencia los glóbulos rojos deficientes de GPI unido con un fragmento de C3 el cual opsonina estas células para la fagocitosis por macrófagos y grados variables de hemólisis extravascular, limitando la capacidad del Eculizumab en algunos pacientes con diversidad genética en los genes que codifican reguladores endógenos del complemento infiriendo así dependencia en el tratamiento transfusional.<sup>48</sup>

### **5.2.1. Definición de anemia aplásica**

La aplasia medular es un trastorno que tiene como resultado el fallo de la hematopoyesis la cual se caracteriza por una insuficiencia medular de carácter cuantitativo que influye en el desarrollo inadecuado de las series hematopoyéticas, dada la situación, se presenta una disminución del tejido hematopoyético en médula ósea y se sustituye por tejido adiposo.<sup>25, 27</sup>

Como consecuencia de esto, se establece la baja producción de eritrocitos, leucocitos y trombocitos lo cual lleva a un complejo de patologías que involucran síndromes anémicos, procesos infecciosos y anomalías hemorrágicas.<sup>27</sup> Por otra parte se establece que de acuerdo a la etiología de la anomalía la aplasia medular puede clasificarse como constitucional o adquirida.<sup>25</sup>

En primer lugar, la anemia aplásica adquirida normalmente es de carácter idiopático, es decir primaria. Sin embargo, existen agentes físicos y químicos que causan la alteración, como, por ejemplo: radiaciones ionizantes, agentes citotóxicos, químicos orgánicos y algunos agentes farmacológicos.<sup>25</sup>

Tras la exposición frente a estos agentes, es probable que se produzca una disminución notable de los progenitores hematopoyéticos hasta un nivel donde la reconstitución de células hemáticas no se encuentre presentes en circulación, dando como consecuencia las patologías anteriormente mencionadas.<sup>27</sup>

De la misma forma, esta anemia puede ser consecuencia de infecciones virales como el virus de la Hepatitis, virus de Epstein Barr y de trastornos inmunes como lupus

eritematoso, hipogammaglobulinemia y autoanticuerpos.<sup>25</sup> De acuerdo con lo mencionado, se esclarece que la desregulación del sistema inmunológico provoca daños en la médula ósea incluyendo los progenitores hematopoyéticos, debido a que la promoción de estados inflamatorios provocado por un grupo variable de citoquinas como lo son interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) los cuales interfieren en la hematopoyesis y favorecen al proceso de apoptosis en los progenitores hematopoyéticos.<sup>27</sup>

Por otra parte, las alteraciones genéticas relacionadas con el gen HLA permite desarrollar anomalías en los linfocitos T. De manera que hay una presentación anormal de antígenos tipo HLA que da como resultado aumento en el nivel de células T autorreactivas, disminuyendo la producción de células T reguladoras que tienen como función principal reconocer a elementos como propios y actuar como proveedor de estadios inflamatorios.<sup>27</sup> Esto demuestra que los linfocitos anormales no son capaces de reconocer características de los progenitores hematopoyéticos, generando procesos inflamatorios dirigidos hacia estos tejidos y dando como resultado la apoptosis.<sup>27</sup>

También se ha establecido la presencia de mutaciones somáticas detectadas en poblaciones de pacientes con anemia aplásica. A partir de esto, existe una relación de estas anomalías con las diversas formas de presentación de la enfermedad de acuerdo con los genes alterados como: DNMT3A y ASXL1 los cuales están relacionados en eventos mielodisplásicos y leucemias mieloides agudas, los genes BCOR/BCORL1 y PIG-A son aquellos que permanecen estables e incluso desaparecen, pero, así mismo están asociados a otras patologías menos frecuentes.<sup>27</sup>

### **5.2.2 Diagnóstico de Anemia aplásica**

Según lo mencionado anteriormente, los fallos medulares deben ser diagnosticados adecuadamente según la etiopatogenia con el fin de determinar adecuadamente el tratamiento óptimo, en alternativa se sugiere un algoritmo que permita identificar las diferentes causas de una pancitopenia y posibles resultados obtenidos en cada una de las pruebas que se sugieren para el diagnóstico. (Anexo 10)

Los estudios sugeridos para un paciente que presenta anemia aplásica son variados, se establece que en primer lugar es necesario un análisis preliminar que permita inferir en la

presencia de anemia aplásica como lo son principalmente sintomatología compatible con anemia, infecciones recurrentes y síndromes hemorrágicos.<sup>27</sup> Posteriormente, es fundamental confirmar la presencia de anemia aplásica en el paciente a través de estudios complementarios, siendo estos seleccionados por el profesional tratante en correlación con el estado del paciente y accesibilidad.<sup>28</sup>

Las siguientes pruebas permiten el estudio adecuado en un paciente con sospecha de anemia aplásica, con el fin de confirmar la patología: el hemograma con frotis de sangre periférica, conocido como un examen base que permite inferir en el estado actual del paciente y así mismo incluir el recuento de reticulocitos con el fin de especificar el funcionamiento de la médula ósea, del mismo modo se agregan otros exámenes bioquímicos que permiten identificar otras alteraciones presentes en la anemia aplásica como : estudio de función renal (creatinina, BUN, entre otros), niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), bilirrubina total, niveles de bilirrubina directa, Haptoglobina, TSH Y T4 para función tiroidea y marcadores hepáticos.<sup>8 28</sup>

Acorde a los análisis rutinarios, se requieren otro tipo de estudios cuyas metodologías son más invasivas para el paciente que lo requieran, entre estas encontramos: punción de aspiración de médula ósea (PAMO) y biopsia de médula ósea las cuales permiten confirmar la hipo celularidad que presenta un paciente con anemia aplásica.<sup>28 29</sup>

### **5.2.3 Tratamientos de la Anemia aplásica**

Encontramos metodologías especializadas que permiten inferir nuevos parámetros etiológicos primarios de la anemia aplásica como lo son: detección de clones con alteraciones citogenéticas por medio del estudio citogenético, por otra parte, encontramos análisis por citometría de flujo en médula ósea y/o sangre periférica con el fin de detectar la presencia de blastos o clones compatibles con HPN.<sup>28 29 54</sup>

No obstante, los estudios para la búsqueda de factores causantes de la anemia aplásica adquirida también son fundamentales con el propósito de identificar agentes etiológicos como lo son: agentes virales como virus de la hepatitis A, B y C, citomegalovirus, VIH, virus Herpes, Parvovirus entre otros, los cuales son detectados mediante análisis de serologías virales. Seguidamente la búsqueda de enfermedades autoinmunes que facilitan el

desarrollo de anemia aplásica permite un diagnóstico oportuno de la patología y un tratamiento adecuado.<sup>3 28</sup>

En referencia a los tratamientos para el manejo de la anemia aplásica, se han establecido diversos métodos que permiten el progreso positivo de la patología. Para establecer un adecuado tratamiento se requiere un enfoque multidisciplinario, el cual reconozca la etiología de la patología y la respuesta que presenta el paciente frente los procedimientos aplicados.<sup>28 29</sup>

Entre los procedimientos y medicamentos recomendables para el manejo de anemia aplásica encontramos el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en médula ósea en pacientes que tienen donantes histocompatibles y no responden adecuadamente a otros tratamientos inmunosupresores.<sup>3 26 28</sup>

Por otro lado, los tratamientos inmunosupresores se aplican para aquellos pacientes que no cuentan con un donante histocompatible y en su mayoría son mayores de 50 años. Estos tratamientos poseen diferentes mecanismos de acción dirigida hacia el nivel de recuento de los linfocitos T, modulación en los mecanismos de activación de estos y también su citotoxicidad, así mismo hay inhibición de la calcineurina. Por otro lado, elementos que reaccionan con el dominio transmembranal de los progenitores hematopoyéticos.<sup>28</sup>

Entre los elementos más utilizados en la terapia inmunosupresora, encontramos: Globulina anti-timocitos (ATG), Metilprednisona, Ciclosporina A y Eltrombopag, entre otros. Estos elementos fueron estandarizados como parte del multidisciplinario tratamiento inmunosupresor; en estudios previos se han publicado la tasa de efectividad de este teniendo en cuenta variables como la edad, etiología de la anemia aplásica, organismo del paciente y elementos utilizados en el tratamiento.<sup>26 28</sup>

La terapia inmunosupresora con Globulina antitimocítica y ciclosporina se establece en tasas de respuesta efectivas para anemia aplásica adquirida, según estudios realizados que demuestran diferentes tipos de biomarcadores como el antígeno leucocitario humano (HLA)-DR15, marcaje de longitud de los telómeros y células deficientes de GPI en relación con el aumento de células hematopoyéticas.<sup>50 52</sup>

Con base en lo anterior se ha determinado que la patogenia de la anemia aplásica adquirida se ven involucrada en las células T citotóxicas que atacan a las células madre hematopoyéticas, de esta manera actualmente la tasa de respuesta hematopoyética de estos pacientes a la terapia inmunosupresora se refleja en un 90% a través de varios parámetros clínicos convencionales como predictores de un pronóstico favorable como lo son: edad joven, sexo masculino, intervalo corto entre el diagnóstico de la enfermedad y la aplicación de la terapia inmunosupresora, un recuento bajo de glóbulos blancos con recuento absoluto de neutrófilos, linfocitos y reticulocitos más alto.<sup>50</sup>

### **5.3.1 Anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

La HPN ha traído consigo un grupo de complicaciones que se desarrollan de manera variable de acuerdo con el individuo y el entorno en el cual este se desempeña, entre estas encontramos la hipo celularidad medular debido a un defecto en los progenitores hematopoyéticos.<sup>8 26</sup> Esta explicación se fundamenta a través de estudios que han relacionado la capacidad de identificar esta patología con un leve grado de falla de la médula ósea, así mismo la presencia de clones compatibles con HPN en asociación con otros síndromes de falla medular.<sup>30</sup>

Se sostiene que un gran porcentaje de pacientes al presentar HPN tienen alta probabilidad de presentar anemia aplásica con o sin hemólisis los cuales requieren un análisis más exhaustivo con el objetivo de aplicar metodologías adecuadas para el manejo de ambas enfermedades<sup>26</sup>

Por otro lado, la presencia de clones compatibles con HPN cuantificados por citometría de flujo de alta sensibilidad han sido detectados hasta en un 50 % en pacientes que presentan anemia aplásica.<sup>32</sup> Del mismo modo, estudios con resultados preliminares demostraron que pacientes con anemia aplásica, síndromes mielodisplásicos y otros síndromes de insuficiencia de médula ósea presentaban baja incidencia de clones de HPN determinados por citometría de alta sensibilidad.<sup>58</sup>

### **5.3.2 Fisiopatología de la Anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

Basados en estudios que sustentan argumentos sobre mecanismos etiológicos que favorecen el desarrollo de aplasia medular y clones compatibles con HPN, se han encontrado

múltiples casos de personas que han desarrollado anemia aplásica en presencia de HPN.<sup>5</sup> Entre estos se exponen en primer lugar que las células CD34+ en pacientes que presentan anemia aplásica y clones compatibles con HPN producen menor cantidad de CFU-Meg (unidad formadora de colonias megacariocitos), la cual estimula la glicoproteína formada en el hígado para la formación de megacariocitos conocida como la Trombopoyetina.<sup>5 31</sup>

No obstante, se infiere que el aumento de células deficientes de la proteína de anclaje GPI se debe a que la médula ósea de un paciente que está sufriendo procesos anormales permite un evento de supervivencia a este tipo de células, a diferencia de una persona que no presenta esta complicación, lo cual resulta en su proliferación y detección de niveles altos de células sin proteínas de anclaje.<sup>5</sup>

En efecto, lo dicho anteriormente se sustenta con un evento inmune en donde las células deficientes de GPI son resistentes a procesos inflamatorios y apoptóticos,<sup>32</sup> teniendo en cuenta que pacientes con anemia aplásica tienen un número elevado de células T activadas las cuales producen apoptosis de las células CD34+ encargadas de procesos hematopoyéticos, determinando que los clones HPN son formas inmunológicamente mediadas para la insuficiencia de médula ósea.<sup>5</sup> Es decir, que el proceso autoinmune mediado por las células T afectan directamente a los progenitores hematopoyéticos con la presencia de GPI, a diferencia de las poblaciones ausentes de GPI siendo fundamento teórico de fallo de médula ósea en presencia de HPN.<sup>33</sup>

El objetivo del escape inmunomediado se explica mediante el mecanismo que utilizan las células T para dirigirse selectivamente a los progenitores hematopoyéticos que presentan la proteína de anclaje GPI, cuando estas se encuentran autorreactivas en un paciente con HPN.<sup>33</sup>

Las células T se presentan en la secuencia  $\beta$  del TCR sin embargo, en pacientes que presentan HPN el determinante está enriquecido en células T CD8+ y CD57+ del subconjunto de antígeno leucocitario humano (HLA),<sup>34</sup> proceso por el cual se da una respuesta constante de las células T a un mismo antígeno el cual se encuentra restringido por la una molécula similar al MHC conocida como CD1d (Molécula presentadora de antígeno) expresada en células dendríticas, células B y alguna porción de CD34+,<sup>34</sup> del

mismo modo es expresada en los progenitores hematopoyéticos humanos y está asociada a GPI; al encontrarse disminuido aumenta la posibilidad de que las células T sean responsables de atacar los progenitores hematopoyéticos en la HPN.<sup>33 34</sup>

La hipótesis anteriormente mencionada, demuestra que las células T con proteína GPI relacionada a CD21d atacan a los progenitores hematopoyéticos, sin embargo, estos a su vez podrían estar relacionados con la selección negativa de las células progenitoras hematopoyéticas positivas para GPI dando como resultado la expansión de este clon conocido como células T específicas para GPI.<sup>34</sup>

En el proceso de anemia aplásica adquirida las células T específicas de GPI aumentan, infiriendo que el mecanismo principal para un proceso autoinmune tanto para HPN como para anemia aplásica es la proteína de anclaje GPI.<sup>34</sup>

### **5.3.3 Diagnóstico Anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

Se ha establecido que al relacionar anemia aplásica adquirida con la presencia de HPN se determina un buen pronóstico en referencia a la elección de los tratamientos y respuesta de los pacientes que lo reciben.<sup>50</sup> A causa de lo anterior, un análisis por citometría de flujo para la medición sensible y precisa de células hemáticas deficientes de GPI permiten inferir a este diagnóstico como nuevo biomarcador de respuestas favorables en tratamientos inmunosupresores para el manejo de anemias aplásicas.<sup>50 52</sup>

En relación a las metodologías de diagnóstico, estudios posteriores demostraron que la citometría de flujo es determinante para un análisis exhaustivo que relaciona la presencia de HPN y anemia aplásica, puesto que la detección de clones compatibles con HPN a partir de muestra de médula ósea demostró expresiones negativas en anticuerpos CD55/ CD59 y Aerolisina de fluorescencia (FLAER) en células mieloides.<sup>53</sup> Se observó que el tamaño del clon de HPN es similar en neutrófilos maduros, monocitos, eosinófilos, expresión de glóbulos rojos nucleados, células dendríticas y blastos tanto en muestras de sangre periférica como en médula ósea, así mismo, el clon en células mieloides maduras es mayor en muestra de médula ósea.<sup>53</sup>

Frente a lo anterior se evalúa la importancia de la citometría de flujo en medula ósea como alternativa a las pruebas en sangre periférica, correlacionando ambos resultados y determinar la relación de HPN y anemia aplásica.<sup>53</sup>

#### **5.3.4 Tratamiento de la Anemia aplásica y Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

La existencia elevada de pacientes con HPN y anemia aplásica ha permitido identificar nuevos tratamientos que permitan una mejora de su estado. En primer lugar, se resalta que la determinación de poblaciones HPN en pacientes que presentan anemia aplásica determina una buena respuesta a los tratamientos inmunosupresores como globulina anti-timocítica, ciclosporina y andrógenos, a diferencia de pacientes que no presentan población HPN.<sup>39</sup>

Por otra parte, se sabe que los tratamientos concomitantes de HPN y anemia aplásica son pocos comunes y es normal que se trate primero la anemia aplásica, sin embargo, se tuvo en cuenta la utilidad de la aplicación del Eculizumab en pacientes que requieran el tratamiento por el padecimiento de HPN sin la necesidad de suspender el manejo con terapia inmunosupresora con globulina anti-timocitos de caballo más ciclosporina con el objetivo de aumentar el recuento de población hemática y a su vez minimizar el riesgo de hemólisis intravascular y complicaciones trombóticas.<sup>17 26 51</sup>

El tratamiento con trasplante de células madre hematopoyéticas es otra opción preferida para los pacientes con HPN que desarrollan insuficiencia de médula ósea, adicionalmente a este procedimiento se evaluó la viabilidad de utilizar Eculizumab en pacientes durante el período peri-trasplante con el fin de erradicar el clon HPN para evitar riesgos trombóticos.<sup>44</sup>

