

Diagnóstico por citometría de flujo de la hemoglobinuria paroxística nocturna

Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry

Gabriela Díaz Domínguez^{1*}
Vianed Marsán Suárez¹
Amanda Sánchez Ballester¹

¹ Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

*Lic. Gabriela Díaz Domínguez. (rchematologia@infomed.sld.cu)

RESUMEN

Introducción: La hemoglobinuria paroxística (HPN) nocturna es una enfermedad clonal, adquirida y no maligna de la célula madre hematopoyética. En este padecimiento se encuentra afectado el anclaje a la membrana celular de moléculas como el CD55 y CD59, fundamentales en la regulación de la lisis mediada por el complemento. Por su elevada especificidad y sensibilidad, la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es el método de elección para el diagnóstico de esta enfermedad.

Objetivo: Establecer un algoritmo diagnóstico de la HPN por CMF.

Métodos: Se analizó una muestra de sangre periférica para CFM de un paciente con sospecha de HPN. El inmunofenotipaje celular se realizó con un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos que se expresan en la membrana citoplasmática mediante su anclaje al glicosilfosfatidilinositol. Las muestras se leyeron en un citómetro GALLIOS, Beckman Coulter y los datos obtenidos se analizaron con el empleo del programa informático Kaluza.

Resultados: Se identificaron cuatro clones HPN. En los granulocitos se observó un clon HPN de aproximadamente 90 %, con deficiencia en la expresión de CD16, CD24, CD55 y CD59. En los monocitos se observaron dos clones: (1) clon CD14-CD59- y (2) clon CD14-CD59+ con tamaños clonales de 59,77 % y 19,45 %, respectivamente. En los eritrocitos se identificó un clon de 19,98 % y se determinó el grado de afectación.

Conclusiones: El algoritmo de análisis propuesto permite identificar las poblaciones celulares con clones HPN. Además, dichos clones pueden ser cuantificados en cuanto a tamaño clonal y expresividad de los antígenos dependientes de anclaje a glicosilfosfatidilinositol. Con la CFM se logra determinar con elevada sensibilidad el

grado de afectación de los eritrocitos en la expresión de CD59 como medida directa de la susceptibilidad que experimentan a la lisis por el complemento.

Palabras clave: hemoglobinuria paroxística nocturna; clon HPN; citometría de flujo; algoritmo diagnóstico; HPN.

ABSTRACT

Introduction: The paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a clonal, acquired disease and not malignant hematopoietic stem cell. In this condition, the anchor to the cell membrane of molecules such as the CD55 and CD59 is affected, These antigens are fundamental in the regulation of the complement-mediated lysis. By its high specificity and sensitivity multiparametric flow cytometry (MFC) is the goal standard for the diagnosis of this disease.

Objective: To establish a diagnosis of PNH by MFC algorithm.

Methods: A sample of peripheral blood of a patient with suspicion of PNH was analyzed by MFC. The cell immunophenotyping was carried out using a panel of monoclonal antibodies directed against antigens that are expressed in the cytoplasmic membrane through its the glycosylphosphatidylinositol anchor. The samples were read in a Cytometer GALLIOS, Beckman Coulter and the data obtained were analyzed with the use of the Kaluza software.

Results: We identified four clones HPN. A HPN clone of approximately 90%, was observed in granulocytes with deficiency in the expression of CD16, CD24, CD55, CD59. In the monocytes were two clones: (1) CD14-CD59- clone and (2) CD14-CD59 + clone, with size clone of 59.77% and 19.45%, respectively. A clone of 19.98% was identified in erythrocytes and determined the degree of involvement of the same.

Conclusions: The proposed analysis algorithm allows to identify cellular populations with clones PNH. In addition, these clones can be quantified in terms of size clonal and expressiveness of anchor to glycosylphosphatidylinositol antigen dependent. With the MFC is achieved with high sensitivity to determine the degree of involvement of the erythrocytes in the expression of CD59 as a direct measure of susceptibility undergoing lysis by complement.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; clone PNH; flow cytometry, differential algorithm; PNH.

