



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de los clones HPN en pacientes con anemia aplásica

Mario Andrés Arenas Mantilla

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia

2014

Caracterización de los clones HPN en pacientes con anemia aplásica

Mario Andrés Arenas Mantilla

Código 05599495

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Especialista en Hematología

Director:

Doctor Marco Antonio Grajales Buitrago

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna

Bogotá, Colombia

2014

Resumen

Objetivo: Describir las características demográfica y clínicas los pacientes con anemia aplásica estudiados para HPN y las características de los clones HPN en estos pacientes.

Metodología: Estudio descriptivo, retrospectivo. Se seleccionaron de la base de datos del laboratorio DECF pacientes remitidos para estudio de HPN por anemia aplásica. Se revisaron las historias clínicas para confirmar el diagnóstico de anemia aplásica, clasificar la severidad y registrar los tratamientos. Se revisaron los reportes de citometría de flujo para HPN y se relacionaron los resultados con los datos clínicos.

Resultados: Se incluyeron 38 pacientes con anemia aplásica (20 no severa, 10 severa, 8 muy severa), Se encontraron clones HPN en 60,5% (50% de no severa, 70% de severa, 75% de muy severa). En los HPN positivos, 73,9% presentaban HPN subclínica y 26,1% HPN asociada a anemia aplásica. La mediana del tamaño de los clones HPN fue de 0% (0–19,1%) en eritrocitos, 4,1% (0,1–98,3%) en monocitos y 3,9% (0,1–99%) en granulocitos. El tamaño del clon de granulocitos HPN fue similar entre pacientes con anemia aplásica no severa y severa/muy severa (4,1% (0,6–99%) vs 3,9% (0,1– 81,8%)). Pacientes con HPN asociada a anemia aplásica presentaron clones HPN mayores que en HPN subclínica (51,5% (4,2–99%) vs 2,5% (0,1–42,5%)). La respuesta a la inmunosupresión fue mayor en HPN negativos que en HPN positivos (100% vs 70,6%).

Conclusiones: Los clones HPN son frecuentes en pacientes con anemia aplásica y su frecuencia aumenta con la severidad de la aplasia. El tamaño de los clones HPN se relaciona con las manifestaciones clínicas de la HPN, pero no con la severidad de la aplasia. La relación entre clones HPN y respuesta a inmunosupresión continúa mostrando resultados conflictivos.

Palabras clave: Anemia aplásica, síndrome de falla medular, hemoglobinuria paroxística nocturna, citometría de flujo, terapia inmunosupresora.

Abstract

Objective: To describe the demographic and clinical characteristics of patients with aplastic anemia who had PNH study and the characteristics of PNH clones in these patients.

Methods: Descriptive, retrospective study. Patients with aplastic anemia and a PNH study request were selected from the DECF laboratory database. Clinical records were reviewed to confirm the aplastic anemia diagnosis and to determine the severity and the treatment of the disease. Results of flow cytometry studies were reviewed and the association with clinical data was assessed.

Results: Thirty-eight patients with aplastic anemia were included (20 non-severe, 10 severe, 8 very severe). PNH clones were found in 60,5% (50% of non-severe, 70% of severe, 75% of very severe). Of PNH-positive patients, 73,9% had subclinical PNH and 26,1% had PNH in the setting of aplastic anemia. Median clone size was 0% (0-19,1%) in erythrocytes, 4,1% (0,1-98,3%) in monocytes and 3,9% (0,1-99%) granulocytes. PNH-granulocytes clone size was similar among patients with non-severe and severe/very severe aplastic anemia (4,1% (0,6–99%) vs 3,9% (0,1– 81,8%)). Patients with PNH in the setting of aplastic anemia had larger PNH clones than those with subclinical PNH (51,5% (4,2–99%) vs 2,5% (0,1–42,5%)). Response to immunosuppressive therapy was better in PNH-negative patients than in PNH-positive (100% vs 70,6%).

Conclusions: PNH clones are often found among patients with aplastic anemia and their frequency increases with the severity of the aplasia. The size of PNH clones is associated with the clinical signs of PNH, but not with the severity of the aplasia. The association between PNH clone and response to immunosuppressive therapy still shows discordant results.

Keywords: Aplastic anemia, bone marrow failure, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, flow cytometry, immunosuppressive therapy.

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Lista de abreviaturas	XI
Introducción	1
1. Objetivos	3
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. Marco teórico	5
2.1 Anemia aplásica	5
2.2 Hemoglobinuria paroxística nocturna	7
2.3 Asociación entre hemoglobinuria paroxística nocturna y anemia aplásica	9
3. Metodología	11
3.1 Diseño del estudio	11
3.2 Definición de sujetos de estudio	11
3.2.1 Criterios de inclusión	11
3.2.2 Criterios de exclusión	12
3.2 Descripción de las intervenciones	12
3.4 Procedimientos	12
3.5 Definición de variables	13
3.6 Análisis estadístico	15
4. Consideraciones éticas	17
5. Presupuesto	19
5.1 Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación	19
5.2 Descripción de inversión en talento humano	19
5.3 Descripción de inversión en equipos y software	19
5.4 Descripción de inversión en impresos y publicaciones	20
6. Resultados	21
6.1 Selección de pacientes	21
6.2 Características demográficas	22
6.3 Frecuencia de HPN en pacientes con anemia aplásica	22
6.4 Clasificación clínica de la HPN	23

	Pág.
6.5 Tamaño de los clones HPN	24
6.6 Respuesta al tratamiento inmunosupresor	25
7. Discusión	27
8. Conclusiones	31
A. Anexo: Formato de recolección de datos de historia clínica	33
B. Anexo: Formato de recolección de datos de citometría de flujo	35
Bibliografía	37

Lista de figuras

	Pág.
Figura 6-1: Proceso de selección de pacientes	21
Figura 6-2: Granulocitos HPN según la severidad de la anemia aplásica y la categoría HPN	25
Figura 6-3: Revisión de tratamientos inmunosupresores	25

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Clasificación de la anemia aplásica de acuerdo con su severidad [2,9]	5
Tabla 2-2: Estrategias de identificación y antígenos utilizados [23]	8
Tabla 3-1: Criterios de respuesta a terapia inmunosupresora en anemia aplásica severa / muy severa [35]	12
Tabla 3-2: Criterios de respuesta a terapia inmunosupresora en anemia aplásica no severa [35]	13
Tabla 6-1: Características demográficas y severidad de la anemia aplásica	22
Tabla 6-2: Detección de clones HPN según la severidad de la anemia aplásica	23
Tabla 6-3: Clasificación de la HPN según la presentación clínica	23
Tabla 6-4: Relación entre severidad de la anemia aplásica y la categoría de HPN	23
Tabla 6-5: Tamaño de los clones HPN según el linaje	24
Tabla 6-6: Tamaño de los clones de granulocitos HPN según la severidad de la anemia aplásica y la categoría HPN	24
Tabla 6-7: Respuesta a tratamiento inmunosupresor	26

Lista de abreviaturas

Abreviatura Término

<i>ATG</i>	Inmunoglobulina antitimocítica (del inglés <i>antithymocyte globulin</i>)
<i>DAF</i>	Factor acelerador de decadencia (del inglés <i>decay accelerating factor</i>)
<i>DECF</i>	Diagnóstico Especializado por Citometría de Flujo
<i>GPI</i>	Glicosil-fosfatidil-inositol (del inglés <i>glycosyl-phosphatidyl-inositol</i>)
<i>HPN</i>	Hemoglobinuria paroxística nocturna
<i>ICCS</i>	International Clinical Cytometry Society
<i>MIRL</i>	Inhibidor de membrana de la lisis reactiva (del inglés <i>membrane inhibitor of reactive lysis</i>)
<i>UN</i>	Universidad Nacional de Colombia

Introducción

La anemia aplásica es una patología que se caracteriza por la reducción de las células progenitoras hematopoyéticas y se manifiesta con la disminución de los recuentos de células hemáticas en sangre periférica y las complicaciones derivadas de estas citopenias [1]. De los múltiples mecanismos patogénicos propuestos, la etiología inmune es la que tiene el mayor sustento clínico y experimental. Esto permitió el surgimiento de la globulina antitimocítica como tratamiento estándar, aunque el trasplante alogénico de médula ósea sigue siendo el manejo con mayor tasa de curación [2]. Las alteraciones en la médula ósea de los pacientes con anemia aplásica favorecen el desarrollo de trastornos clonales, especialmente en quienes ha sido tratados con inmunosupresión [3].