#### **5.4 Dificultad en el diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

Actualmente, existe dificultad en el diagnóstico de HPN a causa de un grupo de factores que se presentan en diversos centros médicos. Inicialmente se basan en la dificultad de identificar signos y síntomas relacionados con un posible desarrollo de la enfermedad influyendo así en la determinación de la aplicación de metodologías especializadas y posteriormente establecer un tratamiento.<sup>56</sup> Por otra parte, la dificultad de acceso a metodologías especializadas como la citometría de flujo, influye en un diagnóstico menos certero de la enfermedad.<sup>54 59 60</sup>

En otros casos si está presente una lista clásica de signos y síntomas compatibles con el desarrollo de HPN determinada por el personal como lo son: hemoglobinuria y hemosideriuria, signos de hemólisis, anemia aplásica o hipoplásica, trombosis en lugares inusuales y síntomas distónicos, no obstante, no presentan eficacia diagnóstica para ayudar a definir la presencia de HPN en especial cuando estas se manifiestan por separado y requieren confirmarse frente a diagnósticos diferenciales por pruebas especializadas.<sup>60</sup>

Del mismo modo, muchos laboratorios de diferente procedencia han desarrollado procedimientos de forma completamente independiente para las pruebas de HPN, demostrando dificultad en la toma unánime de decisiones frente a los casos que se presenten y limitando una estandarización apropiada de los métodos para aclarar qué procedimientos o reactivos brindan mejores resultados.<sup>59 60</sup>

En vista de lo anterior, estudios previos han identificado la necesidad de guías consenso para para el diagnóstico y seguimiento de HPN, así como trastornos que se vean relacionados con esta enfermedad.<sup>57</sup> Se sabe que en el año 2010 se publicaron las primeras guías consenso para el diagnóstico y seguimiento de la HPN subrayando la importancia tanto de las pruebas de diagnóstico de HPN como la determinación de indicaciones clínicas para su análisis a partir de enfoques rutinarios y de alta resolución; el objetivo de este es generalizar en metodologías más simples, fáciles de aplicar en plataformas de instrumentos y protocolos de diagnóstico más sencillo. Se enfatizó en la selección de clones de anticuerpos y conjugados que validen la presencia de antígenos ligados a GPI los cuales se conocen como cócteles basados en FLAER <sup>56</sup>, sin embargo, cabe resaltar la falta de procedimientos estandarizados que utilice elementos concisos en los laboratorios de diagnóstico dando como resultado variabilidad en sus diagnósticos.<sup>57 58</sup>

Actualmente se ha evaluado la viabilidad de implementar una muestra de sangre total de HPN estabilizada como control del proceso biológico cribado de HPN mediante citometría de flujo, por consiguiente, se establecen estudios longitudinales sobre la estabilidad de la expresión del antígeno ligado a GPI tanto para glóbulos rojos como blancos involucrando laboratorios de todo el mundo, con el fin de producir controles positivos y negativos de referencia para su uso en programas de control de calidad externo, pero, hasta el momento

no se ha designado una combinación específica de marcadores de antígeno en proteína GPI para la activación, análisis de la enfermedad y sus consecuencias.<sup>57 58</sup>

Por otra parte, la problemática en laboratorios que tienen disposición de la citometría de flujo como prueba de diagnóstico para HPN está relacionada con problemas en la fase preanalítica de la prueba. Se determina que varios de los procedimientos abordados en los requisitos pre analíticos para el análisis de la muestra se ven afectados como: el almacenamiento, el cual se aplica de diversas formas con respecto a la temperatura y el tiempo de refrigeración alterando la viabilidad celular la cual es vital para el proceso de lisis de cloruro de amonio el cual puede matar células que se encuentran dañadas o envejecidas y así influir en la detección de clones de HPN, provocando unión no específica de anticuerpos, aumento de auto fluorescencia y agregación celular.<sup>60</sup> Así mismo, en las muestras de sangre con anticoagulante disminuye progresivamente el efecto del aditivo con el tiempo de almacenamiento e introduce cambios en la tinción celular aumentando o disminuyendo las propiedades de unión de los anticuerpos conjugados o de otros reactivos para el desarrollo de citometría de flujo.<sup>60</sup>

Finalmente, se ha relacionado una baja sensibilidad de la citometría de flujo convencional para la detección de clones de PHN infiriendo en gran medida la problemática que presentan muchos laboratorios que la utilizan. Se establece que la citometría de flujo de alta sensibilidad presenta una sensibilidad de detección del 0.01 % para granulocitos, monocitos y glóbulos rojos respecto a la detección de proteína GPI. Con base en lo anterior, a través de análisis retrospectivos se demuestra que en casos donde el clon HPN sea minoritario como lo son en pacientes con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico, existe la posibilidad de no ser detectado.<sup>59</sup>

Con respecto a las pruebas basadas en complemento que incluyen el test de Ham y prueba de hemólisis de sacarosa , ensayos anteriores demostraron el aumento de la sensibilidad de población deficiente de GPI a la hemólisis en condiciones estándar, aunque ninguna de estas pruebas demuestra especificidad debido a que la lisis de células deficientes de GPI fue más baja que en células normales, infiriendo así que estas pruebas puede pasar por alto pequeñas poblaciones de células anormales llevando al no diagnóstico de casos de HPN tipo I y tipo II donde el déficit de la proteína de anclaje se encuentra de manera parcial.<sup>13</sup>

De mismo modo estas pruebas son consideradas como laboriosas y difíciles de estandarizar teniendo en cuenta los múltiples resultados que pueden reflejar en presencia de otras enfermedades y la detección específica de la población en estudio.<sup>13 59</sup>

## **6. Metodología**

### **6.1 Tipo de estudio**

Se recurrió a una recopilación documental para análisis descriptivo y exploratorio acerca de la HPN teniendo en cuenta: etiopatogenia, sintomatología, manifestaciones, principales complicaciones, métodos diagnósticos más utilizados y tratamiento adecuado para el manejo de los pacientes que la presentan. De acuerdo con lo anterior se anexa la búsqueda de referencias relacionadas con anemia aplásica como etiopatogenia, manifestaciones, métodos diagnósticos y tratamientos.

Posteriormente, se hace hincapié en los análisis realizados para evidenciar la relación de las patologías y los beneficios de reconocer la presencia de HPN en un paciente con anemia aplásica.

Se tuvieron en cuenta documentos de revisión e investigación relacionados con el tema de interés a partir del año 1999 hasta el año 2020, las palabras claves utilizadas para la búsqueda se realizaron tanto en el idioma español como en inglés:

Palabras clave:

- Español: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y complicaciones métodos diagnósticos de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, tratamiento para Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, anemia aplásica, causas de anemia aplásica adquirida, tratamientos para anemia aplásica adquirida, Citometría de flujo, Eculizumab, Globulina antitimocítica, Test de Ham, Sucrosa.
- Inglés: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Pathogenesis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, management of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Aplastic anemia, Eculizumab, Immunosuppressive therapy and aplastic anemia, Diagnosis of aplastic anemia, Eculizumab therapy, antithymocyte globulin, Ham test, Sucrose test.

-

Bases de datos y buscadores utilizados:

- Pubmed: Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Elsevier: Disponible en <https://www.elsevier.com/>
- ProQuest: Disponible en <https://www.proquest.com/LATAM-ES/>
- SAGE journals: Disponible en <https://journals.sagepub.com/>
- SciELO: Disponible en <https://www.scielo.org/es/>
- ScienceDirect: Disponible en <https://www.sciencedirect.com/>
- Google Scholar: Disponible en <https://scholar.google.com/>

## **6.2. Población**

Documentos de revisión e investigación relacionados con HPN, en los cuales se incluyeron definición de la enfermedad, análisis de casos que reporten la presencia de esta con el fin de asimilar principales sintomatologías y manifestaciones clínicas, información y estandarización de métodos diagnósticos que amplíen su determinación y estudios retrospectivos referentes a los tratamientos óptimos para el manejo adecuado que permita tener en cuenta pros y contras de su aplicación para la enfermedad.

De manera análoga, información referente a fundamentos de la anemia aplásica, analizando e infiriendo posibles causas, publicaciones basadas en casos presentados determinando principales manifestaciones clínicas y tratamientos aplicados.

## **6.3. Muestra**

Documentos de revisión e investigación fundamentados en la relación entre HPN y el desarrollo de anemia aplásica, por medio de publicaciones que determinen el desarrollo de anemia aplásica con la presencia de clones compatibles con HPN.

Seguidamente información que especifique las ventajas de diagnosticar la presencia de la enfermedad con el desarrollo aplasia para así evidenciar la efectividad de los tratamientos alternativos sugeridos en cada uno de los documentos.

#### **6.4 Criterios de inclusión**

- Artículos, trabajos de grado y guías clínicas que incluyen las palabras clave previamente mencionadas tanto en el título como en el fondo del artículo.
- Artículos originales de estudio investigativo e informes de revisión que brinden resultados que permitan analizar la relación entre la HPN y anemia aplásica.

#### **6.5 Criterios de exclusión:**

- Artículos, trabajos de grado y guías clínicas que solicitan aporte monetario para acceder a la información completa.
- Artículos, trabajos de grado y guías clínicas que no presenten información considerada como necesaria para el desarrollo de la revisión literaria enfocada en la relación de HPN y anemia aplásica.

#### **6.6 Procedimiento y análisis de información**

La búsqueda de documentos se realizó inicialmente de acuerdo con las palabras clave por medio de buscadores como Google académico y bases de datos facilitadas por la universidad colegio Mayor de Cundinamarca, se seleccionaron un total 500 documentos que incluían artículos de revisión e investigación, trabajos de grado y guías clínicas relacionadas con el tema del trabajo final. Seguidamente, se aplicó primer criterio tanto de inclusión como exclusión determinando las temáticas relacionadas y la accesibilidad que tiene cada documento a la información solicitada, como resultado se excluyeron un total de 385 documentos que no presentaban acceso a la información completa o estaban enfocados a temáticas diferentes al trabajo final a pesar de tener en cuenta palabras clave previamente incluidas.

A partir de lo anterior, se evidenciaron 115 artículos resultantes los cuales fueron revisados detalladamente aplicando el segundo criterio tanto de inclusión como de exclusión,

obteniendo un total de 47 artículos excluidos que presentaban información considerada como no necesaria para aplicar en el trabajo final.

Los 68 documentos restantes se sometieron a un análisis exhaustivo en donde 18 fueron base informativa para el desarrollo de antecedentes del trabajo final describiendo origen, estudios y teorías previas. Para el desarrollo del marco teórico se referenciaron 38 documentos de los cuales 4 fueron establecidos en los antecedentes y se tomaron fundamentos relacionados a cada tema.

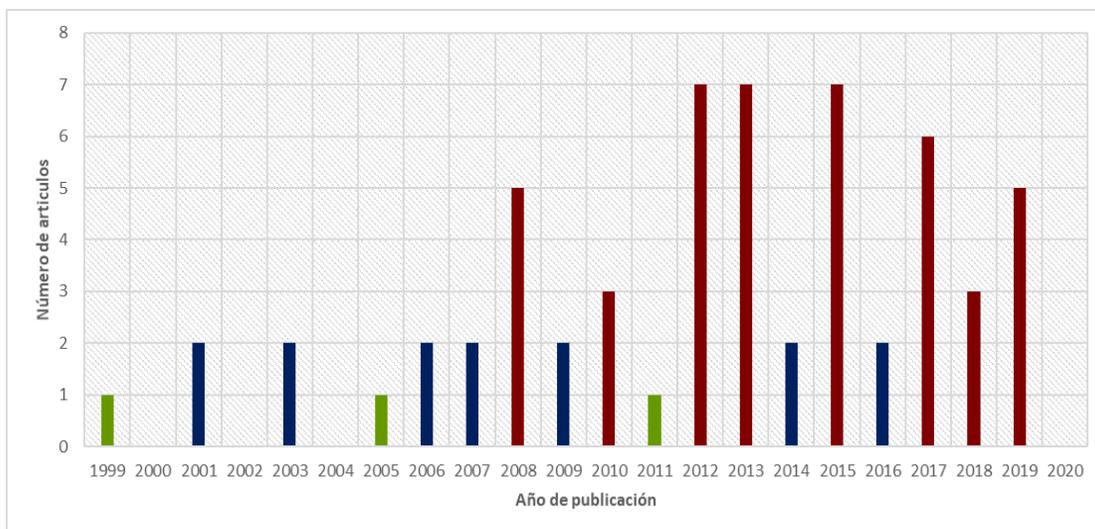
Respecto a la información seleccionada, se establece la organización en una base de datos empleando programas de Microsoft Office Excel, clasificando los datos documentales según país, año de publicación, temas utilizados y subtemas con el objetivo de analizar descriptivamente las exploraciones realizadas determinando la relación de HPN con anemia aplásica.

Finalmente, con base en las actividades previas se realiza un margen de discusión, comparando resultados obtenidos en el trabajo final con otros estudios, para inferir punto a punto los objetivos anteriormente planteados y solución a la pregunta problema propuesta.

## **7.Resultados**

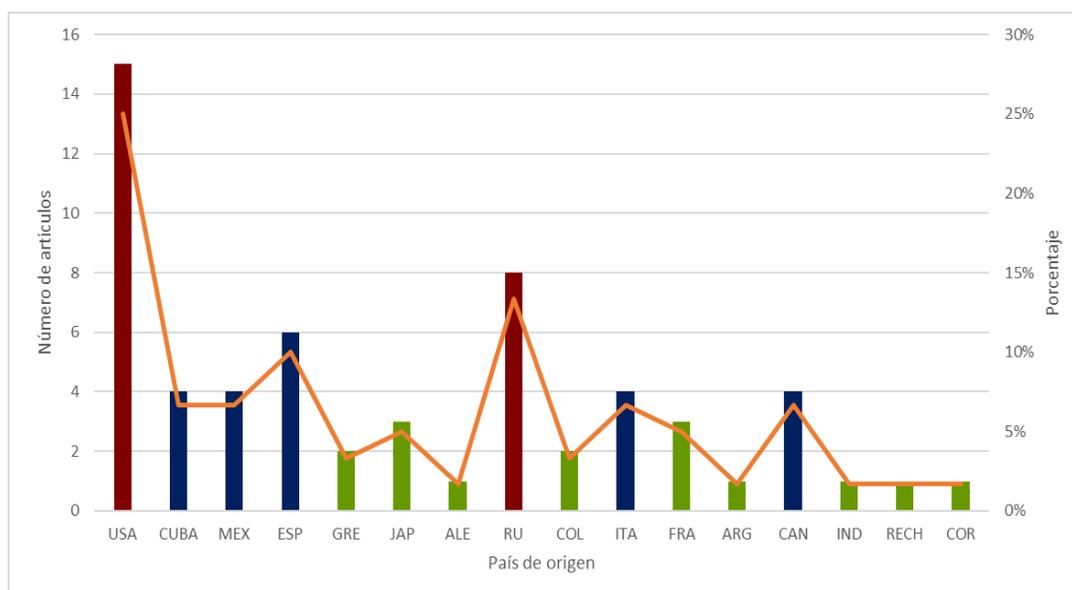
De acuerdo a con la metodología aplicada, se clasificaron un total de 60 artículos los cuales se encuentran aplicados estadísticamente en 1 tabla y 6 gráficas respectivamente.