Recibido: 29/06/2018

Aceptado: 16/11/2018

INTRODUCCIÓN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal, adquirida, no maligna, que se origina a partir de una mutación somática en la célula madre hematopoyética. Dicha mutación ocurre en el gen PIG-A que se encuentra en el cromosoma X, al final del brazo corto (Xp22.1).⁽¹⁾ Este gen codifica una proteína involucrada en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI), un glucolípido cuya función biológica es el anclaje de proteínas a la superficie de la membrana celular.⁽²⁾ Como resultado de este desorden genético se originan clones de células que carecen total o parcialmente de la expresión de proteínas que se encuentran normalmente unidas a la superficie de la membrana celular a través del GPI.⁽³⁾ Entre dichas proteínas se encuentran el CD55 y CD59, implicadas directamente en la fisiopatología de la HPN. Estas dos moléculas constituyen defensas celulares contra componentes del complemento. La pérdida total o parcial de la expresión de estas proteínas hace de los eritrocitos células susceptibles a la lisis mediada por complemento.^(4,5) Como resultado, se evidencia la hemólisis de los hematíes y una activación de los granulocitos, monocitos y las plaquetas.⁽⁶⁾

La HPN se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica crónica intravascular, hemoglobinuria y frecuentemente se asocia con pancitopenia. Además, esta enfermedad se caracteriza por la ocurrencia de episodios tromboembólicos recurrentes y de localización atípica (abdominal, visceral, cerebral y cutánea), que ocurren en casi la mitad de los pacientes y son la causa fundamental de morbimortalidad de la enfermedad.⁽⁷⁾ Otras manifestaciones clínicas características de la HPN son: fatiga crónica, dolor abdominal moderado y grave, disfagia, disfunción eréctil e insuficiencia renal.^(8,9) Entre el 5 y el 9 % de los pacientes con HPN pueden presentar síndrome mielodisplásico (SMD) y anemia aplásica;⁽¹⁰⁾ algunos enfermos, pueden evolucionar a leucemia aguda.^(11,12) Aunque la incidencia real de la HPN no es bien conocida, se estima la ocurrencia de 1,5-2,0 casos por millón de habitantes, por año en la población mundial, con una prevalencia de 15,9 casos por millón, similar a la incidencia de la anemia aplásica.⁽¹³⁾ La media de supervivencia con los tratamientos convencionales es de aproximadamente 10 años, pero se acorta si los pacientes presentan trombosis, deficiencia renal, fallo medular o mielodisplasia. La tasa de supervivencia a los 5 años es de 65 %.⁽¹⁴⁾

El diagnóstico clásico de la HPN se ha basado en pruebas que demuestran el incremento de la sensibilidad de los hematíes a la lisis mediada por complemento. La prueba de Ham fue el primer método diagnóstico que se desarrolló para el estudio de la HPN.⁽¹⁵⁾ Posteriormente, surgieron otros como: la prueba de sacarosa o sucrosa 16 y I prueba de sensibilidad a la lisis mediada por el complemento.⁽¹⁷⁾ Sin embargo, estas técnicas no presentan una sensibilidad y especificidad adecuadas, ya que no permiten detectar clones de células HPN inferiores a 5 %, ni estudiar las poblaciones leucocitarias.^(18,19)

La citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es el método de elección para la identificación de las células deficitarias de GPI, así como para el diagnóstico, la clasificación y monitoreo de los pacientes con diferentes formas clínicas de HPN.⁽²⁰⁾

El criterio diagnóstico que se tiene en cuenta en la actualidad para la confirmación de HPN por CFM, es que se demuestre el déficit de dos o más proteínas dependientes de anclaje a la membrana por el GPI en al menos dos líneas celulares diferentes.^(5,21)

El objetivo fue establecer el diagnóstico de la HPN por CFM a partir de una estrategia de análisis propuesta.

MÉTODOS

La muestra se obtuvo a partir de una extracción de sangre periférica (SP) en un tubo con EDTA de un paciente con sospecha clínica de HPN. La identificación y evaluación de los clones HPN se desarrolló por la técnica de CFM, con el empleo de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra antígenos que se encuentran normalmente anclados a la membrana celular por el GPI. La muestra fue procesada y analizada en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología. El resto de los reactivos utilizados fueron preparados en el propio laboratorio de Inmunología. Los AcMo utilizados fueron:

Anticuerpos monoclonales	Fluorocromos
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)

Técnicas y procedimientos de laboratorio

Se realizó el marcaje directo y múltiple con AcMo en las poblaciones de granulocitos-neutrófilos, monocitos y hematíes con la técnica establecida internacionalmente con algunas modificaciones.⁽²²⁾