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una condición que surge a partir de la mutación somática adquirida en el gen PIGA en células madre hematopoyéticas, que se manifiesta con la deficiencia de proteínas ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en las membranas de las células hemáticas [4]. Estas células (también denominadas clones HPN) presentan una expansión clonal, que no está claramente explicada por el defecto genético que albergan [5]. La principal repercusión clínica de la hemoglobinuria paroxística nocturna es la hemólisis mediada por la activación del complemento sobre la superficie de los glóbulos rojos, secundaria a la ausencia de las proteínas reguladoras CD55 y CD59. La hemólisis se puede asociar a complicaciones trombóticas, que representan la mayor morbi-mortalidad en estos pacientes [5,6]. El tratamiento actual de la patología se basa en anticuerpos monoclonales que bloquean la cascada del complemento [7].

Los clones HPN con frecuencia surgen en pacientes con síndromes de falla medular, como la anemia aplásica. No obstante, la relación causal entre estas dos entidades aún es motivo de controversia [6]. Así mismo, la repercusión de los clones HPN sobre el curso clínico de la anemia aplásica y sobre la respuesta al tratamiento no ha sido completamente esclarecida [2]. En Colombia no se tienen registros completos de la incidencia de anemia aplásica ni de las características de los pacientes que la padecen. Tampoco existe en el país información sobre la frecuencia y las características de los clones HPN en estos pacientes ni respecto a la influencia de estos clones sobre las manifestaciones clínicas y la respuesta a los esquemas inmunosupresores. Por estas

razones se justifica la realización de un estudio descriptivo retrospectivo que permita documentar en nuestro medio las características de los pacientes con anemia aplásica y el comportamiento de los clones HPN en estos pacientes. Los datos que obtengan de este estudio facilitaran la planeación y el diseño de estudios prospectivos enfocados en estas patologías.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Describir las características demográfica y clínicas los pacientes con anemia aplásica estudiados para HPN y las características de los clones HPN en estos pacientes.

1.2 Objetivos específicos

- Describir las características demográficas de los pacientes con anemia aplásica incluidos en el estudio.
- Determinar la frecuencia de clones HPN en el total de pacientes con anemia aplásica y acuerdo a la severidad de la anemia aplásica.
- Clasificar los pacientes con anemia aplásica de acuerdo a la presentación clínica de la HPN (asociada a anemia aplásica o subclínica).
- Describir la distribución de los pacientes de acuerdo a la severidad de la anemia aplásica y a la categoría de la HPN.
- Describir el tamaño de los clones HPN en eritrocitos, granulocitos y monocitos.
- Determinar el tamaño del clon de granulocitos HPN de acuerdo a la severidad de la anemia aplásica.
- Determinar el tamaño del clon de granulocitos HPN de acuerdo a la clasificación de la HPN.
- Describir la respuesta a los tratamientos para la anemia aplásica severa con esquemas inmunosupresores (globulina antitimocítica, ciclosporina) y su relación con la presencia y el tamaño de los clones HPN.

2. Marco teórico

2.1 Anemia aplásica

La anemia aplásica es un síndrome clínico que se genera por la reducción en la hematopoyesis en la médula ósea y se caracteriza por disminución en los recuentos celulares de los tres linajes. Esta entidad fue descrita por primera vez por el Dr. Paul Ehrlich en 1888 [1]. Su incidencia es de aproximadamente dos casos por cada millón de personas/año, la mayoría de los cuales se diagnostican entre los 15 y los 25 años, con un segundo pico de frecuencia entre los 65 y los 69 años. No hay diferencias significativas en la frecuencia de presentación entre mujeres y hombres [8]. El diagnóstico requiere la disminución de al menos dos de las tres líneas celulares, sin presencia de células anormales o malignas y sin fibrosis. La severidad de la enfermedad se establece en base a los recuentos celulares en sangre periférica y la celularidad de la médula ósea en la biopsia [2]. En 1975, Camitta y colaboradores establecieron los criterios anemia aplásica severa [9]. Posteriormente, Bacigalupo y colaboradores introdujeron la categoría de anemia aplásica muy severa, que discrimina dentro del grupo de anemia aplásica severa, aquellos con neutropenia más profunda [2]. Los criterios de severidad de la anemia aplásica se presentan en la tabla 2-1.

Tabla 2-1: Clasificación de la anemia aplásica de acuerdo con su severidad [2,9]

Categoría	Celularidad en biopsia	Recuentos en sangre periférica ¹		
		Neutrófilos	Plaquetas	Reticulocitos
No severa	Hipocelular	<1.500/ μ l	<50.000/ μ l	<40.000/ μ l
Severa	<25%	<500/ μ l	<20.000/ μ l	<20.000/ μ l
Muy severa	<25%	<200/ μ l	<20.000/ μ l	<20.000/ μ l

¹ Disminución en al menos dos de las tres líneas

La causa de la reducción de los progenitores hematopoyéticos multipotenciales ha sido motivo de controversia por años. Varios potenciales mecanismos han sido propuestos: toxicidad directa sobre las células madre hematopoyéticas, defectos en el microambiente estromal, alteraciones en la producción de factores de crecimiento multilínea, supresión

inmune (celular o humoral) de las células hematopoyéticas multipotenciales, acortamiento progresivo de los telómeros [1]. Los granulocitos y las células mononucleares de los pacientes con anemia aplásica presentan telómeros más cortos que las respectivas poblaciones celulares en controles normales [10]. Sin embargo, el papel de las mutaciones de la telomerasa, presentes hasta en un 40% de los pacientes, aún no es claro [11].

La evidencia experimental no ha logrado demostrar una asociación clara con defectos funcionales de las células estromales ni con deficiencias de factores de crecimiento (los cuales, por el contrario, suelen estar aumentados en el suero de los pacientes con anemia aplásica). Adicionalmente, la falta de respuesta al tratamiento con factores de crecimiento administrados exógenamente, sugiere que la generación insuficiente de citoquinas no hace parte de la etiología de esta patología [1,12].

La instauración del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas como tratamiento curativo en 1972 [1] ofreció mayor evidencia en contra rol patogénico de las alteraciones del estroma, puesto que las células estromales en estos pacientes son de origen autólogo [13]. La sospecha del origen autoinmune de la anemia aplásica también surgió a partir de la implementación de este tratamiento, al observar que algunos pacientes se recuperaban después del acondicionamiento, así no fuera trasplantados [14]. Posteriormente, la asociación con autoinmunidad fue confirmada en un ensayo clínico, en el cual la mayoría de los pacientes lograron mejoría de la enfermedad con el tratamiento con globulina antitimocítica (ATG) [15].

Observaciones clínicas y experimentos in vitro demostraron que el ataque a las células hematopoyéticas multipotenciales está mediado por células T citotóxicas [16]. Ocasionalmente, existe el antecedente de exposición a medicamentos, virus o toxinas, que afectan directamente a las células madre hematopoyéticas. Se ha propuesto que estos agentes inducen la expresión de neoantígenos en los progenitores hematopoyéticos, provocando el ataque secundario mediado por células T citotóxicas [1]. La apoptosis de las células progenitoras mononucleares CD34+ es mediada, al menos parcialmente, por la vía dependiente de FAS/FASL [17]. Además, la disminución de las células T reguladoras contribuye a la expansión de la población T CD8+CD28- autorreactivas, que promueven la apoptosis de las células madre hematopoyéticas [18].