### **Gráfica 1.** Distribución por año de bibliografía consultada



Las referencias documentales consultadas demuestran una distribución aplicada entre el año de 1999 hasta el año 2019. Se obtuvo mayor información en los años 2012, 2013 y 2015 con un valor de 7 artículos por año, en los años 1999, 2005 y 2001 hubo menor información con un valor de un artículo por año. Finalmente, en los años 2000, 2004 y 2020 no se encontraron referencias documentales aplicadas a este documento. (Gráfica 1)

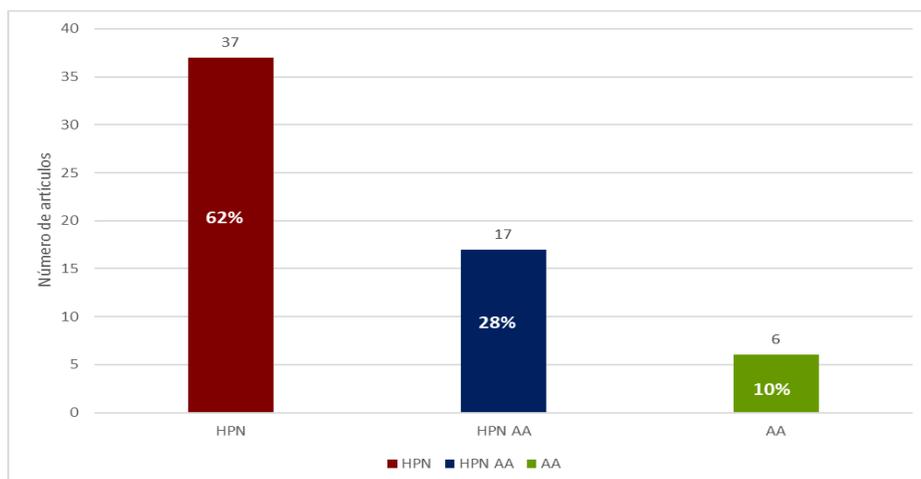
**Gráfica 2** Distribución por país de origen de bibliografía consultada



**USA.** Estados Unidos **MEX.** México **ESP.** España **GRE.** Grecia **JAP.** Japón  
**ALE.** Alemania **RU.** Reino Unido **COL.** Colombia **ITA.** Italia **FRA.** Francia **Arg.**  
 Argentina **CAN.** Canadá **IND.** India **RECH.** República Checa **COR.** Corea

La distribución por países expone un total de 16 países donde se realizaron las referencias documentales previamente consultadas, el mayor porcentaje de documentación proviene de Estados Unidos correspondiente a un 25% con un valor de 15 artículos, se encontró menor porcentaje de referencias consultas en Alemania, Argentina, India, República Checa y Corea con un porcentaje de 2% con valor de un artículo por país. Seguidamente en los países como Reino Unido, Cuba, España, México, Grecia, Japón, Colombia, Italia y Francia presentaron una distribución porcentual entre 3 a 13% con valores entre 2 a 8 artículos. (Gráfica 2)

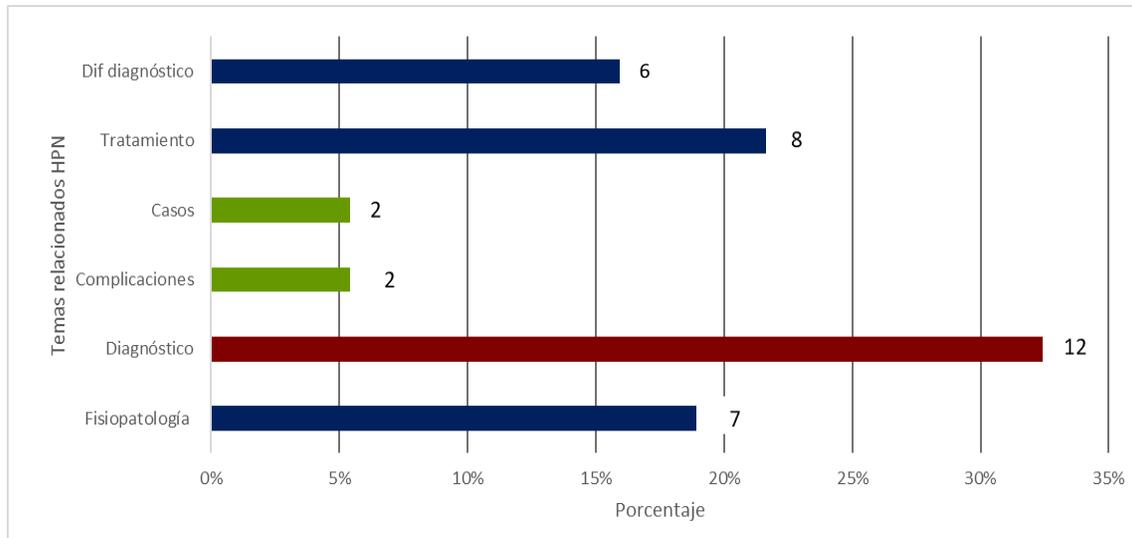
**Gráfica 3** Distribución por tema consultado



**HPN.** Hemoglobinuria Paroxística Nocturna **AA.** Anemia aplásica

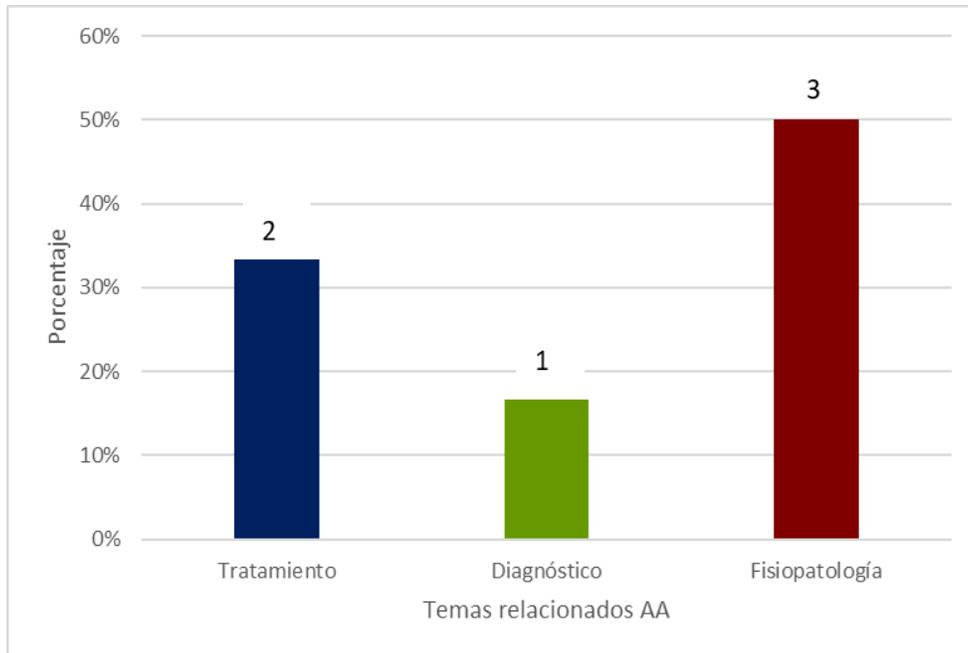
Con base en los temas, la búsqueda se centró en tres respectivamente aplicados al documento. Se obtuvo mayor información respecto a lo relacionado con HPN correspondiente a un 62% con un valor de 37 artículos consultados, seguidamente con relación a anemia aplásica se determinó un porcentaje de 10 % correspondiente a 6 artículos. Por último, se exponen documentos que presentan información sobre las dos patologías previamente analizadas con un porcentaje del 28% con un valor de 17 artículos referenciados. (Gráfica 3)

**Gráfica 4** Distribución por subtemas de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna



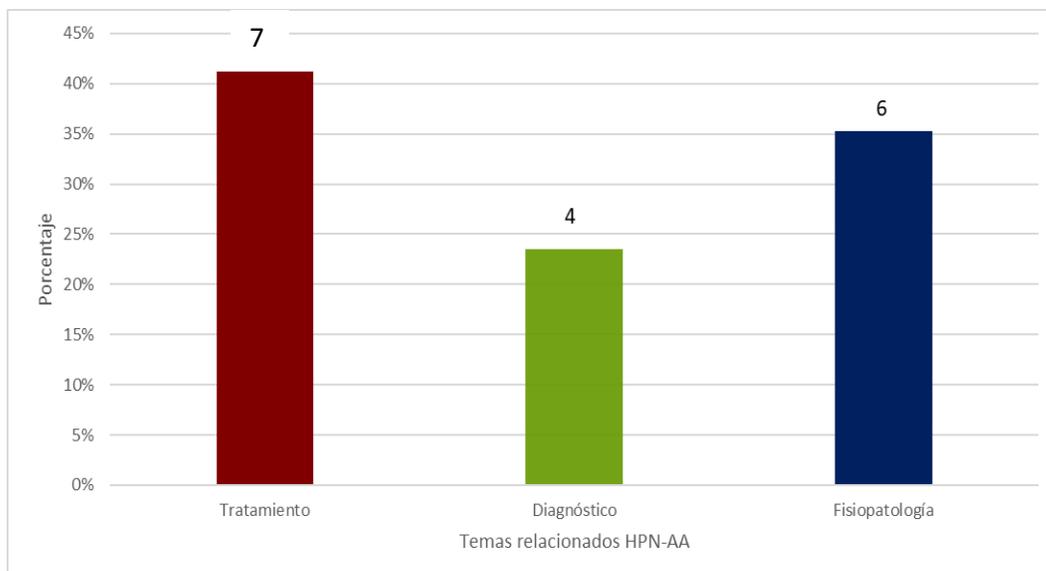
Con base en los 37 artículos determinados como documentos de referencia para HPN, se obtuvieron un total de 6 subclasificaciones de las cuales se obtuvo mayor información en métodos de diagnóstico para HPN correspondiente a un 32 % con un valor de 12 artículos, con respecto a los reportes de casos y complicaciones de la enfermedad, se presenta 5% con un valor de 2 artículos cada subtema; por otra parte, los subtemas relacionados con tratamiento, fisiopatología y dificultades actuales que se presentan para diagnosticar la enfermedad presentaron resultados con un porcentaje entre 16 al 22% con valores entre 6 a 8 artículos referenciados. (Gráfica 4).

**Gráfica 5** Distribución por subtemas de Anemia aplásica



De acuerdo con los 6 artículos que fundamentan el tema de anemia aplásica se obtuvo un total de 3 subclasificaciones, se encontró mayor información referente a la fisiopatología con un porcentaje de 50% equivalente a 3 artículos consultados, por otra parte, se obtuvo menor información con respecto al diagnóstico de la misma con un porcentaje de 17% con valor de un artículo. Finalmente, en relación con los métodos de tratamiento se obtuvo un total de 33% con un valor de 2 artículos.

**Gráfica 6** Distribución por subtemas de HPN y anemia aplásica



En relación a los documentos que presentan información de ambas patologías, se obtuvo un total de 3 subclasificaciones de las cuales se obtuvo mayor información en base a los tratamientos realizados en presencia de ambas con un porcentaje de 41% con un valor de 7 artículos respectivamente, seguidamente se obtuvo menor información en los métodos diagnóstico que se utilizan para este tipo de casos con un porcentaje de 24% con un valor de 4 artículos. En el caso de la fisiopatología que se presenta, se estableció un porcentaje de 35% con un valor de 6 artículos.

**Tabla 1.** Tabla comparativa de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y anemia aplásica

|  | Hemoglobinuria Paroxística Nocturna   | Anemia aplásica   |
|--|---|---|
| <b>Definición de la patología</b>                | Enfermedad de carácter clonal adquirida por parte de las células madre pluripotenciales de la médula ósea las cuales dan lugar a células hematopoyéticas susceptibles a la acción por complemento la cual genera hemólisis intravascular.   | Trastorno que tiene como resultado el fallo de la hematopoyesis, caracterizada por una insuficiencia medular de carácter cuantitativo que influye en la disminución del tejido hematopoyético en médula ósea y se sustituye por tejido adiposo, dando como resultado baja producción de eritrocitos, leucocitos y trombocitos.  |
| <b>Fisiopatología</b>                            | Relacionado con la falta de la biosíntesis de la GPI la cual permite el anclaje de proteínas reguladoras de complemento, como CD55 y CD59. La causa de esta anomalía se atribuye a una mutación somática del gen PIG-A y en consecuencia a esto el sistema de complemento ataca directamente a las células hemáticas generando lo que conocemos como hemólisis intravascular. | La anemia aplásica puede ser constitucional o adquirida. La adquirida puede ser causal de varios factores como: Físicos y químicos entre los cuales se incluye radiaciones ionizantes, agentes citotóxicos, químicos orgánicos y algunos agentes farmacológicos, por otra parte, agente biológicos como los ataques virales están implicados en el proceso. Por otro lado, los daños provocados por el sistema inmunológico en producción de citocinas pro-inflamatorias como (IFN- $\gamma$ ) (FNT- $\alpha$ ) las cuales producen el proceso de apoptosis en los progenitores hematopoyéticos, de la misma forma en las alteraciones que se presentan en los linfocitos T para generar apoptosis. Finalmente mutaciones somáticas en DNMT3A, ASXL1, BCOR/BCORL1 y PIG-A son asociados en la disminución en las líneas hematopoyéticas |
| <b>Sintomatología y manifestaciones clínicas</b> | Dolor abdominal, ictericia, hemorragias, infecciones frecuentes, hemoglobinuria, alteraciones neurológicas  | Fatiga, piel pálida, infecciones frecuentes y prolongadas, hematomas sin causa aparente, sangrados prolongados, fiebre, mareos, dolor de cabeza   |
| <b>Métodos diagnósticos</b>                      | <b>Pruebas rutinarias:</b> Recuento de reticulocitos, Hemograma con FSP, concentración de LDH, bilirrubina fraccionada, haptoglobina, hierro en suero, creatinina en suero, nitrógeno ureico, test de Coombs.<br><b>Pruebas especializadas:</b> Test de Ham, Test de sucrosa, Tarjeta de gel sephacryl, Citometría de flujo ( <b>Gold estándar</b> )                          | <b>Pruebas rutinarias:</b> Recuento de reticulocitos, Hemograma con FSP, concentración de LDH, creatinina sérica, nitrógeno ureico, Haptoglobina, bilirrubina fraccionada, Haptoglobina, TSH y T4, transaminasas.<br><b>Metodologías invasivas:</b> Punción de aspiración de médula ósea, biopsia de médula ósea  |
| <b>Tratamientos</b>                              | Manejo con inmunosupresores, trasplante de células madre hematopoyéticas, manejo con anticuerpo monoclonal Eculizumab.  | Manejo con inmunosupresores, trasplante de células madre hematopoyéticas, uso de antivirales, disminuir exposición a agentes químicos y físicos.  |

Análisis exhaustivo HPN y anemia aplásica, comparadas mediante los parámetros de definición de la patología, fisiopatología, sintomatología, manifestaciones clínicas, métodos diagnósticos y tratamientos.

## 7.1 Análisis de resultados.

### Años de publicación

De acuerdo con la distribución de información con respecto a los años de publicación (Gráfica 1), los documentos tomados como referencia en los antecedentes presentan un inicio desde 2001 hasta el 2018 con un rango aplicado de 1 a 3 artículos, en efecto esto indica el historial de estudios antecesores para la creación de este trabajo de grado teniendo en cuenta el descubrimiento de la HPN incluyendo las primeras pruebas para su diagnóstico como métodos basados en complemento, identificación de manifestaciones clínicas y las complicaciones que pueden generarse, del mismo modo el empleo de la prueba diagnóstica Gold estándar como la citometría de flujo aplicada a este campo y las primeras descripciones sobre la importancia de identificar la enfermedad en personas que presentan anemia aplásica.

Por otra parte, los artículos aplicados al marco teórico se desarrollaron desde el año 1999 hasta el año 2019 respectivamente, observando la mayoría en el año 2012, 2013 y 2015 con un rango de 5 a 7 artículos aplicados, en base a lo anterior, se establece que en estos años se aportó mayor información en todo lo relacionado con el diagnóstico de HPN, describiendo cambios entre las técnicas basadas en complemento y nuevos estudios enfocados en el análisis por citometría de flujo los cuales mantienen su curso hasta los documentos obtenidos en el año 2019.

### **Ubicación geográfica**

Las referencias documentales se establecieron en un total de 3 continentes respectivamente (Gráfica 2), enfocando la obtención de la mayoría de la información en América principalmente en Estados Unidos, país en el cual se presentan muchos centros de investigación en colaboración con otros países para el área de hematología determinando un incremento en la obtención de información de la HPN y anemia aplásica, del mismo modo este país realizó investigaciones relacionadas con la presencia de ambas patologías. Adicionalmente, Colombia realizó el reporte de casos explicando las manifestaciones del paciente, métodos de intervención y tratamientos aplicados.

En comparación con lo anterior, se esclarece que el continente europeo también apoyo múltiples investigaciones para la obtención de la información aplicada al documento exaltando un alto contenido de documentos relacionados a HPN en Reino Unido, países como Italia, Reino Unido y Grecia aportaron documentación relacionada con el manejo de

anemia aplásica en presencia de HPN en su mayoría, resaltando la participación de varios investigadores estadounidenses para el desarrollo de los estudios. Finalmente, en el continente asiático se presentó menos documentación para la aplicación de este en el trabajo final, sin embargo, se determinó que la mayoría de información aportada se basó en la relación de HPN en el manejo de anemia aplásica e información únicamente de HPN.

### **Temas consultados: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna**

Las referencias documentales realizadas para el desarrollo del trabajo final demostraron que se presentó mayor cantidad sobre HPN (Gráfica 3) con 37 artículos, a partir de estos se describieron en su gran mayoría los métodos diagnóstico realizados (Gráfica 4), entre los cuales se establecen las técnicas del test de Ham y Sucrosa descritas en un total de 4 artículos, demostrando que son pruebas especializadas para la detección de poblaciones de HPN, sin embargo presentan una eficacia limitada al reportar resultados erróneos en algunos casos de pacientes; se realizó una comparación con las nuevas técnicas para su diagnóstico como la citometría de flujo descrita específicamente en 8 artículos. La determinación de esta comparación fue mencionada en varios documentos, resaltando que esta permite detectar poblaciones pequeñas compatibles con HPN y clasificarlas adecuadamente según los resultados obtenidos.