En el caso de las muestras a las que se le añadirían los AcMo para el marcaje de los granulocitos y los monocitos se adicionaron primeramente 100 µL de sangre total y posteriormente se realizó el lisado de los hematíes con cloruro de amonio durante 10 min, a temperatura ambiente. Luego de un lavado con cloruro de sodio a 0,9 % y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm, las muestras se incubaron con los AcMo durante 20 a 30 min, protegidas de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con cloruro de sodio a 0,9 % y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm. Para el marcaje de los eritrocitos se utilizó sangre total diluida al 3 % en PBS. La muestra se incubó 30 min protegida de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas dos veces con cloruro de sodio a 0,9 % y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm.

Las células se fijaron con 300 µL de formaldehído al 1 % para conservar su viabilidad y luego fueron guardadas a 4°C hasta ser leídas en un citómetro GALLIOS, BeckmanCoulter.

Los datos obtenidos se analizaron con el empleo del programa informático Kaluza, versión 1.2.

Para el diagnóstico de la HPN por CMF se siguió el siguiente flujo de trabajo:

1. Separación de las diferentes poblaciones de leucocitos

Se separaron las poblaciones de células (linfocitos, granulocitos y monocitos) del *debris* celular, a partir de la utilización del CD45 vs SSC (*side scatter*, esta propiedad físico-química caracteriza la granulosidad o complejidad interna de las células).

2. Identificación de las proteínas deficientes en los neutrófilos-granulocitos con un ensayo multiparamétrico de 4 colores.

- 1) Control negativo (muestra no marcada)
- 2) CD15 FITC/CD16 PE/CD24 APC/CD45 PerCP

La población de neutrófilos-granulocitos se identificó mediante un "*gate*" o ventana, a partir de la utilización del CD15 vs SSC

- 3) CD16 PE/CD24 APC
- 4) CD59 FITC/CD55 PE/CD24 APC/CD45 PerCP

Combinaciones utilizadas para la identificación y cuantificación de los clones HPN doble negativos en los granulocitos.

3. Identificación de las proteínas deficientes en los monocitos con un ensayo multiparamétrico de 4 colores.

- 1) CD14 PC5/CD64 PE/CD59/CD45 APC

La población de monocitos se identificó mediante un "*gate*" o ventana, a partir de la utilización del antígeno CD64 PE vs SSC o en su defecto, con el uso de CD45 PerCP vs SSC

- 2) CD59 FITC/CD14 PC5

Combinación utilizada para la identificación y cuantificación de los clones HPN doble negativos en los monocitos.

Al detectarse clones celulares deficientes en la expresión de las proteínas dependientes de anclaje al GPI en ambas líneas celulares, se procedió a la realización del análisis en los hematíes

4. Identificación de las proteínas deficientes en los hematíes

- 1) Control negativo (muestra no marcada)
- 2) CD59 FITC/CD235a PE (glicoforina a)

Los eritrocitos se identificaron mediante un "gate" o ventana, a partir de la utilización del CD235a PE vs SSC

La expresión de CD59 sobre la población de eritrocitos se cuantificó y analizó mediante la utilización de las diferentes herramientas que provee el software de análisis Kaluza. Con ellas, se determinó la intensidad de fluorescencia media (IFM) del antígeno CD59. Los eritrocitos se clasificaron posteriormente como: tipo I (elevada IFM del CD59, expresión normal del antígeno sobre células normales), tipo II (moderada IFM del CD59, células con deficiencia parcial en los niveles de expresión del antígeno) y de tipo III (baja IFM del CD59, deficiencia completa en la expresión del antígeno).

RESULTADOS

A partir del algoritmo de análisis propuesto por los investigadores en este trabajo se identificaron y cuantificaron los clones HPN de la muestra de SP.

En el momento de adquirir las células en el citómetro (10^5 células), se realizó una calibración previa con la muestra no marcada (control negativo). De esta forma, se obtuvo una adecuada distribución de las células según su tamaño y complejidad interna, las cuales dependieron del grado y de la magnitud de la dispersión de la luz del láser, al interactuar con los componentes celulares que se obtuvieron a través del análisis.