El ambiente de la médula ósea aplásica puede favorecer la evolución de clones mutantes. Con el aumento de la supervivencia de los pacientes con anemia aplásica, se ha observado también una tendencia al desarrollo de trastornos clonales, especialmente en aquellos tratados con inmunosupresión [3]. Dentro de estos desórdenes clonales se

incluyen los síndromes mielodisplásicos, la hemoglobinuria paroxística nocturna y las leucemias agudas.

2.2 Hemoglobinuria paroxística nocturna

La HPN es un trastorno hematológico caracterizado por la expansión clonal, no-maligna, de células madre hematopoyéticas con una mutación somática adquirida en el gen PIGA (localizado en el cromosoma X) requerido para la síntesis de la región de anclaje del GPI, lo cual conlleva a la proliferación de células hemáticas con deficiencia parcial o total de proteínas ancladas a GPI [4]. La mutación en el gen PIGA no confiere una ventaja proliferativa y por tanto, no explica la selección ni la expansión clonal [5].

En humanos se han descrito aproximadamente 30 proteínas ancladas a GPI, 23 de ellas presentes en células hematopoyéticas [5]. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran CD55 (factor acelerador de decadencia, DAF) y CD59 (inhibidor de membrana de la lisis reactiva, MIRL). El CD55 se encarga de inhibir la formación y estabilización de las convertasas del C3 y del C5 del complemento, mediante la interrupción de la interacción entre el factor B activado y el C3 activado (C3b). El CD59 bloquea el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (compuesto por C5 activado (C5b), C6, C7, C8 y múltiples moléculas de C9) al impedir la unión de C9 al complejo. Como consecuencia de lo anterior, los eritrocitos deficientes en proteínas ancladas a GPI (eritrocitos HPN) son susceptibles a la activación del sistema del complemento sobre sus membranas, lo cual conlleva a la hemólisis intravascular [5,6].

En su forma clásica, la HPN se caracteriza por hemólisis intravascular y hemoglobinuria (predominantemente nocturna), que es evidenciada en la primera orina de la mañana. Sin embargo, esta presentación clínica solo se ve en aproximadamente 25% de los casos [5]. Aunque infrecuente como manifestación inicial, el tromboembolismo venoso es la principal causa de morbimortalidad en los pacientes con HPN, afectando típicamente sitios inusuales, como las venas suprahepáticas, portales, dérmicas y cerebrales [6]. Por esta razón, están recomendados los estudios para el diagnóstico de HPN en pacientes con estas manifestaciones [19].

La prueba de hemólisis en suero acidificado (test de Ham), descrita por Ham y Dingle en 1937, y posteriormente la prueba de lisis en sucrosa, descrita por Hartmann y Jenkins en 1966, fueron las técnicas diagnóstica estándar por varias décadas. Sin embargo, éstas presentaban múltiples limitaciones técnicas que las hacían poco reproducibles [20]. A finales de los años 80 se introdujo la citometría de flujo como método diagnóstico para la

HPN, desplazando los test de Ham y de sucrosa [5]. Actualmente, la citometría de flujo es el método de referencia para el diagnóstico y seguimiento de la HPN [21]. Es un método rápido, sensible y reproducible; que permite identificar, cuantificar y subtipificar las poblaciones con deficiencias de antígenos dependientes de GPI. El análisis se puede realizar estudiando la expresión de antígenos dependientes de GPI en eritrocitos, granulocitos y monocitos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos contra estos antígenos, o estudiando directamente la presencia del GPI [22]. La selección de anticuerpos, el procesamiento de la muestra, las estrategias de análisis y la completa interpretación de los resultados son consideraciones básicas para el análisis de la expresión de los antígenos dependientes de GPI en las diferentes poblaciones celulares [23].

En la tabla 2-2 se presentan algunos de los anticuerpos monoclonales y de las estrategias de identificación recomendados en las guías para el estudio de HPN de la International Clinical Cytometry Society (ICCS) [23]. Como criterio diagnóstico es necesario demostrar el defecto en la expresión del GPI (o de proteínas ancladas a GPI) en al menos dos poblaciones diferentes. La determinación de la deficiencia solo en glóbulos rojos subestima el tamaño de la clona, más se debe realizar para establecer los fenotipos presentes y correlacionar con la severidad de las manifestaciones clínicas. La sensibilidad de los citómetros para identificar clones HPN depende de la cantidad de eventos de una población celular específica que pueden recolectar. Los equipos empleados para el análisis de rutina recolectan al menos 5.000 eventos y pueden identificar clones HPN del $\geq 1\%$, mientras que aquellos utilizados en análisis de alta sensibilidad recolectan al menos 250.000 y pueden detectar clones HPN $\geq 0.01\%$ [23].

Tabla 2-2. Estrategias de identificación y antígenos utilizados [23]

Población Celular	Antígenos GPI dependientes	Estrategias de identificación/ Antígenos de línea
Granulocitos	CD 16, CD 24	FSC/SSC CD 45, CD 15
Monocitos	CD 14	FSC/SSC CD 45, CD 64
Glóbulos Rojos	CD 59	Log FSC/SSC CD 235A

Actualmente, el tratamiento de la HPN depende de las manifestaciones clínicas. En pacientes con hemólisis severa y alto riesgo de trombosis, el tratamiento de elección es el eculizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el C5 del complemento, impidiendo su activación y por ende, la conformación del complejo de

ataque de membrana. Este medicamento reduce la anemia y la necesidad transfusional, mejorando la calidad de vida de los pacientes [7]. Algunos estudios sugieren que también disminuye la incidencia de eventos tromboembólicos [24]. Otras componentes del manejo incluyen el soporte transfusional según la severidad de la anemia y la anticoagulación profiláctica en pacientes con clones de HPN mayores al 50%. Tratamiento empleados anteriormente, como corticoides y andrógenos, son motivo de controversia y sus mecanismos de acción no han sido esclarecidos. La esplenectomía cuenta solo con reportes anecdóticos y no se recomienda por aumento del riesgo de trombosis [5].

2.3 Asociación entre hemoglobinuria paroxística nocturna y anemia aplásica

Los clones HPN surgen con frecuencia en asociación a síndromes de falla medular. Aproximadamente 18% a 20% de los pacientes con síndrome mielodisplásico tipo anemia refractaria presentan clones de células deficientes en proteínas ancladas a GPI [25,26]. En el caso de la anemia aplásica, un 22% a 60% de los pacientes presenta clones de HPN [27,28]. La gran variabilidad se explica en parte por la sensibilidad de los citómetros y los puntos de corte empleados. Aunque, como se mencionó anteriormente, la mutación del gen PIGA no confiere por si misma una ventaja proliferativa, en el contexto de la anemia aplásica podría favorecer la supervivencia si las proteínas ancladas a GPI representan epítopes reconocidos por los linfocitos T citotóxicos [29]. El comportamiento de estos clones es variable. En la mayoría de los casos permanecen estable en el tiempo, aunque en algunos pacientes pueden aumentar progresivamente de tamaño, mientras que en otros pueden desaparecer espontáneamente [30]. En 80% de éstos la población de células tipo HPN es menor al 1%. Más aún, solo 10 a 15% de los que reciben tratamiento con inmunosupresores desarrolla HPN clínicamente significativa.

La HPN se clasifica de acuerdo a las manifestaciones clínicas de la misma y la presencia de alteraciones en la médula ósea [19]. Se denomina HPN clásica a la presencia de clones HPN asociada a hemólisis intravascular, sin evidencia de anormalidades en la médula ósea. En los pacientes con trastornos específicos de la médula ósea y clones HPN, la clasificación depende de la presencia o ausencia de hemólisis. En los pacientes con evidencia clínica y paraclínica de hemólisis, se denomina HPN asociada a trastorno de la médula ósea. Por el contrario, en pacientes que no presentan hemólisis, la HPN se clasifica como subclínica. En el caso de los pacientes con anemia aplásica no aplica la categoría de HPN clásica. Si además de la aplasia existe evidencia de hemólisis, se denomina HPN asociada a anemia aplásica, de lo contrario se cataloga como HPN subclínica [19].