La fisiopatología es descrita en 7 artículos (Gráfica 4), de los cuales 3 exponen el proceso relacionado con la biosíntesis de la proteína de anclaje GPI a través de reacciones y gran variedad de genes los cuales se ven afectados, especialmente el gen PIG-A con mutaciones somáticas disminuyendo la codificación de la proteína y aumentando la lisis por complemento. Por otra parte, 4 artículos restantes determinan la función del sistema de complemento en general como un componente del sistema inmune que ejerce su acción mediante tres fases: reconocimiento, procesamiento y eliminación.

El tratamiento de la enfermedad fue obtenido en 8 artículos (Gráfica 4), donde se describen 3 que han sido aplicados en casos de HPN como lo son el tratamiento con inmunosupresores demostrando efectividad en 4 artículos. Para el caso de pacientes que padecen la enfermedad en ausencia de un tratamiento alternativo se describe en 2 artículos la efectividad del manejo de trasplante de células hematopoyéticas. Por último, la descripción del Eculizumab para pacientes que presentan elevadas actividades de la

enfermedad al controlar la hemólisis por complemento descrito por un documento de trabajo de grado y un artículo relacionado.

Tanto las complicaciones como la presentación de casos fueron descritas en 4 artículos (Gráfica 4), a partir de esto se tomaron en cuenta 2 artículos específicos en desarrollo con otros para identificar complicaciones de HPN como tromboembolismo venoso, susceptibilidad a infecciones, trombocitopenia, disminución del tono muscular y anemia aplásica. Por otro lado, se exponen a través de 2 artículos la presentación de casos clínicos de personas que padecen HPN describiendo el historial de pacientes jóvenes con el objetivo de aplicar el marco teórico en casos de la vida real.

En relación con la dificultad de diagnóstico de la enfermedad, se tomaron 6 artículos (Gráfica 4) de los cuales 3 describieron la dificultad de identificar signos y síntomas relacionados con HPN y la dificultad de acceso a la citometría de flujo, otros 3 artículos enfatizaron que el problema estaba presente en la selección correcta de anticuerpos conjugados, la falta de procedimientos estandarizados para analizar la enfermedad y errores preanalíticos de la prueba.

### **Temas consultados anemia aplásica**

Los 6 documentos referenciados sobre anemia aplásica (Gráfica 5) describen que la mayoría de información se basa en la fisiopatología de esta. Se obtuvieron 3 artículos de los cuales 2 especifican varios factores como idiopático, físico, químico, viral y biológico que permiten la disminución de progenitores hematopoyéticos, el otro artículo describe adecuadamente la afectación que producen estos dentro de la médula ósea para presentar aplasia.

El diagnóstico de la anemia aplásica se basa en varias metodologías que fueron descritas específicamente en un artículo (Gráfica 5), se exponen estudios variados para este tipo de casos como manifestaciones clínicas compatibles, estudios complementarios rutinarios como hemogramas con recuento de reticulocitos, exámenes bioquímicos como creatinina, LDH, bilirrubinas, haptoglobina, TSH entre otros; así mismo, estudios especializados como punción y biopsia de médula ósea.

Los tratamientos consultados para la enfermedad fueron descritos en 2 artículos y otros referentes como apoyo (Gráfica 5), uno de estos describe en primera medida la aplicación de tratamientos contra agentes etiológicos directamente como aislamiento contra agentes físicos y químicos, también el uso de antivirales. Otro artículo demuestra la efectividad de trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas y tratamientos inmunosupresores.

### **Temas consultados Hemoglobinuria Paroxística en relación con Anemia aplásica**

La relación de HPN y anemia aplásica fue descrita en 17 artículos (Gráfica 3) de los cuales se obtuvieron tres subclasificaciones (Gráfica 6). En primer lugar, se exponen 6 artículos describiendo la fisiopatología que se presenta en el HPN para el desarrollo de anemia aplásica, donde 2 de estos argumentan los mecanismos etiológicos como lo son las células CD34+ en pacientes con presencia de clones HPN disminuyen la cantidad de CFU-Meg (unidad formadora de colonias megacariocitos para la síntesis de la trombopoyetina), de la misma forma otros 2 artículos explican que los clones de HPN se proliferan rápidamente en pacientes con anemia aplásica como mecanismo de supervivencia debido a que las células deficientes de GPI son resistentes a procesos inflamatorios y apoptóticos relacionadas con las células T CD34 + que en procesos irregulares afectan a los progenitores hematopoyéticos con la presencia de la proteína GPI; los 2 artículos restantes explican que CD21d (Molécula presentadora de antígeno) funciona restringiendo la respuesta constante a un mismo antígeno por las células T y su vez se encuentra relacionada con la proteína GPI, demostrando que al estar disminuida las células T atacan a los progenitores hematopoyéticos.

El diagnóstico utilizado que relaciona ambas patologías fue tomado a partir de 4 artículos (Gráfica 6), inicialmente 3 estudios identifican la importancia del análisis de células de sangre periférica por citometría de flujo en pacientes que presentan anemia aplásica para determinar la presencia de células deficientes de GPI y relacionar ambas patologías, otro artículo identificó como metodología para la detección de clones compatibles con HPN a partir de muestras de médula ósea para análisis por citometría de flujo lo cual identifico que la médula ósea presenta también expresiones negativas en anticuerpos CD55/CD59 en células mieloides.

Por último, los tratamientos recomendados en estas situaciones fueron descritos en 7 artículos (Gráfica 6), 2 de éstos describen en primera medida las ventajas de diagnosticar adecuadamente HPN en pacientes con anemia aplásica debido a que estos muestran una mejor respuesta al manejo de inmunosupresores como globulina anti linfocítica, ciclosporina y andrógenos; seguidamente, estudios expuestos en otros 4 artículos identificaron la utilidad de realizar tratamientos concomitantes entre Eculizumab e inmunosupresores los cuales mostraron grandes resultados para el manejo de las patologías mediante el aumento de células hemáticas y la disminución de hemólisis intravascular y eventos trombóticos. Finalmente, el trasplante de células madre como opción terapéutica fue expresada en un artículo donde pacientes con la presencia de ambas enfermedades demostraron mejora en sus manifestaciones clínicas, a partir de esto e incluyó el uso del Eculizumab en periodo per-trasplante como tratamiento preventivo para reacciones trombóticas.

### **Comparación exhaustiva de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y anemia aplásica**

La comparación que se dio de ambas patologías, evaluando definición de cada enfermedad, fisiopatología, sintomatología, manifestaciones, métodos diagnósticos y tratamientos permitió esclarecer semejanzas y diferencias que pueden presentar estas enfermedades, con el objetivo de identificar adecuadamente la estrecha relación que se presenta.

Se deduce que la HPN es definida como una enfermedad de carácter clonal adquirido de las células madre pluripotenciales las cuales dan lugar a células hemáticas susceptibles a complemento, por otro lado la anemia aplásica es una enfermedad causada por un fallo de médula ósea la cual no genera hematopoyesis adecuadamente disminuyendo poblaciones hemáticas; de acuerdo a lo anterior se infiere que ambas patologías están relacionadas con un problema directamente en la médula ósea sin embargo se determina que la HPN se desarrolla adicionalmente por factores inmunológicos en sangre periférica como lo es ataque por complemento y la anemia aplásica se desarrolla directamente en la médula ósea, no obstante la anomalía en la alteración de células madre pluripotenciales juega un rol importante en esta relación.

La fisiopatología de la anemia aplásica está determinada por características constitucionales o adquiridas, estas últimas se han visto a partir de agentes químicos, físicos y biológicos

que alteran directamente la función adecuada de la médula ósea para su función hematopoyética, del mismo modo factores inmunológicos como la producción de citoquinas pro inflamatorias y desregulación de los linfocitos T generan apoptosis de las células madre pluripotenciales, adicionalmente, las mutaciones somáticas en algunos genes como ASXL1, BCOR/BCORL1 y PIG-A son asociadas en la disminución en las líneas hematopoyéticas. En contraste con la fisiopatología de la HPN se describe una anomalía en la biosíntesis de la proteína de anclaje GPI a causa de una mutación somática en el gen PIG-A, dando como resultado déficit en proteínas reguladoras de complemento dependientes de GPI; en relación con lo anterior, se determina un punto de relación de ambas patologías a partir de la presencia de la mutación somática del gen PIG-A en donde permite establecer un papel para el desarrollo tanto de la anemia aplásica para la disminución de líneas hematopoyéticas y un déficit en la regulación de complemento para causar hemólisis en HPN, infiriendo un punto común para que se presenten ambas patologías en una persona.

Por otro lado, la sintomatología y manifestaciones que presenta la HPN está relacionada con procesos hemolíticos en donde una persona con la enfermedad presenta ictericia, dolor abdominal, hemoglobinuria y también algunas manifestaciones adicionales no específicas como hemorragias, infecciones frecuentes y alteraciones neurológicas; en el caso de personas con anemia aplásica se establece que la sintomatología y manifestaciones clínicas están relacionadas a falta de células hemáticas como, piel pálida, fatiga, hemorragias prolongadas, fiebre, dolor de cabeza, hematomas sin causa aparente e infecciones recurrentes. En este punto, la relación de ambas patologías se encuentra en alteraciones funcionales de las células hemáticas como son las plaquetas en donde las alteraciones de estas se encuentran presentes en ambas dando como resultado hemorragias y hematomas, así como las infecciones recurrentes por anomalía leucocitaria, lo cual indica que estas anomalías genéticas causan alteraciones funcionales de las células en ambas enfermedades.

Los métodos diagnósticos de HPN están relacionados con pruebas rutinarias que verifiquen un estado hemolítico de un paciente como reticulocitos, FSP, concentración de LDH , haptoglobina entre otros, así mismo verificación en el funcionamiento del sistema de

complemento por medio de test de Ham y Sucrosa y detección del déficit de GPI por medio de la citometría de flujo; las pruebas rutinarias para anemia aplásica se basan en disminución de reticulocitos, concentración de LDH, haptoglobina entre otros y verificación del estado de la médula ósea por medio de aspirado y biopsia de la misma. Por consiguiente, se establece que la evaluación por hemograma y análisis bioquímico se realizan de manera que se verifique el estado del paciente y que la posible anemia de ambas patologías este presentando sin embargo, con la ayuda de exámenes adicionales se aumenta la probabilidad de un diagnóstico más acertado entre el proceso de una posible HPN con test Ham y Sucrosa positivos, y resultados de biopsia de una medula ósea hipo celular en anemia aplásica; no obstante, la similitud en la aplicación de citometría de flujo para ambos casos es esencial con el fin de determinar el estado que permitió adquirir la enfermedad, como lo puede ser el déficit de GPI.

Para terminar, los tratamientos de ambas patologías se asemejan principalmente en dos: tratamiento inmunosupresor y trasplante de células madre, debido a que las patologías están asociadas en primera medida a un proceso anormal de las células madre pluripotenciales que evitan la hematopoyesis o producen anormalidades que generan posteriormente apoptosis, para el manejo con inmunosupresores se estableció que tanto la HPN como la anemia aplásica están implicadas en procesos inmunológicos que causan estados anormales tanto en médula ósea como en sangre periférica, por ende muchos estudios recomiendan la aplicación de los tratamientos en cada patología. En el caso del anticuerpo monoclonal Eculizumab el cual fue diseñado para la inhibición de complemento sobre células hemáticas como ocurre en HPN, también se reportan respuestas favorables en pacientes con anemia aplásica que usan tratamientos concomitantes con Eculizumab e inmunosupresores, dando un manejo en la deficiencia de GPI y así mismo las anomalías llevadas a cabo en la médula ósea por otros procesos inmunológicos en pacientes con anemia aplásica y déficit de GPI.

## **8. Discusión**

Inicialmente hay varios factores que contribuyen con la destrucción de células madres hematopoyéticas en la patogénesis de la anemia aplásica, se identificó en la revisión que las células T se presentan en la secuencia  $\beta$  del TCR, en HPN el determinante se encontraba enriquecido en células TCD8+ y CD57+ del subconjunto de (HLA) para dar respuesta de

las mismas a un mismo antígeno sin la molécula de restricción CD1d asociada a GPI presente en progenitores hematopoyéticos, infiriendo que al estar ausente GPI como ocurre en personas con HPN pueden las células T generar un efecto en la disminución de progenitores hematopoyéticos, a partir de esto, el estudio realizado por Scheinberg P et al. en el año 2020, soporta que la disfunción de las células T reguladoras se encuentra afectado por el HLA de clase I y II.<sup>5 33 34 61</sup>

A través de la revisión documentada se reporta que la frecuencia de anomalías clonales como mutaciones somáticas son elevadas notificándose más descubrimientos relacionados con el gen PIGA dando como resultado poblaciones clonales de células que carecen de la proteína GPI debido a las mutaciones de pérdida de función somática impulsando la evolución clonal de anemia aplásica y HPN.<sup>5 61</sup>

Un gran porcentaje de pacientes con HPN y anemia aplásica tienen alta probabilidad de presentar hemólisis de acuerdo a la cantidad de clones de HPN y manifestaciones que se puedan presentar de esta enfermedad, adicionalmente estas manifestaciones dependen de la presencia de clones en todas las líneas hemáticas. El apoyo de esta anomalía se sustenta en otro estudio de Lian Y, et al. en el año 2019, donde infiere que el tamaño del clon de HPN en anemia aplásica con evolución de hemólisis agresiva es mayor que los patrones de clones en anemia aplásica con características subclínicas de HPN, sin embargo, se identificó que los pacientes con un patrón evolutivo agresivo presentaban clones HPN en su mayoría en las líneas eritroides-granulocíticas específicamente. Por otra parte, el tamaño de los clones que desencadenan manifestaciones menos agresivas de hemólisis en los pacientes, predice una mejor respuesta al tratamiento inmunosupresor a diferencia de los modelos agresivos presentados.<sup>26 68</sup>

Seguidamente, se determinó en la revisión que la citometría de flujo en muestras de sangre periférica es la modalidad diagnóstica más sensible y específica para evaluar la presencia y el tamaño del clon HPN en presencia de estados anormales de médula ósea como la anemia aplásica, mediante aplicación de marcadores como CD55 / CD59 en poblaciones eritroides. Para líneas monocítica y granulocíticas se determinó el uso de CD24, CD15, CD45, CD14 y CD64 con FLAER. Raza, A, et al. en el año 2014 respaldó la técnica en pacientes diagnosticados previamente con ambas patologías, sin embargo la determinación de

poblaciones eritroides deficientes de GPI se realizó usando una combinación del anticuerpo CD235 a-isotiocianato de fluoresceína y un conjugado de R-ficoeritrina del anticuerpo CD59, en relación con la detección de células granulocíticas y monocíticas se utilizó CD66b, CD24, CD16, CD55 en combinación de CD45 y CD15, los cuales demostraron buenos resultados en la lectura y un análisis de la presencia de HPN en personas con anemia aplásica, al igual que los marcadores determinados en el marco teórico.<sup>36 37 54 62</sup>

Múltiples estudios referenciados en este trabajo final han determinado la relación de HPN y anemia aplásica en pacientes mayores de 30 años teniendo en cuenta varios factores predisponentes como lo son el transcurso crónico de la enfermedad, de la misma forma el desarrollo del sistema inmunológico y la presencia de estados pro inflamatorios que faciliten el desarrollo de las enfermedades. No obstante, otros estudios realizados por Sreedharanunni S, et al. en el año 2016 y Narita A, et al. en el año 2017 justificaron que la literatura sobre HPN relacionada debe centrarse también en pacientes pediátricos, donde se demostró a través de la técnica de citometría de flujo la ausencia de la proteína de GPI en niños menores de 12 años diagnosticados con anemia aplásica, lo cual infirió en la necesidad de un cribado rutinario de HPN basado en FLAER en pacientes pediátricos con anemia aplásica para evitar agravantes, aumentar las opciones del tratamiento y revelar los mecanismos de expansión de clones de HPN en niños con anemia aplásica.<sup>63 66</sup>

La presencia del clon de HPN en pacientes con anemia aplásica fue considerado como factor importante en el desarrollo del trabajo de grado debido a que permite la identificación de nuevos tratamientos dirigidos al manejo de anemia aplásica y de la misma forma predice en una buena respuesta a los tratamientos inmunosupresores como globulina anti linfocítica ciclosporina y andrógenos deduciendo al HPN como un biomarcador predictivo de respuesta en adultos aplicado desde 1 hasta 5 años.<sup>63</sup>