Cuando la luz difractada incidió en el mismo eje de la luz incidente, se evaluó el tamaño celular, a través del "Forward Side Scatter" (FW-SC). Por otro lado, cuando la luz difractada y reflejada se detectó a 90° de la dirección del láser, se evaluó la complejidad interna celular o granulosidad, a través del SSC (Fig. 1A).

Las células totales adquiridas se separaron en las diferentes subpoblaciones celulares de acuerdo con los parámetros físicos mencionados, mediante la utilización del antígeno leucocitario CD45 vs SSC. Estas poblaciones a su vez se separaron del *debris* celular. Como se observa en la Figura 1B, se realizó un "gate" o ventana en las poblaciones de granulocitos-neutrófilos y monocitos para el análisis posterior.

Para la identificación de los clones HPN en la población de granulocitos se realizó un ensayo de 4 colores. Se utilizó el antígeno CD15 como marcador inequívoco de la población de interés (Fig. 2A). A partir de la ventana de células granulocíticas CD15 positivas (+), se evaluaron 4 proteínas diferentes: CD16, CD24, CD55 y CD59, que son dependientes de GPI para su anclaje a la membrana citoplasmática. En la figura 2B se observa el gráfico de puntos donde se evaluó la deficiencia simultánea en la expresión de CD16 y CD24. Se pudo determinar la presencia de un clon HPN que constituyó 90,69 % del total de los granulocitos. Así mismo, se pudo apreciar la deficiencia en la expresión de CD55 y CD59 con un tamaño de clon HPN de 90,81 % y 90,40 %, respectivamente (Fig. 2C y 2D).

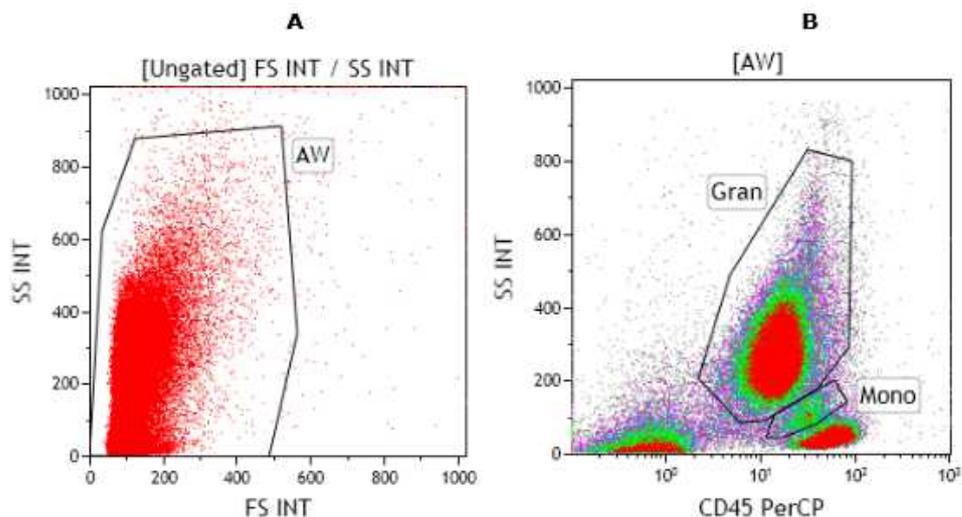
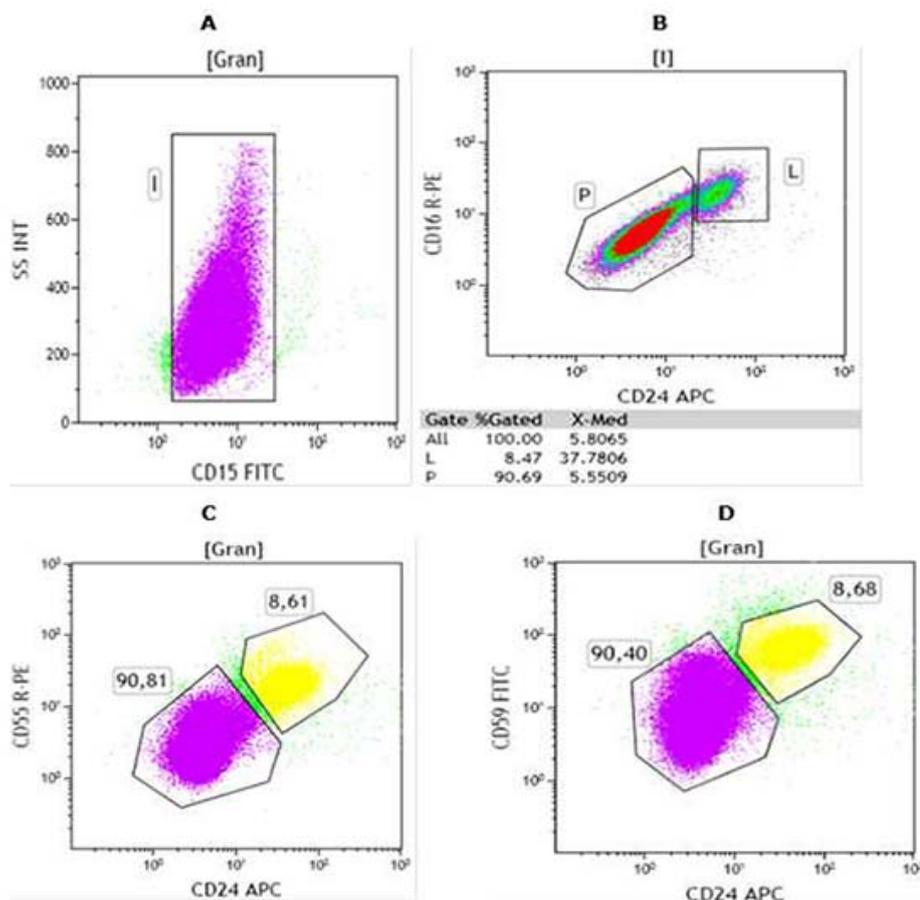