Algunos estudios sugieren que, en los pacientes con anemia aplásica, un aumento en la proporción de clones HPN se correlaciona con una adecuada respuesta al tratamiento con ATG y ciclosporina [31,32], mientras que otros no ha logrado demostrar esta asociación [27,30,33]. En nuestro medio, no existen estudios que describan el comportamiento de los clones HPN en pacientes con anemia aplásica.

3. Metodología

3.1 Diseño del estudio

Estudio descriptivo, retrospectivo.

3.2 Definición de sujetos de estudio

Pacientes con diagnóstico confirmado de anemia aplásica, quienes fueron atendidos en Bogotá y les solicitaron citometría de flujo para HPN en el laboratorio Diagnóstico Especializado por Citometría de Flujo (DECF; centro de referencia certificado), entre el primero de enero de 2010 y el 31 de marzo de 2013.

3.2.1 Criterios de inclusión

- Firma de consentimiento informado autorizando el uso de los resultados de citometría de flujo para fines académicos.
- Solicitud realizada en Bogotá para diagnóstico de HPN por citometria de flujo.
- Cumplir los criterios diagnósticos de anemia aplásica [1,34]:
 - Biopsia de médula ósea hipocelular, sin células anormales o malignas, ni fibrosis.
 - Al menos dos de los siguientes:
 - Hemoglobina menor a 10g/dl
 - Neutrófilos menores de 1,500/ μ l
 - Plaquetas menores a 50.000/ μ l
 - Recuento absoluto de reticulocitos menor a 40.000/ μ l

3.2.2 Criterios de exclusión

- Diagnóstico de neoplasia, excepto cáncer de piel no-melanoma.
- Citometría de flujo solicitada para seguimiento de HPN previamente diagnosticada.

3.3 Descripción de las intervenciones

El presente estudio no involucra intervenciones sobre los sujetos incluidos.

3.4 Procedimientos

Primero, revisión de la base de datos de DECF y selección de los pacientes con anemia aplásica como motivo de solicitud de la citometría de flujo para HPN. Segundo, revisión de las historias clínicas de los pacientes seleccionados para la verificación de los criterios diagnósticos de anemia aplásica y de los criterios de exclusión. Tercero, clasificación de la severidad de la anemia según los paraclínicos disponibles, de acuerdo los criterios de Camitta y Bacigalupo (Tabla 2-1, [2,9]). Cuarto, confirmación de la presentación de hemólisis y/o trombosis, según la historia clínica. Quinto, revisión de tratamientos con ATG y/o ciclosporina, y verificación de la respuesta a los mismos. La respuesta a los tratamientos se clasifica de acuerdo criterios de Camitta (Tablas 3-1 y 3-2) [35].

Tabla 3-1: Criterios de respuesta a terapia inmunosupresora en anemia aplásica severa / muy severa [35]

Ninguna	Continúa siendo severa
Parcial	Independencia transfusional No cumple criterios de enfermedad severa
Completa	Hemoglobina normal para la edad Recuento de neutrófilos > 1.500// μ l Recuento de plaquetas >150.000// μ l

Tabla 3-2: Criterios de respuesta a terapia inmunosupresora en anemia aplásica no severa [35]

Ninguna	Empeoramiento o no cumplir los siguientes criterios
Parcial	Independencia transfusional (si era dependiente) ó Duplicar o normalizar el recuento en al menos un linaje ó Incremento >3g/dl en hemoglobina basal (si inicial <6g/dl) ó Incremento >500/ μ l en recuento basal de neutrófilos (si inicial <500/ μ l) ó Incremento >20.000/ μ l en recuento basal de plaquetas (si inicial <20.000/ μ l)
Completa	Hemoglobina normal para la edad Recuento de neutrófilos >1.500/ μ l Recuento de plaquetas >150.000/ μ l

Sexto, revisión de los reportes de citometría de flujo para HPN de los pacientes incluidos. De acuerdo con las recomendaciones de la ICCS [23], por la sensibilidad del citómetro del laboratorio DECF, se consideran clones HPN positivos aquellos iguales o mayores a 0,1% en al menos dos poblaciones (eritrocitos, granulocitos, monocitos). Séptimo, análisis de datos: descripción de las características demográficas de los pacientes incluidos, descripción de los resultados de citometría de flujo en la totalidad de los pacientes incluidos y de acuerdo a la severidad de la anemia aplásica, clasificación de los pacientes con clones HPN según la presentación clínica (HPN asociada a aplasia medular o HPN subclínica, [19]) y descripción del tamaño de los clones en cada categoría.

3.5 Definición de variables

- Identificación: Cualitativa nominal. Número de documento de identidad que aparece registrado en la base de datos de DECF y en la historia clínica.
- Edad: Cuantitativa discreta. Dato que permite la cuantificación cronológica del tiempo de vida del individuo, en años cumplidos, al momento del estudio por citometría de flujo para HPN.

- Sexo: Cualitativa nominal dicotómica. Permite el reconocimiento del género al cual pertenece un individuo (masculino o femenino). (0) Femenino; (1) Masculino.
- Fecha de diagnóstico: Ordinal. Documentación cronológica del tiempo (día/mes/año) que corresponde a la emisión del reporte de Patología de la biopsia de médula ósea.
- Celularidad: Cuantitativa discreta. Porcentaje de celularidad registrado en el reporte de Patología de la biopsia de médula ósea. En casos informados como rango, se tomará el promedio de los valores extremos del rango. En casos informados como “hipocelular”, se tomará como variable cualitativa.
- Hemoglobina: Cualitativa ordinal. Nadir del nivel de hemoglobina, registrado en los hemogramas realizados a partir del mes en que se diagnosticó la anemia aplásica. (0) Mayor o igual a 10g/dl; (1) Menor de 10g/dl.
- Recuento de neutrófilos: Cualitativa ordinal. Nadir del recuento de neutrófilos, registrado en los hemogramas realizados a partir del mes en que se diagnosticó la anemia aplásica. (0) Mayor o igual a 1.500/ μ l; (1) 500/ μ l a 1499/ μ l; (2) 200/ μ l a 499/ μ l; (3) Menor a 200/ μ l.
- Recuento de plaquetas: Categórica ordinal. Nadir del recuento de plaquetas, registrado en los hemogramas realizados a partir del mes en que se diagnosticó la anemia aplásica. (0) Mayor o igual a 50.000/ μ l; (1) 20.000/ μ l a 49.999/ μ l; (2) Menor a 20.000/ μ l.
- Recuento absoluto de reticulocitos: Categórica ordinal. Nadir del recuento de reticulocitos, registrado en los hemogramas realizados a partir del mes en que se diagnosticó la anemia aplásica. (0) Mayor o igual a 40.000/ μ l; (1) 20.000/ μ l a 39.999/ μ l; (2) Menor a 20.000/ μ l.
- Severidad de anemia aplásica: Cualitativa ordinal. Clasificación de la anemia aplásica según los criterios de severidad preestablecidos (Tabla 3-1). (1) No severa; (2) Severa; (3) Muy severa.
- Hemólisis: Cualitativa nominal dicotómica. Presencia o ausencia de hemólisis de acuerdo a la información registrada en la historia clínica del individuo. Se considera marcador de hemólisis un nivel de lactato deshidrogenasa mayor o igual a 1,5 veces el límite superior normal, sin otras condiciones que lo expliquen. (0) No; (1) Si.
- Trombosis: Cualitativa nominal dicotómica. Presencia o ausencia de eventos tromboticos/tromboembólicos de acuerdo a la información registrada en la historia clínica del individuo. (0) No; (1) Si.
- Inmunosupresión: Cualitativa nominal dicotómica. Determina si un individuo recibió o no tratamiento inmunosupresor, de acuerdo a la información registrada en la historia clínica. (0) No; (1) Si.