Lo anteriormente dicho se sostiene en compañía de estudios por Kulagin, A, et al. en el año 2014, identificando en primera medida la presencia de clones HPN en pacientes adultos y pediátricos con antecedentes de anemia aplásica hasta casi un 70 % los cuales fueron tratados con terapia inmunosupresora combinada basada en globulina anti-timocitos y ciclosporina, en varios de estos pacientes la presencia de clones de HPN se asoció con buena respuesta a la terapia inmunosupresora administrada en un lapso hasta de 36 meses,

no obstante en el caso de los niños la tasa de respuesta a la terapia inmunosupresora fue mayor en pacientes sin clones de HPN probablemente por las diferencias biológicas entre anemia aplásica adulta y pediátrica.<sup>17 26 51 64</sup>

Otro estudio reclutó un total de 97 pacientes con anemia aplásica y HPN en los cuales presentaron negatividad en la prueba de Ham y sin manifestaciones clínicas compatibles como hemólisis. Se trataron como globulinas anti-timocitos, inmunoglobulina de linfocitos T y ciclosporina, a partir de esto se demostró que la tasa de supervivencia aumentó en los pacientes con HPN+ a diferencia de los HPN - los cuales murieron por aumento en la tasa de infección según lo determinado por Zhao X, et al. en el 2015; al igual que los fundamentos determinados en la revisión se sostiene la viabilidad de la detección de los clones HPN para el manejo de anemia aplásica.<sup>51 65</sup>

El trabajo final habla sobre los tratamientos concomitantes los cuales son poco comunes tratando la anemia aplásica con inmunosupresores y aplicando Eculizumab en pacientes con presencia de clones HPN para minimizar el riesgo de hemólisis intravascular y complicaciones tromboticas en todos los pacientes que presentan las enfermedades. Un estudio realizado por Pagliuca S, et al. en el año 2018 habla sobre el manejo concomitante de terapia inmunosupresora y Eculizumab, indicando que debe considerarse en casos de que los pacientes no presenten un donante compatible para manejo de la anemia y para evitar la hemólisis significativa posterior, se recomienda que la inmunosupresión se administre inmediatamente antes del Eculizumab, o en forma concomitante con el beneficio clínico esperado.<sup>44 67</sup>

## **9. Conclusiones**

Después de la revisión de 68 fuentes, se encontró que la mayoría de aportes sobre HPN provino del continente americano especialmente EE.UU, donde se describe a la HPN como patología de carácter clonal adquirido por déficit de la proteína GPI de la cual depende proteínas reguladoras de complemento principalmente CD55 y CD59 en las membranas de células hemáticas, sus manifestaciones principales son dolor abdominal, ictericia, hemoglobinuria, infecciones y hemorragias frecuentes, de la misma forma presenta complicaciones como anemia aplásica. La técnica Gold estándar para su diagnóstico se

conoce como la citometría de flujo como técnica cuantitativa y su tratamiento puede variar, no obstante, en la mayoría se usa Eculizumab.

Los mayores inconvenientes encontrados posterior a esta indagación se obtuvieron en gran medida documentos provenientes en Canadá, donde la dificultad de diagnóstico se centró en varios factores como: La falta de diagnóstico diferencial en anemias hemolíticas relacionados con un desarrollo de la enfermedad, por otra parte, la dificultad de acceso a la citometría de flujo para la detección de clones compatibles con HPN. En el caso de laboratorios que presentan la técnica especializada, no manejan uniformemente los casos de HPN limitando una estandarización apropiada y la obtención de un control biológico, del mismo modo fallas en el manejo tanto preanalítico como analítico de la prueba disminuye el diagnóstico adecuado.

En relación con la información obtenida de referencias documentales sobre anemia aplásica, se obtuvo mayor información en el Reino Unido donde expusieron a la anemia aplásica como un trastorno medular que da como resultado el fallo de la hematopoyesis, se caracteriza por insuficiencia medular y disminución del tejido hematopoyético. Sus causas son variables como: Factores físicos y químicos, consecuencia de infecciones virales, alteraciones genéticas relacionadas con el gen HLA para desarrollar anomalías en los linfocitos T y mutaciones somáticas en genes como DNMT3A, ASXL1, BCOR/BCORL1 y PIG-A la cual se encuentra estrechamente relacionada con la proteína GPI, relacionando en primera medida la fisiopatología de anemia aplásica con la presencia de clones compatibles con HPN.

La documentación que relaciona la anemia aplásica con HPN se encontró mayor información en EE. UU y Reino Unido con ayuda de otros países. Donde se infirió que entre el 50 al 70 % de los pacientes diagnosticados con anemia aplásica presentan células compatibles con clones HPN deficientes de GPI, a causa de un grupo de procesos fisiopatológicos en donde pacientes con células deficientes de GPI no permiten que las células CD34+ produzcan cantidad de CFU-Meg para la formación de trombopoyetina, así mismo las células T citotóxicas en este tipo de pacientes producen apoptosis de las células CD34+ como proceso autoinmune de las células T, otro proceso descrito demostró que la molécula CD1d no permite la acción de células T a un mismo antígeno y se encuentra

asociado a GPI, de esta forma al encontrarse permite a las células T atacar a los mismos progenitores hematopoyéticos. Así mismo la desregulación de células T se encuentra afectado por el HLA de estos pacientes.

El papel que cumple el diagnóstico de HPN en una persona que presenta anemia aplásica para la respuesta óptima de un tratamiento se demostró mediante: tratamientos inmunosupresores como globulina antitimocítica, ciclosporina y andrógenos muestran mejor tasa de respuesta en pacientes diagnosticados con anemia aplásica y presencia de clones HPN, adicionalmente la respuesta al tratamiento es dependiente al tipo de HPN y la cantidad de clones presentados deduciendo que a mayor cantidad de clones y presencia de manifestaciones hemolíticas disminuye la efectividad del tratamiento para la anemia aplásica a diferencia de los pacientes con tipo de HPN sin manifestaciones y bajo nivel de clones. Por otro lado, el uso de tratamientos concomitantes como el Eculizumab e inmunosupresores demostraron que permiten un manejo adecuado de anemia aplásica para el aumento del recuento de población hemática mientras minimiza el riesgo de hemólisis intravascular y complicaciones trombóticas.

Finalmente el diagnóstico de HPN favorece el manejo de anemia aplásica con población celular deficiente de GPI, debido a que el análisis por citometría de flujo a muestras pertenecientes a pacientes con anemia aplásica permite establecer la presencia de células compatibles con clones deficientes de GPI, este hallazgo ha permitido indicar nuevas alternativas en el manejo terapéutico que se le brindan a estos pacientes como la aplicación del Eculizumab la cual no es utilizada en estos casos, seguidamente otro de los beneficios que otorga estos hallazgos están relacionados a que la presencia del clon deficiente de GPI es establecido como biomarcador para una respuesta favorable a la aplicación de múltiples tratamientos inmunosupresores para estos pacientes aumentando en recuento de poblaciones hemáticas.

## **10. Recomendaciones**

La carencia de información sobre la HPN en la población colombiana así como la estrecha relación que presenta con la anemia aplásica disminuye la capacidad de supervivencia de las personas que padecen HPN y otra perspectiva terapéutica en pacientes que presentan anemia aplásica, debido a esto es necesario verificar la presencia de clones compatibles con

HPN en pacientes que hayan llevado a cabo procesos hemolíticos sin un diagnóstico determinante de patologías adversas, así mismo es necesario aplicarlo en pacientes previamente diagnosticados con anemia aplásica con el fin de analizar nuevos tratamientos los cuales fueron incluidos en esta revisión.

En el caso de los lugares con acceso limitado a metodologías especializadas, es recomendable remitir los casos clínicos sospechosos por estudios los test de Ham, Sucrosa y otros exámenes para HPN y en personas con anemia aplásica complicada a lugares autorizados donde se realicen adecuadamente las técnicas de citometría. En otros casos con acceso a las técnicas de citometría es necesario revisar adecuadamente los procesos pre analíticos y capacitarse profesionalmente para la fase analítica de la misma.

Para futuros proyectos de investigación se recomienda que soliciten confirmar en la población colombiana la presencia de clones compatibles con HPN en personas que presentan anemia aplásica, demostrando la efectividad de la misma para la aplicación de tratamientos concomitantes adecuados que permitan el manejo de ambas patologías y aumenten la tasa de supervivencia de los pacientes. Así mismo, se debe tomar en cuenta una población estudio con características de anemia aplásica e identificar por citometría de flujo sostienen poblaciones con clones de HPN y definir estadísticamente el tamaño de población con ambas patologías, para así mismo afianzar al sector salud sobre la importancia de esta tipificación.

Por último, el estudio en población con enfermedades como anemia aplásica y HPN presenta múltiples dificultades debido a que estas se encuentran en poblaciones con difícil acceso historias clínicas que faciliten el desarrollo de un análisis adecuado, de la misma forma el estado de los pacientes que perfilan adecuadamente para el estudio es crítico lo cual disminuye la posibilidad de contacto. Sin embargo, se sugiere pedir apoyo por parte de todo el sector salud para facilitar cada una de las adversidades que se puedan presentar y desarrollar las ventajas que se obtendrán tras el desarrollo del análisis realizado tomando como base esta revisión.

## **11. Referencias bibliográficas**

1. Brodsky R. Narrative Review: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: The Physiology of Complement - Related Hemolytic Anemia. *Annals of internal*

- medicine [Internet]. 2008 [Cited 2019 Ago 02];148. 587-95. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/5438322\\_Narrative\\_Review\\_Paroxysmal\\_Nocturnal\\_Hemoglobinuria\\_The\\_Physiology\\_of\\_Complement-Related\\_Hemolytic\\_Anemia](https://www.researchgate.net/publication/5438322_Narrative_Review_Paroxysmal_Nocturnal_Hemoglobinuria_The_Physiology_of_Complement-Related_Hemolytic_Anemia)
2. Hernández L. Avances y aplicación clínica de la citometría hemática automatizada. Rev cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2013 [cited 2019 Oct 05]; 29(1): 24-39. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892013000100004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892013000100004&lng=es)
  3. Ferrer V, Mendoza E, García J, Collazo J, León Frecuencia de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna en pacientes mexicanos con anemia aplásica tratados con andrógenos. Rev Med Hosp Gen Mex [Internet]. 2008 [Cited 2019 Ago 24]; 71. (3). Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2008/hg083d.pdf>
  4. Sánchez E, García T, Bretón M., Blasco C, Poza A, Blázquez R et al. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: Novedades patogénicas y terapéuticas. An. Med. Interna (Madrid) [Internet]. 2001 [cited 2019 Ago 11]; 18(8): 45-49. Available from:
  5. Meletis J, Terpos E. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Clinical presentation and association with other haematological disorders. Haema [Internet]. 2001 [Cited Ago 15];4,79-88.4.79. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/215529678\\_PAROXYSMAL\\_NOCTURNAL\\_HAEMOGLOBINURIA\\_Clinical\\_presentation\\_and\\_association\\_with\\_other\\_haematological\\_disorders](https://www.researchgate.net/publication/215529678_PAROXYSMAL_NOCTURNAL_HAEMOGLOBINURIA_Clinical_presentation_and_association_with_other_haematological_disorders)
  6. Meletis J, Terpos E, Mavrogianni D, Lilakos K. Aplastic anaemia with large "PNH-like" red cell population. Haema. [Internet]. 2003 [Cited 2019 Ago 16]; 6(1). Available from : [https://www.researchgate.net/publication/242510252\\_Aplastic\\_anaemia\\_with\\_large\\_PNH-like\\_red\\_cell\\_population](https://www.researchgate.net/publication/242510252_Aplastic_anaemia_with_large_PNH-like_red_cell_population)
  7. Ceballos A, Saldaña R., Pequeño M, Salazar M, Méndez N et al; Detección de clones de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna por citofluorometría de cuatro colores en un laboratorio de hematología del Noreste de México. Rev Hematol Mex. [Internet]. 2012 [Cited 2019 Oct 05];13(3):95-98. Available from: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=36696>
  8. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M et al. For the International PNH Interest Group; Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood [Internet]. 2005 [Cited 2019 Ago 15]; 106 (12): 3699–

3709. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/106/12/3699/109767/Diagnosis-and-management-of-paroxysmal-nocturnal>
9. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami et al. Minor population of CD55<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup> blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* [Internet]. 2006 [Cited 2019 Ago 24]; 107 (4): 1308–1314. Available from : <https://ashpublications.org/blood/article/107/4/1308/133667/Minor-population-of-CD55-CD59-blood-cells-predicts>
  10. Schubert J, Hillmen P, Dührsen U, Young N, Elebute M et al. Treatment with the Terminal Complement Inhibitor Eculizumab Improves Anemia in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Phase III Triumph Study Results. *Blood* [Internet] 2006 [Cited 2019 Oct 15]; 108 (11): 124. Available From: [http://www.bloodjournal.org/content/108/11/124?sso-checked=true&utm\\_source=TrendMD&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Blood\\_TrendMD\\_0](http://www.bloodjournal.org/content/108/11/124?sso-checked=true&utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Blood_TrendMD_0)
  11. Aguirre E, Ballester S, Pardo S. Tratamiento de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: revisión bibliográfica y estudio de utilización del Eculizumab. Trabajo fin de grado [Internet]. 2015 [Cited 2019 Oct 16]; Available From: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ELVIRA%20AGUIRRE%20LANDERAS.pdf>
  12. Marsh J, Ganser A, Stader M. Hematopoietic growth factors in the treatment of acquired bone marrow failure states [Internet]. 2007 [Cited 2019 Oct 15]; 44:138-147. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0037196307000649?via%3Dihub>
  13. Borowitz M, Craig F, DiGiuseppe J, Illingworth A, Rosse W et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry* [Internet]. 2010 [Cited 2019 Oct 10] ;78B: 211-230. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.b.20525>
  14. Scheinberg P, Wu C, Nunez O, Young, N. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *British Journal of Haematology* [Internet]. 2008 [Cited 2019 Oct 16]; 144: 206-216. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2008.07450.x>

15. Mondragón A, Rojas J, Jiménez C, Umaña J. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: reporte de un caso. Investigación. Andina [Internet] 2013 Apr [Cited 2019 Oct 05]; 15(26): 716-723. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-81462013000100009&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-81462013000100009&lng=en)
16. Consenso Español. Consenso español para diagnóstico y tratamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Guía clínica HPN - SEHH [Internet]. 2018 [Cited 2019 Oct 23]. Available from :[www.sehh.es](http://www.sehh.es) > recursos > documentos > guías Guías\_Clínicas\_HP\_N\_2014
17. Griffin M, Kulasekararaj A, Gandhi S, Munir T, Richards S et al. Concurrent treatment of aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome with immunosuppressive therapy and eculizumab: a UK experience. Haematologica [Internet]. 2018 [Cited 2019 Oct 23]; 103(8), e345–e347. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6068026/>
18. Risitano A, Marotta S. Toward complement inhibition 2.0: Next generation anticomplement agents for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Am J Hematol [Internet]. 2018 [Cited 2019 Oct 23]; 93: 564 - 577. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajh.25016>
19. Pu J, Brodsky R. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria from bench to bedside: Clinical and translational science. CTS [Internet]. 2011 [Cited 2019 Oct 30]; 4(3), 219–224. Available from: doi:10.1111/j.1752-8062.2011.00262.x
20. Brodsky R. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Blood [Internet]. 2014 [Cited 2019 Oct 23]; 124 (18): 2804–2811. Available from: doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-522128>
21. Gaona C. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Hematología la sangre y sus enfermedades. [Internet]. 2015 [Cited 2019 octubre 25]; 2 (14): 61-66. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1732&sectionid=121014669>
22. Sharma V. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pathogenesis, Testing, and Diagnosis. Hematology and Oncology [Internet]. 2013 [Cited 25 Oct. 2019]; 11(9). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/6a21/b4c278c0de3939e094dbaa64c5b0e06f38c7.pdf>
23. López M. El sistema del Complemento: un mecanismo innato de defensa. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular [Internet]. 2010 [Cited 28 Oct 2019];

Available from: <https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/288-el-sistema-del-complemento-un-mecanismo-innato-de-defensa>