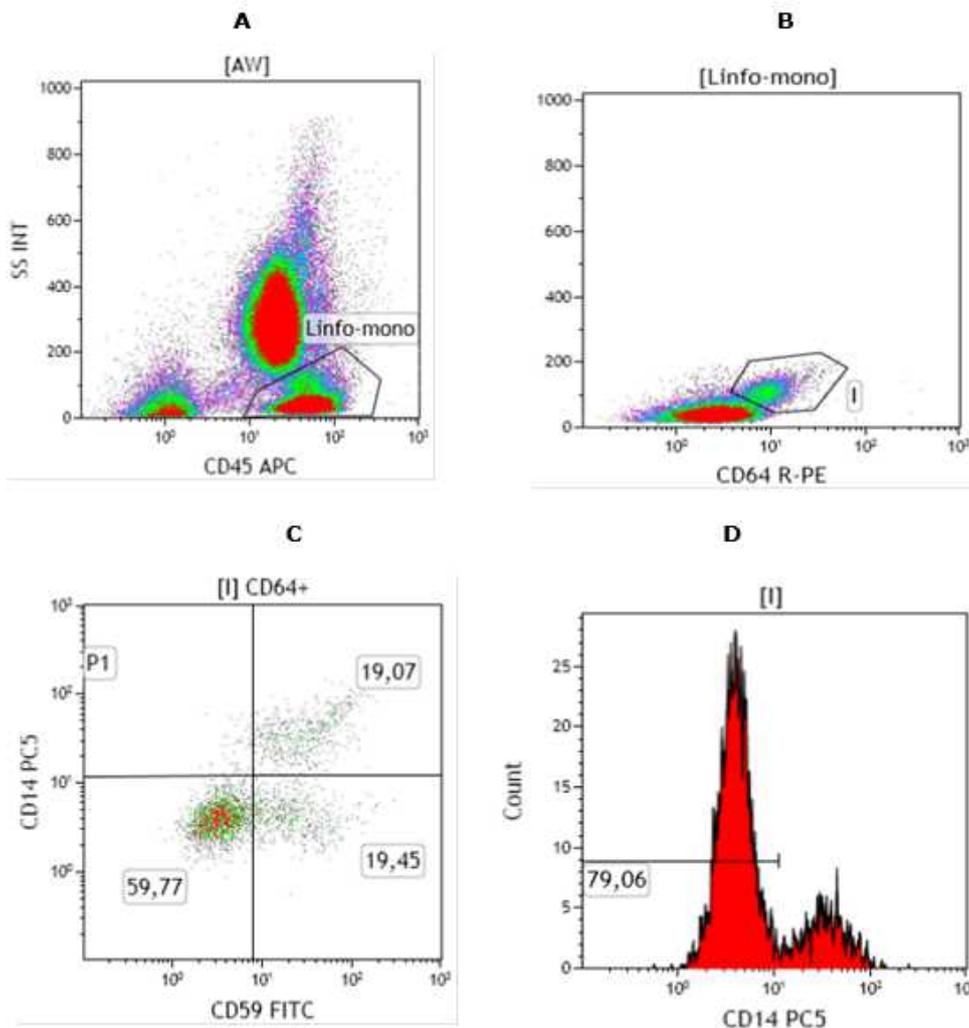
Fig. 1- Distribución de las células totales provenientes de sangre periférica de un paciente con HPN, según su tamaño y complejidad interna (A). Separación de las diferentes poblaciones celulares de interés mediante la utilización de CD45 vs SSC (B).