-
- Tipo de inmunosupresión: Cualitativa nominal dicotómica. Determina si un individuo recibió tratamiento con esquemas de ATG (con o sin ciclosporina) o solo ciclosporina (sin ATG), de acuerdo a la información registrada en la historia clínica. (1) ATG; (2) Ciclosporina.
 - Respuesta a inmunosupresión: Cualitativa ordinal. Clasificación de la respuesta al tratamiento inmunosupresor, según los criterios preestablecidos (Tablas 4-1 y 4-2). (0) Ninguna; (1) Parcial; (2) Completa.
 - Número de muestra: Cualitativa nominal. Número consecutivo asignado en DECF a las muestras estudiadas mediante citometría de flujo para HPN.
 - Fecha de citometría de flujo: Ordinal. Documentación cronológica del tiempo (día/mes/año) que aparece en el formato de solicitud de citometría de flujo.
 - Porcentaje eritrocitos HPN: Cuantitativa continua. Porcentaje de eritrocitos con deficiencia parcial o completa de CD59 registrado en el reporte de DECF.
 - Porcentaje monocitos HPN: Cuantitativa continua. Porcentaje de monocitos con deficiencia de CD14 registrado en el reporte de DECF.
 - Porcentaje granulocitos HPN: Cuantitativa continua. Porcentaje de granulocitos con deficiencia de CD16 registrado en el reporte de DECF.
 - Resultado HPN: Cualitativa nominal dicotómica. Permite identificar si un individuo es positivo o negativo para la presencia de clones HPN, según los criterios preestablecidos. (0) Negativo; (1) Positivo.
 - Clasificación HPN: Cualitativa nominal dicotómica. Clasificación de los individuos HPN positivos, de acuerdo a los criterios preestablecidos. (1) Asociada a anemia aplásica; (2) Subclínica.

3.6 Análisis estadístico

Registro de los datos obtenidos en formatos de recolección diseñado para tal fin (Anexos A y B). Digitación por duplicado en bases creadas con el software Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corp., 2010, Redmond, WA). Comparación de las bases para detección y corrección de errores de digitación, mediante la revisión de los formatos de recolección. Descripción de las variables cualitativas como proporciones. Determinación de la distribución de las variables continuas mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Descripción de las variables de distribución normal empleando el promedio como medida de

tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión. Descripción de las variables de distribución no normal utilizando como medida de tendencia central la mediana y como medida de dispersión el rango. Análisis estadístico con el software Stata 10.1 (Stata Corp., 2009, College Station, TX).

4. Consideraciones éticas

De acuerdo a la resolución del Ministerio de Salud N° 008430 de 1993 para la investigación con seres humanos, artículo 11, el presente estudio se cataloga como investigación sin riesgo, por lo tanto no se requiere consentimiento informado escrito. Los datos recolectados se mantendrán confidenciales y solo estarán disponibles para el equipo de investigadores del estudio.

No existen conflictos de interés por parte del investigador principal (Mario Andrés Arenas Mantilla) ni del director (Marco Antonio Grajales Buitrago) del presente estudio.

5. Presupuesto

5.1 Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación

Conceptos presupuestales	Fuentes financiación		Total
	UN	Personal	
Talento Humano	4'000.000	18'000.000	22'000.000
Equipos y software	0	1'200.000	1'200.000
Impresos y publicaciones	0	200.000	200.000
Total	4'000.000	19'400.000	23'400.000

5.2 Descripción de inversión en talento humano

Cargo	Dedicación (horas/mes)	N° meses	Valor costo/hora	Fuentes financiación		Total
				UN	Personal	
Hematólogo Docente UN	8	10	50.000	4'000.000	0	4'000.000
Residente Hematología	45	10	40.000	0	18'000.000	18'000.000
Total				4'000.000	18'000.000	22'000.000

5.3 Descripción de inversión en equipos y software

Equipos	Justificación	Fuentes financiación		Total
		UN	Personal	
Computador portátil	Creación de base de datos Análisis estadístico Redacción de informe final	0	1'200.000	1'200.000
Total		0	1'200.000	1'200.000

5.4 Descripción de inversión en impresos y publicaciones

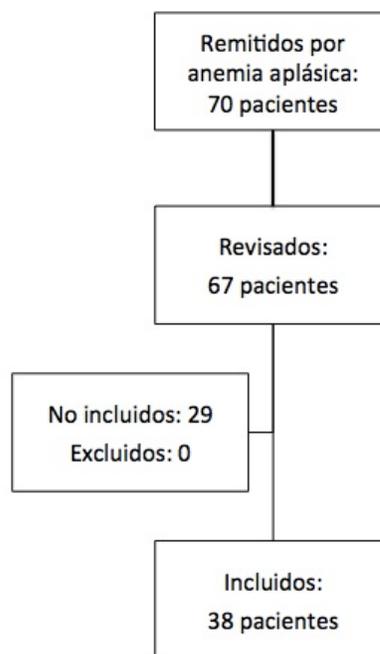
Impresos y publicaciones	Fuentes financiación		Total
	UN	Personal	
Tinta	0	100.000	100.000
Papel	0	100.000	100.000
Total	0	200.000	200.000

6. Resultados

6.1 Selección de pacientes

Al revisar la base de datos de DECF los datos de los pacientes que otorgaron consentimiento informado, se encontró que durante el periodo comprendido entre el primero de enero de 2010 y el 31 de marzo de 2013, en Bogotá fueron solicitados 482 estudios de citometrías de flujo para HPN. De los anteriores, 70 (14,5%) registraban anemia aplásica como motivo de solicitud. En la Figura 6-1 se resume el proceso de selección. Se tuvo acceso a la historia clínica (con información completa de hemogramas y de estudios de médula ósea) de 67 (95,7%) de estos pacientes, de los cuales 38 cumplían con los criterios de inclusión. De los 29 pacientes que no fueron incluidos, 18 tenían menos de dos citopenias, tres presentaba células anormales (displásicas) en la biopsia de médula ósea, uno presentaban mielofibrosis y siete tenían reporte de biopsia de médula ósea normal. Ninguno de los pacientes incluidos presentaba criterios de exclusión.

Figura 6-1: Proceso de selección de pacientes



6.2 Características demográficas

La mediana de edad de los pacientes incluidos fue de 38 años (rango: 17 – 69). Al agrupar los pacientes por quinquenios, se observó con un pico de frecuencia entre los 15 y los 25 años. En la distribución por géneros se presentó un predominio de las mujeres. Al clasificar a los pacientes incluidos de acuerdo a la severidad de la aplasia, se encontró que más de la mitad presentaban anemia aplásica no severa. La mediana de la edad de los pacientes con anemia aplásica severa/muy severa y fue mayor que en los pacientes con anemia aplásica no severa (43,5 años vs 36 años), aunque con superposición de los rangos. La distribución por géneros fue similar entre pacientes con anemia aplásica no severa y severa/muy severa. En la tabla 6-1 se resumen las características demográficas y la clasificación de la severidad de la anemia aplásica.

Tabla 6-1: Características demográficas y severidad de la anemia aplásica

	Pacientes (n = 38)
Edad ¹	38 años (17 – 69 años)
Género	
Femenino	23 (60,5%)
Masculino	15 (39,5%)
Severidad de la anemia aplásica	
No severa	20 (52,6%)
Severa	10 (26,3%)
Muy severa	8 (21,1%)

¹ Datos presentados como mediana (rango)

6.3 Frecuencia de HPN en pacientes con anemia aplásica

Se detectaron clones HPN en 60,5% de los pacientes incluidos. La frecuencia de HPN en mujeres y en hombres fue similar (60,9% vs 60%, respectivamente). Los pacientes HPN positivos tendieron a ser menores (mediana: 38 años; rango intercuartil: 25,5 - 55 años) que los paciente HPN negativos (mediana: 51,5 años; rango intercuartil: 33 – 64,8 años), aunque con superposición de los rangos totales (17 – 87 años vs 17 – 79 años, respectivamente). Como se observa en la tabla 6-2, se detectaron clones HPN con mayor frecuencia en pacientes con anemia aplásica severa y muy severa que en pacientes con anemia aplásica no severa.