24. Parker C. Bone Marrow Failure Syndromes: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematology/Oncology Clinics of North America* [Internet]. 2009 [Cited 28 Oct 2019]; 23(2), 333-346. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.01.014>.
25. Machín S, Svarch E, Dorticós E. Aplasia medular: Actualización. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 1999 [Cited 2019 Nov 02]; 15(2): 79-90. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02891999000200001&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02891999000200001&lng=es)
26. Pagliuca S, Risitano A, De Fontbrune F et al. Combined intensive immunosuppression and Eculizumab for aplastic anemia in the context of hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2018 [Cited 2019 Nov 02]; 53, 105–107. Available from: [doi:10.1038/bmt.2017.220](https://doi.org/10.1038/bmt.2017.220)
27. Salido E, Cabañas V, Moraleta J. Anemia aplásica. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. *Medicine* [Internet]. 2016 [Cited 2020 Ene 27]; 12(20), 1159–1169. Available from: [doi: 10.1016/j.med.2016.10.004](https://doi.org/10.1016/j.med.2016.10.004)
28. Sociedad Argentina de Hematología. Síndromes de fallo medular. PDF[Internet] 2019 [Cited 2020 Ene 27] Available from: [http://www.sah.org.ar/docs/2019/Sindromes\\_de\\_Fallo\\_Medular.pdf](http://www.sah.org.ar/docs/2019/Sindromes_de_Fallo_Medular.pdf)
29. Killick S, Bown N, Cavenagh J, Dokal I, Foukaneli T et al. Directrices para el diagnóstico y el tratamiento de la anemia aplásica del adulto. *Fr. J. Haematol* [Internet]. 2016 [Cited 2020 Ene 27];172: 187-207. Available from: [doi: 10.1111 /bjh.13853](https://doi.org/10.1111/bjh.13853)
30. Dulau-Florea A, Maric I, Calvo K, Braylan R. Detection of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) in bone marrow aspirates. *Seminars in Hematology* [Internet]. 2019 [Cited 2020 Ene 27];56(1):65-68. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2162/10.1053/j.seminhematol.2018.05.011>
31. Feher J. White Blood Cells and Inflammation. *Quantitative Human Physiology* [Internet]. 2012 [Cited 2020 Ene 29];507-515. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012800883600046X>

32. Mufti GJ, Marsh J. Somatic Mutations in Aplastic Anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* [Internet]. 2018 [Cited 2020 Ene 29];32(4):595-607. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.03.002>
33. Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, Talini G, Chaidos A et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood* [Internet]. 2013 [Cited 2020 Ene 29];121 (14): 2753–2761. Available from: doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-469353>
34. Gargiulo L, Zaimoku Y, Scappini B, Maruyama H, Ohumi R et al; Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN- $\gamma$ -producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia. *Blood* [Internet]. 2017 [Cited 2020 Feb 15];129 (3): 388–392. Available from: doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-740845>
35. Keeney M, Illingworth A, Sutherland D. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Assessment by Flow Cytometric Analysis. *Clinics in Laboratory Medicine* [Internet]. 2017 [Cited 2020 Feb 15];37(4):855-867. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2162/10.1016/j.cll.2017.07.007>
36. Sutherland D, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high- sensitivity detection and monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry* [Internet]. 2012 [Cited 2020 Feb 15]; 82B: 195-208. Available from: doi:10.1002/cyto.b.21023
37. Sutherland D, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H et al. Diagnóstico PNH con FLAER y citometría de flujo multiparamétrica. *Citometría* [Internet]. 2007 [Cited 2020 Feb 15]; 72B: 167-177. Available from: doi: 10.1002 / cyto.b.20151
38. Díaz G, Marsán V, Sánchez A. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2019 [Cited 2020 Feb 15];35(1). Available from: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/930>
39. Gavriilaki E, Yuan X, Ye Z, Ambinder A, Shanbhag S et al. Modified Ham test for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* [Internet]. 2015 [Citado 2020 Feb 20]; 125 (23): 3637–3646. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629683>
40. Ceballos A, Saldaña R, Pequeño M, Salazar M, Mendez M et al. Detección de clonas de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna por citometría de cuatro colores en un laboratorio de hematología del Noreste de México. *Rev Hematol Mex* [Internet]. 2012 [Cited 2020 Feb 27]; 13(3):95-98. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2012/re123b.pdf>

41. Mondragón A, Rojas J, Jiménez C, Umaña H. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: reporte de un caso. *Investigaciones Andina* [Internet]. 2012 [Cited 2020 Feb 27]; 26 (15) - 108. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inan/v15n26/v15n26a09.pdf>
42. Milanés T, Fernández N, Fundora T, Jaime J, Hernández P. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: Actualización. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2003 [Cited 2020 Feb 27]; 19(1). Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892003000100001&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892003000100001&lng=es).
43. Vallet N, de Fontbrune F, Loschi M, Desmier D, Villate A et al. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria previously treated with eculizumab: a retrospective study of 21 patients from SFGM-TC centers. *Haematologica* [Internet]. 2018 [Cited 2020 Feb 27];103(3): e103–e105. Available from: doi:10.3324/haematol.2017.182360
44. Kulasekararaj A, Gandhi S , Potter V, Benson N . Feasibility and Optimal Schedule Of Using Eculizumab In Patients With Hemolytic Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) With Severe Aplastic Anemia (SAA) Prior To Haemopoietic Stem Cell Transplant (HSCT). *Blood* [Internet]. 2013 [Cited 2020 Mar 17]; 122 (21): 2482-2482. Available from: 10.1182 / blood. V122.21.2482.2482
45. Villegas A, Arrizabalaga B, Bonanad S, Colado E, Gaya A et al. Spanish consensus statement for diagnosis and treatment of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. *Medicina Clínica (English Edition)*. [Internet]. 2016 [Cited 2020 Mar 17];146(6): 278.e1-278.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.05.008>
46. Kester M, Karpa KD, Vrana K. *Hematology. Elsevier's Integrated Review Pharmacology (Second Edition)* [Internet]. 2012 [Cited 2020 Mar 17]:111-124. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2162/10.1016/B978-0-323-07445-2.00007-0>
47. Kelly R, Höchsmann B, Jeff S, Austin K, Röth A et al. Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med* [Internet] .2015 [Cited 2020 Mar 18];10;373(11):1032-1039. Available from: 10.1056/NEJMoa1502950
48. Sica M, Rondelli T, Ricci P, Angioletti M, Risitano A et al. Eculizumab treatment: stochastic occurrence of C3 binding to individual PNH erythrocytes. *J Hematol Oncol*. [Internet]. 2017 [Cited 2020 Mar 17];10, 126. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2162/10.1186/s13045-017-0496-x>

49. Loschi M, Porcher R, Barraco F, Terriou L, Mohty M et al. Impact of Eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no- treatment study. *Am. J. Hematol.* [Internet] 2016 [Cited 2020 Mar 17] ;91: 366-370. Available from: doi:10.1002/ajh.24278
50. Narita A, Muramatsu H, Sekiya Y, Okuno Y, Sakaguchi H et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica* [Internet]. 2015 [Cited 2020 Mar 18];100(12):1546-1552. Available from: doi:10.3324/haematol.2015.132530
51. Scheinberg P, Marte M, Nunez O, Young NS. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica* [Internet] 2010 [Cited 2020 Mar 20];95(7):1075-1080. Available from: doi:10.3324/haematol.2009.017889
52. Yoshida N, Yagasaki H., Takahashi Y, Yamamoto T, Liang, J et al. Clinical impact of HLA- DR15, a minor population of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria- type cells, and aplastic anaemia- associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *British Journal of Haematology* [Internet.] 2008 [Cited 2020 Mar 20]; 142: 427-435. Available from: doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07182.x
53. Florea D, Young N, Jordan E, Maric I, Braylan R. Bone marrow aspirate samples are equal to peripheral blood for the detection of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Leukemia Research* [Internet]. 2017 [Cited 2020 Abr 12];55: 1. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(17\)30267-9](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(17)30267-9)
54. Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, Ghosh K. Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *European Journal of Haematology* [Internet]. 2009 [Cited 2020 Abr 14]; 83: 503-511. Available ifrom: doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01338.x
55. Sutherland D, Acton E, Keeney M, Davis B, Illingworth A. Use of CD157 in FLAER Based Assays for High- Sensitivity PNH Granulocyte and PNH Monocyte Detection. *Cytometry Part B* [Internet]. 2014 [Cited 2020 Abr 20]; 86B: 44– 55. Available from: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21111>
56. Sutherland D, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high- sensitivity detection and monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry* [Internet]. 2012 [Cited 2020 Abr 20]; 82B: 195-208. Available from: doi:10.1002/cyto.b.21023

57. Richards S, Whitby L, Cullen M, Dickinson A, Granger V et al. Development and evaluation of a stabilized whole- blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry* [Internet]. 2009 [Cited 2020 Abr 20];76B: 47-55. Available from: doi:10.1002/cyto.b.20438
58. Marinov I, Kohoutová M, Tkáčová V, Lysák D, Holubová M et al. Intra- and interlaboratory variability of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria testing by flow cytometry following the 2012 practical guidelines for high- sensitivity paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing. *Cytometry Part B* [Internet]. 2013 [Cited 2020 Abr 29]; 84B: 229– 236. Available from: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21075>
59. Park S, Jeong J, Lee S, Won Yoo D, Choi Y et al. Comparison of High Sensitivity and Conventional Flow Cytometry for Diagnosing Overt Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Detecting Minor Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones. *Ann Lab Med* [Internet]. 2019 [Cited 2020 May 3] ;(2):150-157. Available from: doi:10.3343/alm.2019.39.2.150
60. Brando B, Gatti A, Preijers F. Flow Cytometric Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pearls and Pitfalls - A Critical Review Article. *EJIFCC*, [Internet] 2019 [Cited 2020 May 3]; 30(4), 355–370. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893893/>
61. Brzeźniakiewicz K., Rupa J, Gil, L. Acquired Aplastic Anemia as a Clonal Disorder of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* [Internet] 2020 [Cited 2020 Jun 12]; 16, 472–481. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09971-y>
62. Raza A, Ravandi F, Rastogi A, Bubis J, Lim S et al. A prospective multicenter study of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure. *Cytometry. Part B Clinical cytometry* [Internet]. 2014 [Cited 2020 Jun 12]; 86(3), 175–182. Available from: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21139>
63. Sreedharanunni S, Sachdeva M, Bose P, Varma N, Bansal D. Frequency of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones by Multiparametric Flow Cytometry in Pediatric Aplastic Anemia Patients of Indian Ethnic Origin. *Pediatric blood & cancer* [Internet] 2016 [Cited 2020 Jun 12]; 63(1), 93–97. Available from: <https://doi.org/10.1002/pbc.25691>
64. Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, Golubovskaya I, Kruchkova et.al. Prognostic value of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two- centre prospective study. *Br J Haematol* [Internet]. 2014 [Cited 2020 Jun 12]; 164: 546-554. Available from: doi:10.1111/bjh.12661

65. Zhao X, Zhang L, Jing L, Zhou K, Li Y, Peng G et al. The role of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in response to immunosuppressive therapy of patients with severe aplastic anemia. *Ann Hematol* [Internet]. 2015 [Cited Jul 4]; 07;94(7):1105-1110. Available from: doi:10.1007/s00277-015-2348-5
66. Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K et al. Development of clinical Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria in children with aplastic anaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2017 [Cited Jul 15]; 178: 954-958. Available from: doi:10.1111/bjh.14790
67. Pagliuca S, Risitano A, De Fontbrune F, Robin M, Iori A et al. Combined intensive immunosuppression and eculizumab for aplastic anemia in the context of hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2018 [Cited Jul 15]; 01;53(1):105-107. Available from: DOI:10.1038/bmt.2017.220
68. Lian Y, Shi J, Nie N, Huang Z, Shao Y et al. Evolution patterns of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria clone and Clinical implications in acquired bone marrow failure. *Society for Hematology and Stem Cells* [Internet]. 2019 [Cited Jul 24]; 77: 41-50. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2162/10.1016/j.exphem.2019.08.005>

## **12. Anexos**

### **Anexo 1.**

**Tabla 2.** Síntesis de información documental Importancia del diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna como manejo de anemia aplásica con población deficiente de GPI.

|                   |                |                   |  |                           |  |   |                                |
|-------------------|----------------|-------------------|--|---------------------------|--|---|--------------------------------|
|                   | Estados unidos | 14                | Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia.  | 2008                      | Scheinberg P. , Wu C, Nunez O., Young, N.                            | <b>Anemia aplásica:</b><br>Tratamientos   | Antecedentes                   |
|                   | Colombia       | 15                | Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: reporte de un caso. Investigación. Andina   | 2013                      | Mondragón A, Rojas J, Jiménez C, Umaña J.                            | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Caso clínico                              | Antecedentes                   |
|                   | Estados unidos | 19                | Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria from Bench to Bedside  | 2011                      | Pu J., & Brodsky R.  | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento | Marco teorico                  |
|                   | Estados unidos | 20                | Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria.   | 2014                      | Brodsky R.   | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Fisiopatología y tratamiento              | Marco teorico                  |
|                   | Mexico         | 21                | Hemoglobinuria Paroxística Nocturna  | 2015                      | Gaona C.   | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Fisiopatología                            | Marco teorico                  |
|                   | Estados unidos | 22                | Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pathogenesis, Testing, and Diagnosis  | 2013                      | Sharma V.  | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Fisiopatología y diagnóstico              | Marco teorico                  |
|                   | Estados unidos | 24                | Bone Marrow Failure Syndromes: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria   | 2009                      | Parker C.  | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y Anemia aplásica:</b> Fisiopatología          | Marco teorico                  |
|                   | Cuba           | 25                | Aplasia medular. Actualización   | 1999                      | Machín S, Svarch E, Dorticós E.                                      | <b>Anemia aplásica:</b> Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento                     | Marco teorico                  |
| <b>CONTINENTE</b> | <b>PAIS</b>    | <b>No. DE REF</b> | <b>TITULO DEL ARTICULO</b>   | <b>ANO DE PUBLICACION</b> | <b>AUTORES</b>   | <b>TEMA PRINCIPAL EXPUESTO</b>  | <b>UTILIDAD EN LA REVISIÓN</b> |
|                   | Estados unidos | 1                 | Narrative Review: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: The Physiology of Complement-Related Hemolytic Anemia.  | 2008                      | Brodsky R  | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Fisiopatología                            | Antecedentes                   |
|                   | Cuba           | 2                 | Avances y aplicación clínica de la citometría hemática automatizada  | 2013                      | Humberto L   | <b>Hemoglobinuria paroxística Nocturna:</b> Diagnóstico                               | Antecedentes                   |
|                   | Mexico         | 3                 | Frecuencia de hemoglobinuria paroxística nocturna en pacientes mexicanos con anemia aplásica tratados con andrógenos                                     | 2008                      | Ferrer V , Mendoza E, García J, Collazo J, León G;                   | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y Anemia aplásica:</b> Tratamientos            | Antecedentes                   |
|                   | Mexico         | 7                 | Detección de clones de hemoglobinuria paroxística nocturna por citofluorometría de cuatro colores en un laboratorio de hematología del Noreste de México | 2012                      | Ceballos A. , Saldaña R. , Pequeño M., Salazar M, Méndez N et.al;    | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Diagnóstico                               | Antecedentes                   |
|                   | Estados unidos | 8                 | Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.   | 2005                      | Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R et al. | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:</b> Diagnóstico y tratamiento                 | Antecedentes                   |
| <b>América</b>    | Estados unidos | 13                | Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related   | 2010                      | Borowitz M, Craig F, DiGiuseppe J, Illingworth A, Rosse W et.al      | <b>Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y Anemia aplásica:</b> Diagnóstico             | Antecedentes                   |

|         |                |    |  |      |  |  |               |
|---------|----------------|----|--|------|--|--|---------------|
|         | Estados unidos | 39 | Modified Ham test for atypical hemolytic uremic syndrome   | 2015 | Gavrillaki E, Yuan X, Ye Z, Ambinder A, Shanbhag S et al.    | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna:Diagnóstico                                   | Marco teorico |
|         | Mexico         | 40 | Detección de clonas de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna por citometría de cuatro colores en un laboratorio de hematología del Noreste de México         | 2012 | Ceballos A, Saldaña R, Pequeño M, Salazar M, Mendez M et al. | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna:Diagnóstico                                   | Marco teorico |
|         | Cuba           | 42 | Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: Actualización. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter   | 2003 | Milanés T, Fernández N, Fundora T, Jaime J, Hernández P.     | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Fisiopatología, diagnóstico y complicaciones | Marco teorico |
|         | Estados unidos | 46 | Elsevier Integrated Review Pharmacology  | 2012 | Kester M, Karpa KD, Vrana K. Hematology.                     | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna:Tratamiento                                   | Marco teorico |
|         | Estados unidos | 51 | Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. Haematologica. | 2010 | Scheinberg P, Marte M, Nunez O, Young NS.                    | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamientos               | Marco teorico |
|         | Estados unidos | 53 | Bone marrow aspirate samples are equal to peripheral blood for the detection of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria.                                       | 2017 | Florea D, Young N, Jordan E, Maric I, Braylan R.             | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Diagnostico                | Marco teorico |
|         | Canadá         | 55 | Use of CD157 in FLAERBased Assays for High-Sensitivity PNH Granulocyte and PNH Monocyte  | 2013 | Sutherland D, Acton E, Keeney M, Davis B, Illingworth A      | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna:Dificultad de diagnóstico                     | Marco teorico |
| America | Argentina      | 28 | Síndromes de fallo medular   | 2019 | Sociedad Argentina de Hematología.                           | Anemia aplásica: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento                         | Marco teorico |
|         | Estados unidos | 30 | Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) in bone marrow aspirates.   | 2019 | Dulau-Florea A, Maric I, Calvo K, Braylan R.                 | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Diagnóstico                | Marco teorico |
|         | Estados unidos | 31 | White Blood Cells and Inflammation.  | 2012 | Feher J.   | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Fisiopatología             | Marco teorico |
|         | Estados unidos | 35 | Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Assessment by Flow Cytometric Analysis.  | 2017 | Keeney M, Illingworth A, Sutherland D.                       | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna:Diagnóstico                                   | Marco teorico |
|         | Canadá         | 36 | Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring   | 2012 | Sutherland D, Keeney M,                                      |  | Marco teorico |