A: Identificación de los granulocitos con la utilización del CD15 vs SSC. **B, C y D:** Gráficos dot plot que muestran la evaluación de las proteínas dependientes de GPI CD16, CD24, CD55 y CD59 en la población de granulocitos CD15+.

Fig. 2- Estrategia de análisis para la identificación y cuantificación de clones HPN en la población de granulocitos-neutrófilos de un paciente con la enfermedad.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de los antígenos CD14 y CD59 en la población de monocitos. Primeramente, se separaron las células mononucleares (Fig. 3A) de la población de granulocitos y del *debris* celular mediante el CD45 vs SSC (Fig. 3B). Con la utilización del CD64 se separó y se identificó de manera evidente la población de monocitos para la posterior cuantificación de los posibles clones HPN presentes en esta población. En la figura 3C se muestra un clon HPN doble negativo para la expresión de CD14 y CD59, ambas proteínas dependientes de anclaje a la membrana celular por el GPI. El tamaño del clon observado fue de 59,77 % del total de monocitos. Se identificó además un segundo clon HPN con un tamaño clonal de 19,45 % del total de las células evaluadas, que expresó el antígeno CD59 pero no así el CD14. En la figura 3D se muestra el grado de expresividad total del antígeno CD14 y se determinó una deficiencia del 79,06 % en la expresión de la proteína en los monocitos.



A: Separación de las células mononucleares del *pool* de células en la suspensión.

B: Identificación de los monocitos con la utilización del CD64 vs SSC. **C:** Gráfico *dot plot* que muestra la evaluación de las proteínas dependientes de GPI CD14 y CD59 en la población de monocitos CD64+. **D:** Gráfico histograma que representa la intensidad de fluorescencia media (IFM) de un clon HPN parcialmente deficiente en la expresión de CD14 en los monocitos.

Fig. 3- Estrategia de análisis para la identificación y cuantificación de clones HPN en la población de monocitos.

Se estableció una comparación de los parámetros evaluados entre una muestra control sano y la muestra problema. En la [figura 4](#) se observa que en la muestra control, la totalidad de la población de eritrocitos CD235a+ expresó el antígeno CD59 y que la expresividad de la proteína sobre la membrana celular fue de 100 %, lo que se correspondió con una elevada IFM y se traduce como la expresión normal del antígeno sobre células normales o de tipo I.

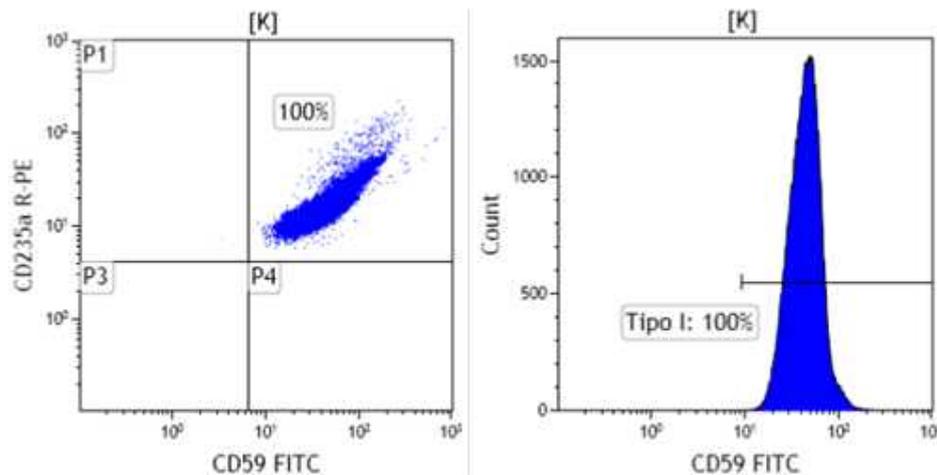


Fig. 4- Representación en un gráfico *dot plot* e histograma, de la expresión de CD59 por la población de eritrocitos CD235a+ y de la intensidad de fluorescencia media del antígeno, respectivamente, en una muestra control negativo.