Tabla 6-2: Detección de clones HPN según la severidad de la anemia aplásica

Severidad de la anemia aplásica	Clones HPN	
	Positivos	Negativos
No severa	10 (50%)	10 (50%)
Severa	7 (70%)	3 (30%)
Muy severa	6 (75%)	2 (25%)
Total	23 (60,5)	15 (39,5)

6.4 Clasificación clínica de la HPN

Al clasificar a los pacientes con clones HPN de acuerdo a la manifestaciones clínicas asociadas, solo una cuarta parte presentaban hemólisis, mientras que la mayoría correspondían a HPN subclínica (Tabla 6-3). Ninguno de los pacientes HPN positivos tenía historia de trombosis. Los pacientes con HPN asociada a anemia aplásica presentaban menor edad (mediana: 25,5 años; rango: 17 – 49 años) que aquellos con HPN subclínica (mediana: 38 años; rango: 18 – 69 años). El porcentaje de mujeres fue mayor en el grupo de HPN asociada a anemia aplásica que en el de HPN subclínica (83,3% vs 52,9%).

Tabla 6-3: Clasificación de la HPN según la presentación clínica

Categoría HPN	Pacientes
Asociada a anemia aplásica	6 (26,1%)
Subclínica	17 (73,9%)

Evaluando la distribución de los pacientes según la clasificación de la HPN y la severidad de la anemia aplásica, se observó que en todas las categorías de severidad predominaba la HPN subclínica (Tabla 6-4). Debido al reducido número de pacientes, a partir de este punto se toman en conjunto aquellos con anemia aplásica severa y muy severa.

Tabla 6-4: Relación entre severidad de la anemia aplásica y la categoría de HPN

Severidad de la anemia aplásica	Categoría HPN	
	Asociada a anemia aplásica	Subclínica
No severa	3 (30%)	7 (70%)
Severa / Muy severa	3 (23,1%)	10 (76,9%)

6.5 Tamaño de los clones HPN

Se tomó como medida del tamaño del clon el porcentaje de células HPN en cada linaje. Como se observa en la tabla 6-5, la mediana del tamaño de los clones HPN fue inferior al 5% en las tres líneas celulares. Adicionalmente, el 52.2% de los pacientes HPN positivos solo presentaba compromiso de dos líneas (monocítica y granulocítica), sin evidencia de eritrocitos HPN. El tamaño del clon de monocitos HPN fue similar al de granulocitos HPN, mientras que el tamaño del clon de eritrocitos HPN fue menor al de los dos anteriores. La mediana del tamaño de los clones HPN también fue similar entre mujeres y hombres en los tres linajes.

Tabla 6-5: Tamaño de los clones HPN según el linaje

	Clones HPN¹
	Total (n = 23)
Línaje celular	
Eritrocitos	0 %(0 – 19,1%)
Monocitos	4,1% (0,1 – 98,3%)
Granulocitos	3,9% (0,1 - 99%)

¹ Datos presentados como mediana (rango)

Tomando como referencia el clon de granulocitos HPN, se evaluó el tamaño de los clones HPN de acuerdo con la severidad de la anemia aplásica y según la categoría de la HPN (Tabla 6-6). El tamaño de los clones fue semejante entre los pacientes con anemia aplásica no severa y aquellos con severa/muy severa (Figura 6-2A). En contraste, los pacientes con HPN asociada a anemia aplásica mostraron clones de mayor tamaño que los pacientes con HPN subclínica (Figura 6-2B).

Tabla 6-6: Tamaño de los clones de granulocitos HPN según la severidad de la anemia aplásica y la categoría HPN

Clasificación	Granulocitos HPN¹
Severidad de la anemia aplásica	
No severa	4,1% (0,6 – 99%)
Severa / Muy severa	3,9% (0,1 – 81,8%)
Categoría HPN	
Asociada a anemia aplásica	51,4% (4,2 – 99%)
Subclínica	2,5% (0,1 – 42,5%)

¹ Datos presentados como mediana (rango)

Se obtuvieron datos completos sobre el empleo de tratamiento para la anemia aplásica con esquemas inmunosupresores en 30 (78,9%) de los pacientes incluidos. De estos pacientes, 16 (53,3%) fueron tratados con ATG seguida de ciclosporina, seis (20%) recibieron solo ciclosporina (con o sin prednisona) y ocho (26,7%) no recibieron tratamiento inmunosupresor. El proceso de revisión de los tratamientos se resume en la figura 6-3. El 77,3% de los pacientes tratados lograron algún grado de respuesta. Los pacientes que no obtuvieron respuesta tendieron a ser de mayor edad, pero con superposición de los rangos. Un mayor porcentaje de mujeres lograron respuesta parcial o completa en comparación con los hombres. También se observó un mayor porcentaje de respuestas parciales o completas en los paciente con anemia aplásica no severa que en grupo de severa/muy severa. En relación a la presencia de clones HPN, una menor proporción de pacientes HPN positivos logró algún grado de respuesta en comparación a los pacientes HPN negativos. El porcentaje de repuesta parcial/completa fue similar entre paciente con HPN asociada a anemia aplásica y HPN subclínica. Asimismo, el tamaño de los clones de granulocitos HPN fue semejante entre los pacientes con y sin respuesta al tratamiento. La evaluación por subgrupos se vio limitada por el escaso número de pacientes con información completa. La tabla 6-7 resume las respuesta a los esquemas inmunosupresore de acuerdo a las características de los pacientes.

Tabla 6-7: Respuesta a tratamiento inmunosupresor

	Total	Respuesta al tratamiento	
		Ninguna	Parcial / Completa
Pacientes tratados	22	5 (22,7%)	17 (77,3%)
Edad ¹	35 años (17 – 69 años)	49 años (18 – 56 años)	31 años (17 – 69 años)
Género			
Femenino	13	2 (15,4%)	11 (84,6%)
Masculino	9	3 (33,3%)	6 (66,7%)
Severidad de la anemia aplásica			
No severa	11	1 (9,1%)	10 (90,9%)
Severa / Muy severa	11	4 (36,4%)	7 (63,6%)
Clones HPN			
Positivos	17	5 (29,4%)	12 (70,6%)
Negativos	5	0	5 (100%)
Categoría HPN			
Asociada a anemia aplásica	4	1 (25%)	3 (75%)
Subclínica	13	4 (30,8%)	9 (69,2%)
Granulocitos HPN ¹	4,2% (0,1 – 99%)	6,5% (0,5 – 38,7%)	4,1% (0,1 – 99%)

¹ Datos presentados como mediana (rango)

7. Discusión

La anemia aplásica es una entidad infrecuente, los estudios epidemiológicos previos, realizados en diferentes poblaciones, reportan incidencias de 2 a 2,4 casos por millón de habitantes por año [8,34,36]. De acuerdo con lo anterior, la incidencia de anemia aplásica esperada en Bogotá (con aproximadamente siete millones y medio de habitantes [37]) durante lapso equivalente al periodo de estudio (27 meses) es de 33 a 41 casos. En el presente estudio, la mediana de edad de los pacientes incluidos (38 años) fue menor a la reportada en otras series (53 a 56 años) [8,31]. Aunque se encontró un pico de frecuencia entre los 15 y los 25 años, similar al descrito por otros autores [34,36], no se observó la distribución bimodal por edad referida en los estudios citados. Asimismo, la mayor proporción de mujeres con anemia aplásica en este estudio contrasta con los hallazgos de publicaciones anteriores, las cuales registraron porcentajes similares de mujer y hombres [8,34] o incluso predominio masculino [36,38,39]. Una pequeña serie del hospital John Hopkins mostró distribución por género semejante a la del presente estudio [40]. Los estudios que detallan la distribución de los pacientes de acuerdo a la severidad de la anemia aplásica muestran preponderancia de la categoría severa/muy severa (61,5 a 83,8%) [8,31,39], contrario a lo hallado en esta serie, donde el 52,6% de los pacientes correspondían al grupo de anemia aplásica no severa.