|             |                |   |   |  |  |  |               |
|-------------|----------------|---|---|--|--|--|---------------|
|             | Canadá         | 56  | Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry.                           | 2012   | Sutherland D, Keeney M, Illingworth A.                                 | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Dificultad de diagnóstico                      | Marco teorico |
|             | Estados unidos | 62  | A prospective multicenter study of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure. Cytometry                                      | 2014   | Raza A, Ravandi F, Rastogi A, Bubis J, Lim S et al.                    | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Diagnóstico                  | Discusión     |
| Europa      | España         | 4   | Hemoglobinuria paroxística nocturna: Novedades patogénicas y terapéuticas. An. Med  | 2001   | Sánchez E, García T, Bretón M., Blasco C., Poza A., Blázquez R. et al. | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Fisiopatología y tratamiento | Antecedentes  |
|             | Grecia         | 5   | Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria : Clinical presentation and association with other haematological disorders   | 2001   | Meletis J, Terpos E.   | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Complicaciones                                 | Antecedentes  |
|             | Grecia         | 6   | Aplastic anaemia with large "PNH-like" red cell population  | 2003   | Meletis J, Terpos E, Mavrogianni D, Liakos K.                          | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Diagnóstico                  | Antecedentes  |
|             | Alemania       | 10  | Treatment with the Terminal Complement Inhibitor Eculizumab Improves Anemia in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Phase III Triumph Study Results | 2006   | Schubert J, Hillmen P, Dührsen U, Young N, Elebute M et al;            | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento                  | Antecedentes  |
|             | España         | 11  | TRATAMIENTO DE LA HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y ESTUDIO DE UTILIZACIÓN DEL ECULIZUMAB   | 2015   | Aguirre E, Ballester S. Pardo S;                                       | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Tratamiento                                    | Antecedentes  |
|             | Reino Unido    | 12  | Hematopoietic Growth Factors in the Treatment of Acquired Bone Marrow Failure States  | 2007   | Marsh J, Ganser A, Stader M;   | Anmia aplásica: Tratamiento  | Antecedentes  |
|             | España         | 16  | Consenso español para diagnóstico y tratamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna  | 2014   | Consenso Español   | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Diagnóstico y tratamiento                      | Antecedentes  |
|             | Reino Unido    | 17  | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Tratamiento   | 2018   | Griffin M, Kulasekararaj A, Gandhi S, Munir T, Richards et al.         | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento                  | Antecedentes  |
|             | Italia         | 18  | Toward complement inhibition 2.0: Next generation anticomplement agents for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria   | 2018   | Risitano A, Marotta S.   | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Tratamiento                                    | Antecedentes  |
|             | España         | 23  | El sistema del Complemento: un mecanismo innato de defensa  | 2010   | López M  | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Fisiopatología                                 | Marco teorico |
| Francia     | 26             | Combined intensive immunosuppression and eculizumab for aplastic anemia in the context of hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a retrospective analysis | 2018  | Pagliuca S, Risitano A, De Fontbrune F et al.              | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento    | Marco teorico  |               |
| España      | 27             | Anemia aplásica. Hemoglobinuria paroxística nocturna. Medicine  | 2016  | Salido E, Cabañas V, Moraleda J.                           | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Fisiopatología | Marco teorico  |               |
| Reino Unido | 29             | Directrices para el diagnóstico y el tratamiento de la anemia aplásica del adulto   | 2015  | Killick S, Bown N, Cavenagh J, Dokal I, Foukaneli T et al. | Anemia aplásica: Fisiopatología, diagnóstico, tratamiento              | Marco teorico  |               |

|  |                 |    |  |      |   |   |               |
|--|-----------------|----|--|------|---|---|---------------|
|  | Italia          | 48 | Eculizumab treatment: stochastic occurrence of C3 binding to individual PNH erythrocytes   | 2017 | Sica M, Rondelli T, Ricci P, Angioletti M, Risitano A et al   | <b>Hemoglobinuria Paroxisitica Nocturna:Tratamientos</b>              | Marco teorico |
|  | Francia         | 49 | Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no-treatment study   | 2015 | Loschi M, Porcher R, Barraco F, Terriou L, Mohty M et al      | <b>Hemoglobinuria Paroxisitica Nocturna:Tratamientos</b>              | Marco teorico |
|  | Reino Unido     | 57 | Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry  | 2008 | Richards S, Whitby L, Cullen M, Dickinson A, Granger V et al. | <b>Hemoglobinuria Paroxisitica Nocturna:Dificultad de diagnóstico</b> | Marco teorico |
|  | Republica Checa | 58 | Intra- and interlaboratory variability of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing by flow cytometry following the 2012 practical guidelines for high-sensitivity paroxysmal nocturnal hemoglobinuria testing | 2013 | Marinov I, Kohoutová M, Tkáčová V, Lysák D, Holubová M et al. | <b>Hemoglobinuria Paroxisitica Nocturna:Dificultad de diagnóstico</b> | Marco teorico |
|  | Italia          | 60 | Comparison of High Sensitivity and Conventional Flow Cytometry for Diagnosing Overt Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Detecting Minor Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones.                          | 2019 | Park S, Jeong J, Lee S, Won Yoo D, Choi Y et al               | <b>Hemoglobinuria Paroxisitica Nocturna:Dificultad de diagnóstico</b> | Marco teorico |
|  | Polonia         | 61 | Acquired Aplastic Anemia as a Clonal Disorder of Hematopoietic Stem Cells  | 2020 | Brzeźniakiewicz K., Rupa J, Gil, L.                           | <b>Anemia aplàsica: Fisiopatología</b>                                | Discusión     |

|        |             |    |   |      |  |   |               |
|--------|-------------|----|---|------|--|---|---------------|
| Europa | Reino Unido | 32 | Somatic Mutations in Aplastic Anemia  | 2018 | Mufti GJ, Marsh J  | Anemia aplásica:<br>Fisiopatología  | Marco teorico |
|        | Reino Unido | 33 | Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria   | 2013 | Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, Talini G, Chaidos A et al   | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica:<br>Fisiopatología | Marco teorico |
|        | Italia      | 34 | Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN- $\gamma$ -producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia   | 2017 | Gargiulo L, Zaimoku Y, Scappini B, Maruyama H, Ohumi R et al   | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica:<br>Fisiopatología | Marco teorico |
|        | Francia     | 43 | Hematopoietic stem cell transplantation for patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria previously treated with eculizumab: a retrospective study of 21 patients from SFGM-TC centers                   | 2017 | Vallet N, de Fontbrune F, Loschi M, Desmier D, Villate A et al | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna:Tratamientos                         | Marco teorico |
|        | Reino Unido | 44 | Feasibility and Optimal Schedule Of Using Eculizumab In Patients With Hemolytic Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) With Severe Aplastic Anemia (SAA) Prior To Haemopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) | 2013 | Kulasekararaj A, Gandhi S, Potter V, Benson N                  | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica:<br>Tratamiento    | Marco teorico |
|        | España      | 45 | Spanish consensus statement for diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria   | 2016 | Villegas A, Arrizabalaga B, Bonanad S, Colado E, Gaya A et al  | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Diagnóstico y tratamientos          | Marco teorico |
|        | Reino Unido | 47 | Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria  | 2015 | Kelly R, Höchsmann B, Jeff S, Austin K, Röth A et al           | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna:Tratamientos                         | Marco teorico |

|         |       |  |   |   |  |  |           |
|---------|-------|--|---|---|--|--|-----------|
| Asia    | Corea | 59   | Comparison of High Sensitivity and Conventional Flow Cytometry for Diagnosing Overt Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Detecting Minor Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones. | 2019  | Park S, Jeong J, Lee S, Won Yoo D, Choi Y et al                                      | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Dificultad de diagnóstico                      | Discusión |
|         | India | 63   | Frequency of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones by Multiparametric Flow Cytometry in Pediatric Aplastic Anemia Patients of Indian Ethnic Origin                                 | 2016  | Sreedharanunni S, Sachdeva M, Bose P, Varma N, Bansal D.                             | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Diagnóstico                  | Discusión |
|         | China | 65   | The role of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in response to immunosuppressive therapy of patients with severe aplastic anemia   | 2015  | Zhao X, Zhang L, Jing L, Zhou K, Li Y, Peng G, et al                                 | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento                  | Discusión |
|         | Japón | 66   | Development of clinical Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria in children with aplastic anaemia  | 2017  | Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K et al                             | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Fisiopatología               | Discusión |
|         | China | 68   | Evolution patterns of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria clone and Clinical implications in acquired bone marrow failure.  | 2019  | Lian Y, Shi J, Nie N, Huang Z, Shao Y et al  | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Fisiopatología y tratamiento | Discusión |
|         | Rusia | 64   | Prognostic value of paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study   | 2014  | Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, Golubovskaya I, Kruchkova et al                     | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento                  | Discusión |
| Francia | 67    | Combined intensive immunosuppression and eculizumab for aplastic anemia in the context of hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a retrospective analysis                          | 2018  | Pagliuca S, Risitano A, De Fontbrune F, Robin M, Iori A et al   | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento                  | Discusión  |           |
| Japón   | 9     | Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia   | 2006  | Sugimori C, Chuho T, Feng X, Yamazaki H, Takami et al,          | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento                  | Antecedentes   |           |
| Japón   | 50    | Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia  | 2015  | Narita A, Muramatsu H, Sekiya Y, Okuno Y, Sakaguchi H et al     | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Tratamiento                  | Marco teorico  |           |
| Japón   | 52    | Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells, and aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia | 2008  | Yoshida N, Yagasaki H., Takahashi Y, Yamamoto T, Liang, J et al | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna y Anemia aplásica: Fisiopatología y Tratamiento | Marco teorico  |           |
| India   | 54    | Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations  | 2009  | Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, Ghosh K                         | Hemoglobinuria Paroxisítica Nocturna: Diagnóstico                                    | Marco teorico  |           |

**Fuente:** Propia

## Anexo 2.

**Tabla 3. clasificación de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.** Teniendo en cuenta hemólisis, fallo de médula ósea, evidencia diagnóstica por citometría de flujo y eficacia en el tratamiento por Eculizumab

| Clasificación de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) |  |   |  |                                 |
|---|--|---|--|---------------------------------|
| Categoría   | Tasa de hemólisis intravascular  | Médula ósea   | Citometría de flujo  | Beneficio del eculizumab        |
| Clásica   | Florida (hemoglobinuria macroscópica es frecuente o persistente)       | Hiperplasia eritroide y morfología normal o casi normal         | >50% de las células PMN¶ son deficientes en PIG-A*   | Sí                              |
| HPN en el contexto de síndromes de falla medular§             | Escasa a moderada (hemoglobinuria macroscópica intermitente o ausente) | Evidencia de la existencia de otros síndromes de falla medular§ | El % de PMN¶ deficientes en PIG-A* es <30%   | Depende del tamaño del clón HPN |
| Subclínica  | No hay evidencia clínica o bioquímica de hemólisis intravascular       | Existe evidencia de un síndrome de falla medular concomitante   | Existe evidencia de una pequeña población (<1%) de PMN¶ deficientes en PIG-A* detectada por citometría de flujo de alta resolución | No                              |

§: síndromes mielodisplásicos; aplasia de la médula ósea.

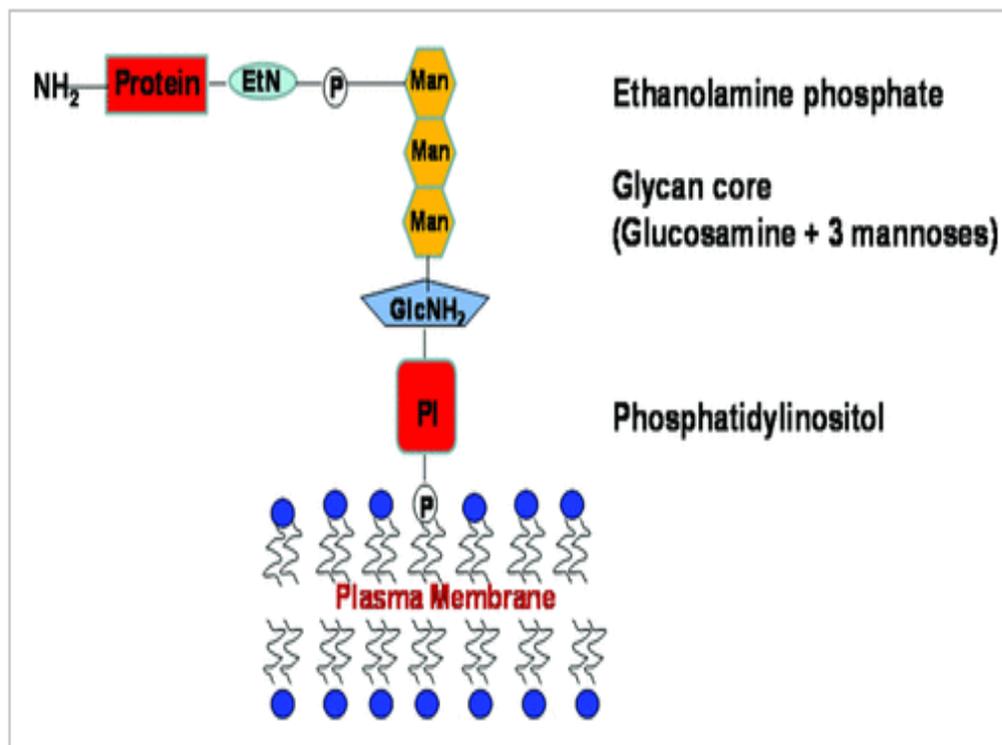
¶: polimorfonucleares.

\*: proteínas asociadas a fosfatidilinositolglicano (phosphatidylinositol glycan, PIG, por sus siglas en inglés).

**Fuente:** Gaona C. Hematología la sangre y sus enfermedades. [Internet] [Citado 2019 octubre 25]; 2 (14): 61-66. Disponible en: [https://www.academia.edu/34233091/Hematologia\\_La\\_sangre\\_y\\_sus\\_enfermedades\\_pdf](https://www.academia.edu/34233091/Hematologia_La_sangre_y_sus_enfermedades_pdf)

**Anexo 3.**

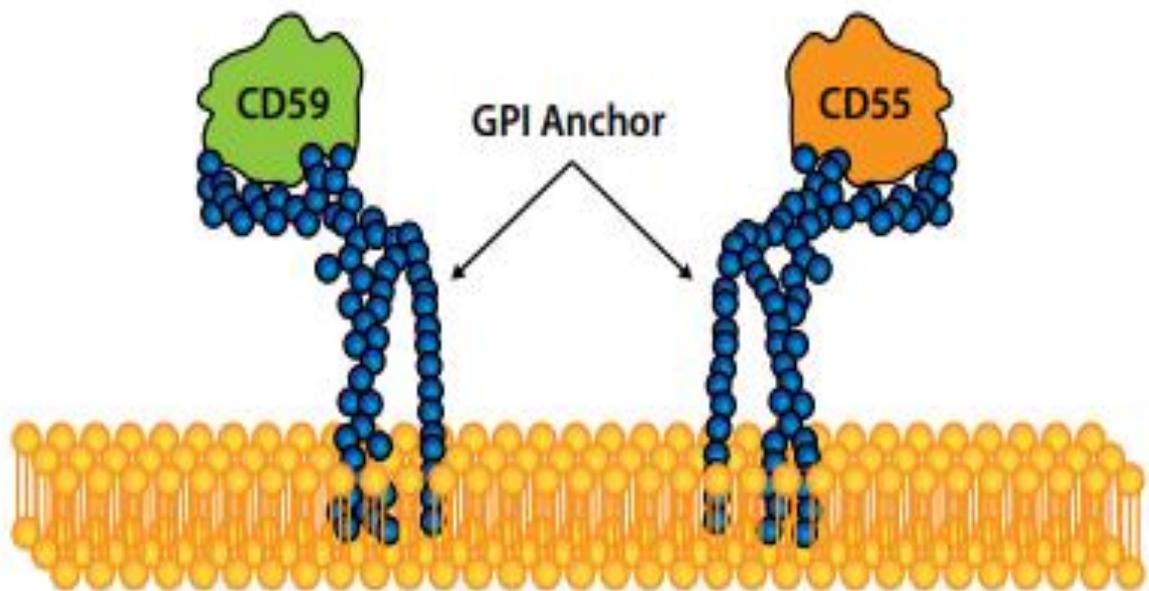
**Figura 1. Estructura de la proteína de anclaje GPI.** En donde el fosfatidilinositol se encuentra inmerso en la capa lipídica de la membrana citoplasmática de la célula, acompañado de núcleo de glucano con glucosamina, tres manosas y un fosfato de etanolamina.