Una vez que se demostró la presencia y el tamaño de los clones HPN en los leucocitos, se procedió a evaluar la expresión de la proteína CD59 en los hematíes para determinar el grado de afectación de estas células. De esta manera se pudo determinar la susceptibilidad de los eritrocitos a la lisis mediada por el sistema del complemento. Los hematíes se identificaron a partir del antígeno específico de linaje eritrocitario CD235a ([Fig. 5B](#)).

Cuando se analizó la muestra proveniente de un paciente con sospecha de HPN, se observó un clon HPN CD235a+CD59- con un tamaño clonal de 19,98 % ([Fig. 5C](#)). Se determinó finalmente el grado de afectación de los eritrocitos en cuanto a la expresividad en la membrana del antígeno CD59.

Como se observa en la [figura 5D](#), el histograma mostró tres señales diferentes. La primera señal representó una expresividad de 80,47 % en los eritrocitos de la molécula CD59, que se corresponde con el fenotipo de células normales o de tipo I. La señal con una IFM intermedia representó 19,33 % de expresividad, que se corresponde con el fenotipo de células parcialmente deficientes o de tipo II y la tercera señal detectada, correspondiente con células que son totalmente deficientes en la expresión de antígenos dependientes de GPI, presentó 0,19 % de expresividad de CD59 en la membrana celular. El clon HPN determinado como de tipo III, se corresponde con eritrocitos deficientes totalmente en la expresión de GPI y por ende, no expresan en la membrana celular las proteínas reguladoras de la lisis mediada por el sistema del complemento, solo pudo ser identificado por la técnica de CFM.