El estudio para HPN en pacientes con anemia aplásica está recomendado tanto en las guías de diagnóstico y manejo de anemia aplásica [2] como en las de HPN [19,23]. En Colombia, el 16,2% de las citometrías de flujo para estudio de HPN son solicitadas por anemia aplásica, siendo el cuarto motivo más frecuente de solicitud, después de trombosis, citopenias no especificadas y anemia hemolítica Coombs-negativa [41]. En Bogotá se mantiene esta proporción, con 14,5% de solicitudes por anemia aplásica. Sin embargo, como se observó en el presente estudio, más de la tercera parte de los pacientes remitidos por este motivo no cumplen con los criterios diagnósticos. Esta situación se explica en parte por las dificultades administrativas y operativas propias del sistema de salud colombiano, que obligan a los médicos a solicitar los estudios para HPN antes de contar con la confirmación del diagnóstico de anemia aplásica.

La falta de un punto de corte estandarizado para definir los clones HPN positivos es una de las principales limitantes en la comparación entre diferentes series. La implementación

de distintas definiciones de positividad se deriva las diferencias en el rendimiento de los citómetros utilizados por cada grupo para el estudio de HPN. En el presente estudio, con un umbral de 0,1%, el 59% de pacientes fueron HPN positivos. Este valor es similar al reportado por otros autores (57% a 59,2%), pese a que éstos emplearon citómetros de alta sensibilidad, con puntos de corte más bajos (0.003% a 0.01%) [30,39]. Estas publicaciones mostraron además mayor frecuencia de clones HPN en pacientes de mayor edad que en los más jóvenes. Los resultados del estudio actual mostraron una tendencia opuesta, siendo mayores los pacientes negativos para HPN. En este estudio, la distribución por género fue similar entre pacientes HPN positivos y negativos. Curiosamente, respecto a este aspecto no hay mayor información disponible en la literatura.

La frecuencia de HPN de acuerdo a la severidad de la anemia aplásica es otro aspecto del cual hay pocos datos publicados. Recientemente, Kulagin y colaboradores informaron proporciones similares de pacientes HPN positivos en las diferentes categorías de severidad (59,5% en anemia aplásica no severa, 59,6% en severa y 58,3% en muy severa) [39]. En una publicación anterior, se observó una tendencia a encontrar clones HPN con mayor frecuencia en los pacientes con anemia aplásica severa/muy severa que en aquellos con anemia aplásica no severa (70,7% vs 63,8%) [31]. En el presente estudio también se encontraron clones HPN con mayor frecuencia en los pacientes con anemia aplásica severa y muy severa (70% y 75%, respectivamente) que en pacientes con anemia aplásica no severa (50%). En cuanto a la clasificación de la HPN según las manifestaciones clínicas, los resultados de este estudio concuerdan con los reportes previos, con predominio de la HPN subclínica [6,39]. La relación entre HPN asociada a anemia aplásica y HPN subclínica fue similar en pacientes con anemia aplásica no severa (30% vs 70%, respectivamente) y severa/muy severa (23,1% vs 76,9%, respectivamente). No se encontró información sobre este tipo de distribución en la literatura.

De acuerdo con la literatura [6,25], en este estudio la mayoría de los pacientes presentaban clones HPN pequeños (<5%) en las tres líneas celulares analizadas. Los clones de eritrocitos fueron de menor tamaño que los de monocitos y granulocitos, probablemente a consecuencia de la destrucción de los eritrocitos HPN, mediada por el complemento [5,19]. La mediana del tamaño del clon de granulocitos fue menor a la reportada en otros estudios [30,39]. No obstante, las comparaciones entre diferentes series están limitadas por el empleo de diferentes puntos de corte para definir los clones HPN positivos. No se encontraron diferencias en el tamaño del clon de granulocitos HPN según la severidad de la anemia aplásica, pero sí de acuerdo a la categoría de la HPN, siendo mayores los clones hallados en pacientes con HPN asociada a anemia aplásica (mediana: 51,5%; rango: 4,2 – 99%) que los identificados en pacientes HPN subclínica (mediana: 2,5%; rango: 0,1 – 42,5%). Estos datos corresponden con los hallazgos de

estudios previos, los cuales determinaron que la presentación de hemólisis en pacientes con anemia aplásica y HPN dependen directamente del tamaño de los clones [6,40].

La relación entre la presencia de clones HPN y la respuesta a los tratamiento inmunosupresores continúa siendo motivo de controversia [2]. Algunos estudios sugieren que los pacientes con anemia aplásica y clones HPN pueden responder mejor estos tratamientos, mientras que otros no ha encontrado una asociación significativa [6]. En este estudio, se observó una mayor proporción de respuesta parciales o completas en los pacientes negativos para HPN. Estos resultados son semejantes a los informados por Timeus y colaboradores en una pequeña serie de pacientes pediátricos. Utilizando un punto de corte de 0.15% para definir clones HPN positivos (similar al del presente estudio), estos autores encontraron los pacientes negativos para HPN tenían mayor respuesta global al tratamiento inmunosupresor [42]. Llamativamente, los estudios que han encontrado una asociación entre la presencia de clones HPN y mejores respuesta al tratamiento inmunosupresor, son aquellos que han empleado puntos de corte más bajos para definir la positividad de los clones [31,39], sugiriendo que son los clones más pequeños los que repercuten favorablemente en la respuesta a los esquemas inmunosupresores.

El presente estudio presenta como principal limitación su carácter retrospectivo. Los datos obtenidos a partir de la historia clínica con frecuencia son insuficientes para realizar una descripción detallada de un grupo de pacientes en particular. A lo anterior se suma la atención fraccionada de los pacientes, según la disposición de las entidades aseguradoras, lo cual impide disponer de la información en un solo centro. La revisión de la literatura revela limitaciones similares, derivadas generalmente de la baja incidencia de estas patologías. Quedan importantes vacíos de conocimiento en múltiples aspectos de la asociación entre HPN y anemia aplásica. En nuestro medio, se requieren estudios prospectivos que permitan la recolección de información más completa. Dada la baja frecuencia de la anemia aplásica, tales estudios prospectivos deben ser esfuerzos multicéntricos, que abarquen varias ciudades del país.

8. Conclusiones

- Aproximadamente dos tercios de los pacientes con anemia aplásica presentan clones HPN, siendo estos clones más frecuentes en pacientes con mayor severidad de la aplasia.
- La mayoría de los pacientes HPN positivos corresponden a la categoría HPN subclínica.
- El tamaño de los clones HPN se relaciona con las manifestaciones clínicas de la HPN, pero no con la severidad de la aplasia.
- La relación entre clones HPN y respuesta a inmunosupresión continúa mostrando resultados conflictivos
- Se requieren estudios prospectivos multicéntricos a gran escala para obtener información más detallada sobre estas patologías de baja frecuencia, pero de gran repercusión clínica.