**Fuente:** Pu J., & Brodsky R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from bench to bedside: Clinical and translational science.[Internet] 2011 [Cited 2019 Oct 30] ;4(3), 219–224. Available from: doi:10.1111/j.1752-8062.2011. 00262.x

**Anexo 4.**

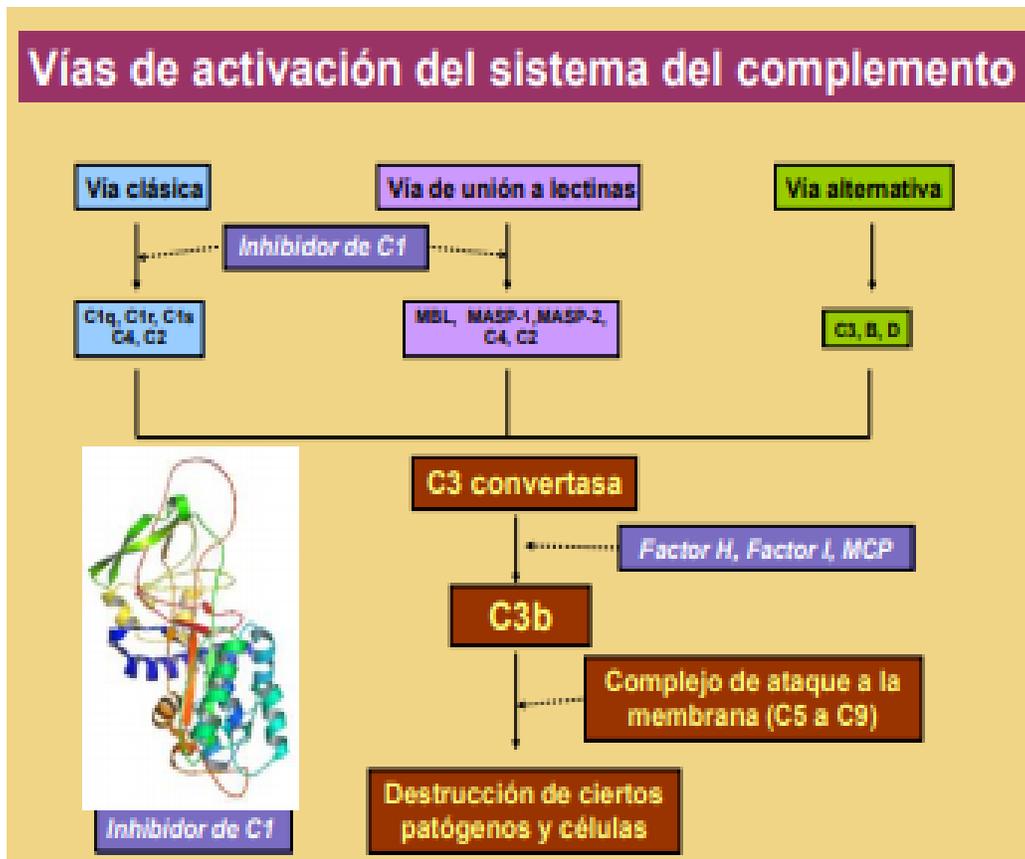
**Figura 2** Proteínas reguladoras de complemento CD55 y CD59 ancladas a GPI



**Fuente:** Sharma, V. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pathogenesis, Testing, and Diagnosis. Hematology and Oncology. [Internet] (2013) [Cited 25 Oct. 2019]; 11(9).

**Anexo 5.**

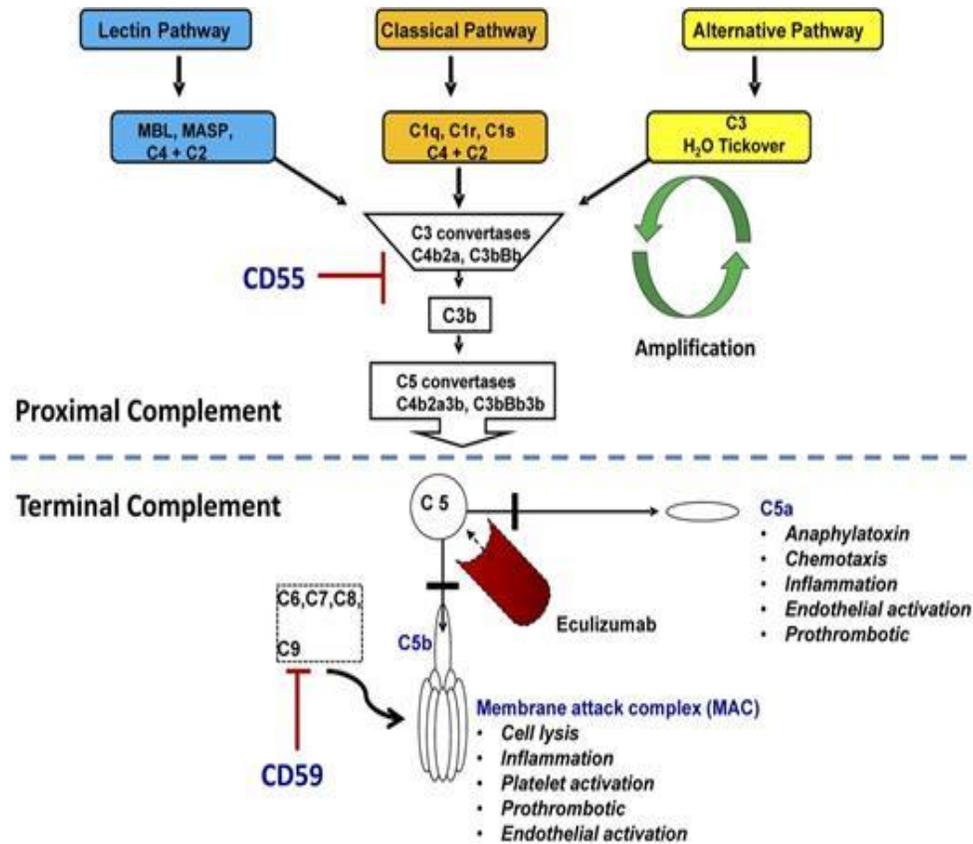
**Figura 3. Esquema de activación de las tres vías de complemento** Vías de activación clásica, unión a lectinas y vía alternativa para realizar lisis celular



**Fuente:** Lopez M. El sistema del Complemento: un mecanismo innato de defensa. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular [Internet]. 2010 [citado 28 Octubre 2019]. Disponible en: <https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/288-el-sistema-del-complemento-un-mecanismo-innato-de-defensa>

#### Anexo 6.

#### Figura 4. Regulación del sistema complemento por CD55 y CD59



**Fuente:** Brodsky R: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. [Internet] 2014 [Cited 2019 Oct 23] ; 124 (18): 2804–2811. Available from: doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-522128>

## Anexo 7.

**Tabla 3. Anticuerpos monoclonales y fluorocromos** utilizados por la técnica de citometría de flujo para el diagnóstico de clones compatibles con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

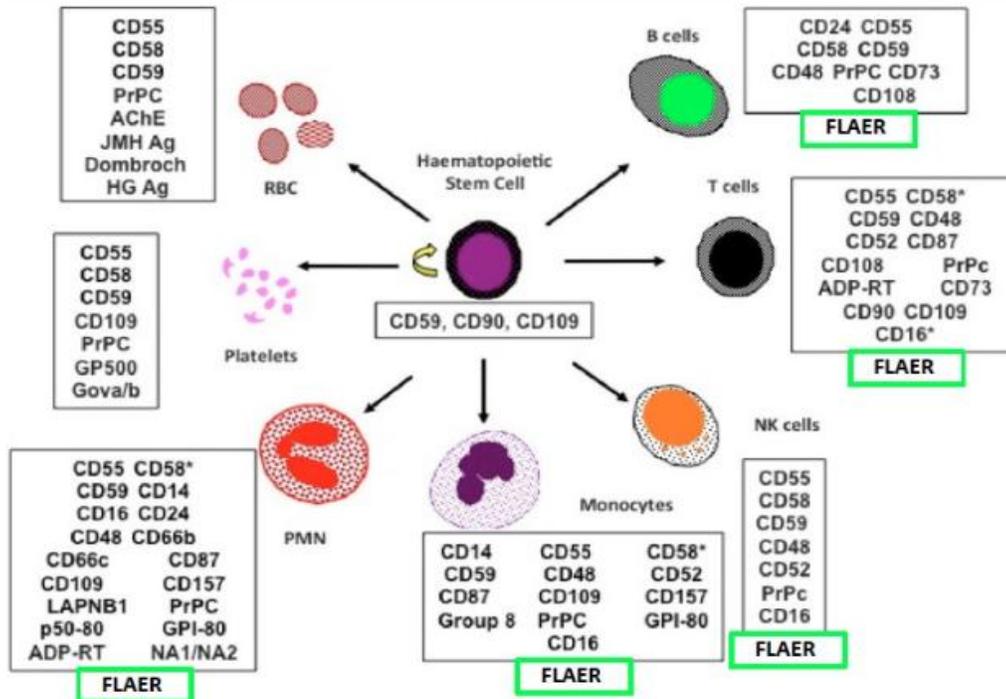
| <b><u>Anticuerpos monoclonales</u></b> | <b><u>Fluorocromos</u></b> |
|--|----------------------------|
| Anti- CD14                             | PC5***                     |
| Anti- CD15                             | FITC*                      |
| Anti- CD16                             | R-PE*                      |
| Anti- CD24                             | APC**                      |
| Anti- CD45                             | PerCP*/APC**               |
| Anti- CD55                             | R-PE*                      |
| Anti- CD59                             | FITC*                      |
| Anti- CD64                             | R-PE*                      |
| Anti- CD235a                           | R-PE*                      |

(FITC: isotiocianato de fluoresceína, R-PE: R-ficoeritrina, APC: alofocianina, PC5: R-ficoeritrina Cy5. \*: DAKO. \*\*: Miltenyi Biotec \*\*\*: abcam)

**Fuente:** Díaz Domínguez G, Marsán suárez V, Sánchez Ballester A. Diagnóstico por citometría de flujo de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2019 [citado 2019 Dic 5];35(1): [aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/930>

## **Anexo 8.**

**Figura 5. Principales moléculas ligadas a GPI según la línea celular a analizar y fluorocromo utilizado**

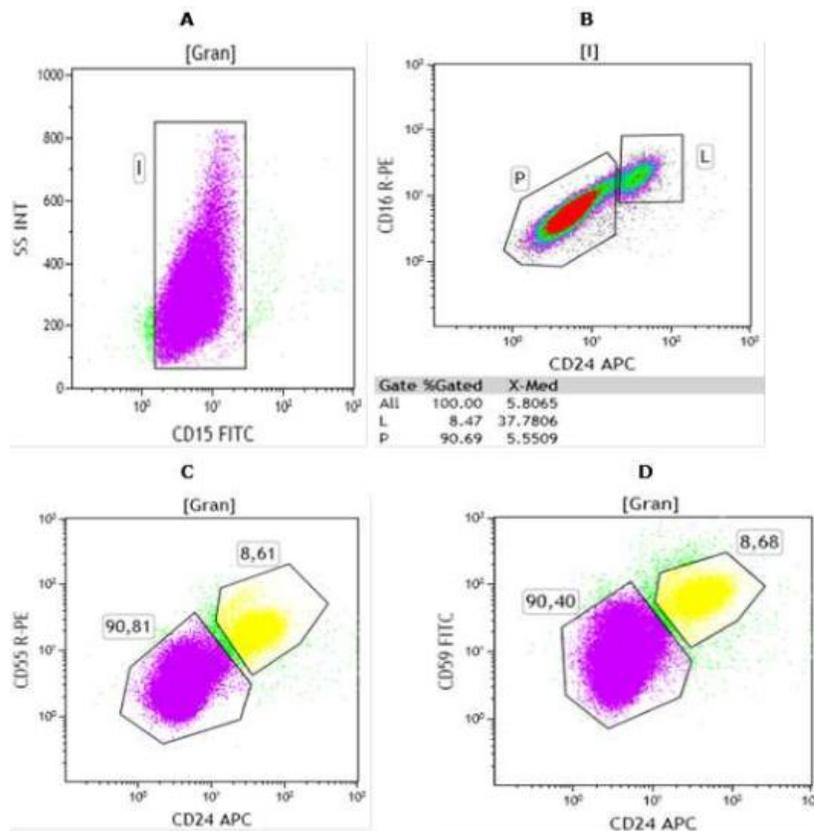


**Fuente:** Brando, B., Gatti, A., & Preijers, F. Flow Cytometric Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pearls and Pitfalls - A Critical Review Article. EJIFCC, [Internet] 2019 [Cited 2020 May 3]; 30(4), 355–370. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893893/>

## Anexo 9.

**Figura 6. Análisis de muestra por citometría de flujo en paciente con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.** (A) Identificación de población granulocítica, usando anticuerpo monoclonal CD15. (B) (C)(D) Determinación de proteínas dependientes de GPI como

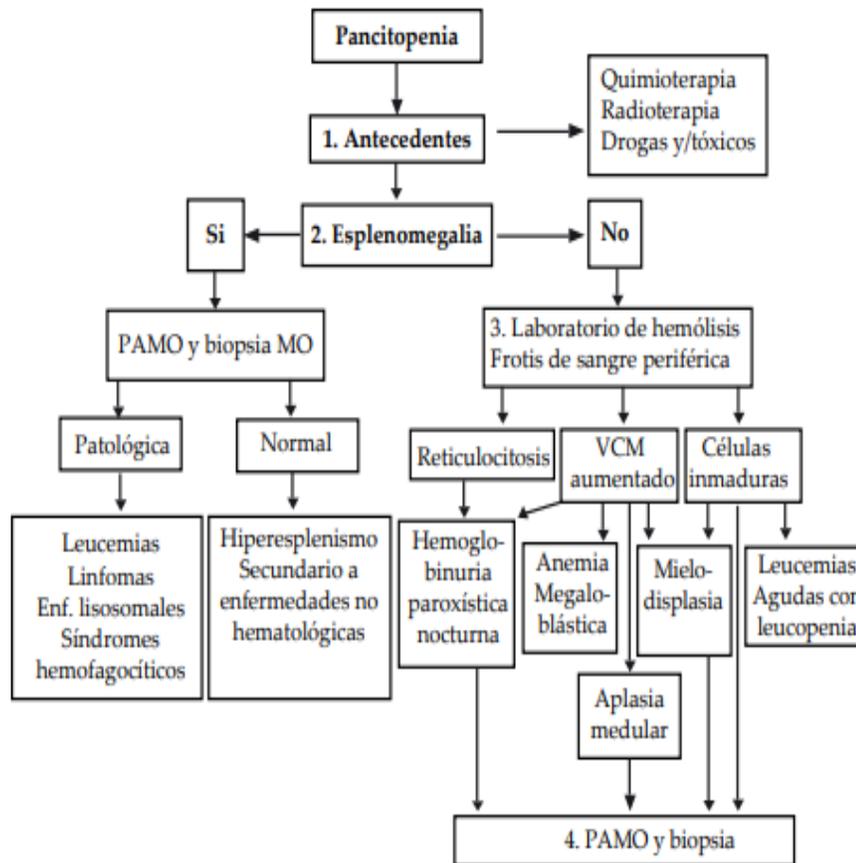
CD16, CD 55, CD24, CD59 en la población positiva para granulocitos marcada con CD15 +.



**Fuente:** Díaz Domínguez G, Marsán suárez V, Sánchez Ballester A. Diagnóstico por citometría de flujo de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Rev cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2019 [citado 2019 Dic 5];35(1): [aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/930>

## Anexo 10.

**Figura 7. Algoritmo para la identificación de causas de aplasia en un paciente**  
 Identificación de causas de anemia aplásica a partir de múltiples estudios y sus resultados según la etiología de la patología.



**Fuente** Sociedad Argentina de Hematología. Síndromes de fallo medular. PDF[Internet].2019 [Citado 2020 Ene 28]. Disponible en: [http://www.sah.org.ar/docs/2019/Sindromes\\_de\\_Fallo\\_Medular.pdf](http://www.sah.org.ar/docs/2019/Sindromes_de_Fallo_Medular.pdf)