A. Anexo: Formato de recolección de datos de historia clínica

CARACTERIZACIÓN DE LOS CLONES HPN EN PACIENTES CON ANEMIA APLÁSICA

Formato de recolección de datos de historia clínica

Fecha de diligenciamiento (día/mes/año): ____/____/____

1. Identificación: _____
2. Edad: _____ años
3. Sexo: Femenino ____ Masculino ____
4. Fecha del diagnóstico (biopsia de médula ósea) de anemia aplásica (día /mes/año):
____/____/____
5. Celularidad en biopsia de médula ósea al momento del diagnóstico: _____%
6. Hemoglobina al momento del diagnóstico de anemia aplásica:
Menor a 10g/dl ____ Mayor o igual a 10g/dl ____ Sin dato ____
7. Recuento neutrófilos al momento del diagnóstico de anemia aplásica:
Menor a 200/ μ l ____ 200 a 499/ μ l ____ 500 a 1,499/ μ l ____
Mayor o igual a 1,500/ μ l ____ Sin dato ____

8. Recuento de plaquetas al momento del diagnóstico de anemia aplásica:

Menor a 20,000/ μ l ____ 20,000 a 49,999/ μ l ____

Mayor o igual a 50,000/ μ l ____ Sin dato ____

9. Recuento de reticulocitos al momento del diagnóstico de anemia aplásica:

Menor a 20,000/ μ l ____ Mayor o igual a 20,000/ μ l ____ Sin dato ____

10. Hemólisis (nivel de lactato deshidrogenasa mayor o igual a 1,5 veces el límite superior normal):

Si ____ No ____ Sin dato ____

11. Trombosis:

Si ____ No ____ Sin dato ____

12. Tratamiento inmunosupresor:

Si ____ No ____ Sin dato ____

Si la respuesta a la pregunta 12 es **Si**, responder las siguientes preguntas:

13. Tipo de inmunosupresión:

Esquema ATG (con o sin ciclosporina) ____ Ciclosporina (sin ATG) ____

Otro ____ ¿Cuál? _____

14. Respuesta a la inmunosupresión:

Ninguna ____ Parcial ____ Completa ____

B. Anexo: Formato de recolección de datos de citometría de flujo

CARACTERIZACIÓN DE LOS CLONES HPN EN PACIENTES CON ANEMIA APLÁSICA

Formato de recolección de datos de citometría de flujo

Fecha de diligenciamiento (día/mes/año): ____/____/____

1. Identificación: _____
2. Número de muestra: _____
3. Fecha de citometría de flujo para HPN (día /mes/año): ____/____/____
4. Porcentaje eritrocitos HPN: _____%
5. Porcentaje monocitos HPN: _____%
6. Porcentaje granulocitos HPN: _____%
7. Resultado HPN: Positivo ____ Negativo ____

Bibliografía

- 1 Segel GB, Lichtman MA. Aplastic Anemia: Acquired and Inherited. In: Kaushansky K, Beutler E, Seligsohn U, *et al.*, eds. *Williams Hematology*. China: McGraw-Hill Professional 2010.
- 2 Marsh JCW, Ball SE, Cavenagh J, *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2009;**147**:43–70.
- 3 Najean Y, Haguenauer O. Long-term (5 to 20 years) Evolution of nongrafted aplastic anemias. The Cooperative Group for the Study of Aplastic and Refractory Anemias. *Blood* 1990;**76**:2222–8.
- 4 Parker CJ. The Pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007;**35**:523–33.
- 5 Parker CJ. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Kaushansky K, Beutler E, Seligsohn U, *et al.*, eds. *Williams Hematology*. New York City: McGraw-Hill Professional 2010. 635–47.
- 6 Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 2012;**19**:141–8.
- 7 Hillmen P, Muus P, Röth A, *et al.* Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2013;**162**:62–73.
- 8 Montané E, Ibáñez L, Vidal X, *et al.* Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study. *Haematologica* 2008;**93**:518–23.
- 9 Camitta BM, Rapoport J, Parkman R, *et al.* Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood* 1975;**45**:355–63.
- 10 Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, *et al.* Progressive Telomere Shortening in Aplastic Anemia. *Blood* 1998;**91**:3582–92.
- 11 Young NS, Scheinberg P, Calado R. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol* 2008;**15**:162–8.
- 12 Holmberg L a, Seidel K, Leisenring W, *et al.* Aplastic anemia: analysis of stromal cell function in long-term marrow cultures. *Blood* 1994;**84**:3685–90.

- 13 Stute N, Fehse B, Schroder J, *et al.* Human mesenchymal stem cells are not of donor origin in patients with severe aplastic anemia who underwent sex-mismatched allogeneic bone marrow transplant. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;**11**:977–84.
- 14 Thomas E, Storb R, Giblett E, *et al.* Recovery from aplastic anemia following attempted marrow transplantation. *Exp Hematol* 1976;**4**:97–102.
- 15 Speck B, Gluckman E, Haak H, *et al.* Treatment of aplastic anaemia by antilymphocyte globulin with and without allogeneic bone-marrow infusions. *Lancet* 1977;**2**:1145–8.
- 16 Young NS, Maciejewski JP. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997;**336**:1365–72.
- 17 Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006;**108**:2509–19.
- 18 Risitano AM, Maciejewski JP, Green S, *et al.* In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia : molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR β -CDR3 sequencing. *Lancet* 2004;**364**:355–64.
- 19 Parker C, Omine M, Richards S, *et al.* Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;**106**:3699–709.
- 20 Parker CJ, Ware RE. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, *et al.*, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2009. 998–1020.
- 21 Urbano-Ispizu A, Gaya A, Colado E, *et al.* Diagnosis and treatment of nocturnal paroxysmal hemoglobinuria. *Med Clin* 2011;**136**:121–7.
- 22 Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, *et al.* Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic test, advantages, & limitations. *Eur J Haematol* 2009;**83**:503–11.
- 23 Borowitz M, Craig F, DiGiuseppe J, *et al.* Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytom Part B (Clinical Cytom)* 2010;**78 B**:211–30.
- 24 Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013;**121**:4985–96; quiz 5105.
- 25 Wang H, Chuhjo T, Yasue S, *et al.* Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002;**100**:3897–902.

- 26 Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Haematologica* 2009;**94**:3–7.
- 27 Scheinberg P, Marte M, Nunez O, *et al.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica* 2010;**95**:1075–80.
- 28 Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P, *et al.* Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Cells in Patients with Bone Marrow Failure Syndromes. *Ann Intern Med* 1999;**131**:467–8.
- 29 Nakakuma H, Kawaguchi T. Pathogenesis of selective expansion of PNH clones. *Int J Hematol* 2003;**77**:121–4.
- 30 Sugimori C, Mochizuki K, Qi Z, *et al.* Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br J Haematol* 2009;**147**:102–12.
- 31 Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, *et al.* Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;**107**:1308–14.
- 32 Ishiyama K, Chuhjo T, Wang H, *et al.* Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. *Blood* 2003;**102**:1211–6.
- 33 Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, *et al.* Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2009;**144**:206–16.
- 34 International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study. Incidence of aplastic anemia : the relevance of diagnostic criteria . By the. *Blood* 1987;**70**:1718–21.
- 35 Camitta BM. What is the definition of cure for aplastic anemia? *Acta Haematol* 2000;**103**:16–8.
- 36 Maluf EMCP, Pasquini R, Eluf JN, *et al.* Aplastic anemia in Brazil: incidence and risk factors. *Am J Hematol* 2002;**71**:268–74.
- 37 Proyecciones de población. <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/proyecciones-de-poblacion> (accessed 29 Jan2014).
- 38 Issaragrisil S, Sriratanasatavorn C, Piankijagum A, *et al.* Incidence of aplastic anemia in Bangkok. The Aplastic Anemia Study Group. *Blood* 1991;**77**:2166–8.
- 39 Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, *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* 2013;:Epub ahead of print.
- 40 Pu JJ, Mukhina G, Wang H, *et al*. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur J Haematol* 2011;**87**:37–45.
- 41 Londoño M, Arenas-Mantilla M, Henao-Uribe AM, *et al*. Characteristics Of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones In Colombian Patients. *Blood* 2013;**122**:4869.
- 42 Timeus F, Crescenzo N, Lorenzati A, *et al*. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in children with acquired aplastic anaemia: a prospective single centre study. *Br J Haematol* 2010;**150**:483–5.