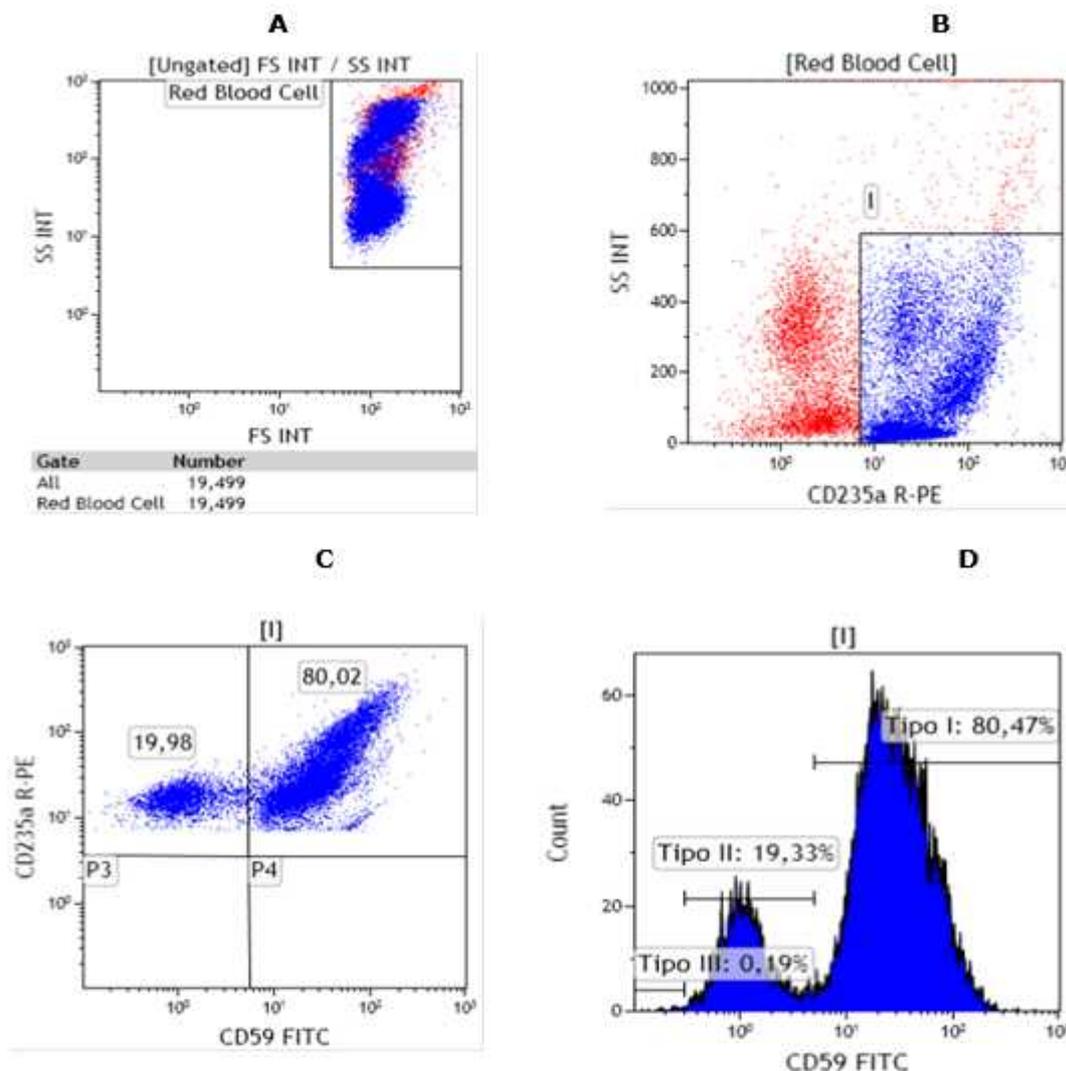


Fig. 5- (A) Gráfico que representa la dispersión celular de las poblaciones de eritrocitos y plaquetas. (B) Separación de los hematíes con la utilización de CD235a vs SSC. (C) Identificación y cuantificación de un clon HPN CD59- en la población de eritrocitos CD235a+ (D) El histograma muestra la intensidad de fluorescencia media de la proteína CD59 en la población de eritrocitos. Se observan tres señales correspondientes a los tipos I (elevada y eritrocitos normales), II (intermedia-baja y eritrocitos parcialmente deficientes en la expresión de GPI) y III (baja y eritrocitos totalmente deficientes en la expresión de GPI en la membrana citoplasmática), respectivamente.

DISCUSIÓN

El diseño y establecimiento de una estrategia o algoritmo de trabajo para aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección de clones HPN por CFM, ha sido un objetivo perseguido por muchos investigadores a partir de la última década del pasado siglo.⁽¹⁸⁾

Históricamente, el diagnóstico de la HPN se efectuó mediante la evidencia de una mayor sensibilidad de los eritrocitos, respecto a controles normales, a la lisis por el sistema del complemento activado, ya sea por acidificación del plasma (prueba de Ham) o por aumento de su osmolaridad (prueba de sacarosa). Sin embargo, estas pruebas presentan una baja sensibilidad, no permiten la evaluación de la expresión de proteínas en los leucocitos y pueden brindar falsos negativos si los pacientes están transfundidos.⁽²³⁾

Actualmente, la CFM es el método por excelencia para el diagnóstico de la HPN. Varios grupos de investigadores han realizado el diagnóstico de esta enfermedad mediante el ensayo de dos colores con los marcadores CD55 y CD59.^(24,25) A pesar de que los ensayos de este tipo son informativos, se utilizan principalmente para el análisis masivo de muestras. Una de las desventajas fundamentales es que el CD55 generalmente presenta una señal de baja intensidad y en los eritrocitos no es posible detectar las células deficitarias de tipo II. De forma general este ensayo no presenta una alta sensibilidad ya que no es posible detectar clones HPN < 1 % en enfermedades como la anemia aplásica y el SMD.⁽¹⁴⁾

La introducción y estandarización de nuevos marcadores y el refinamiento en las estrategias de análisis para el diagnóstico de la HPN ha incrementado la especificidad y sensibilidad de la técnica para la detección de alta resolución de clones de pequeño tamaño en otras enfermedades medulares asociadas a la HPN.⁽²⁶⁾

En este trabajo se diseñó un algoritmo de análisis basado en un ensayo de 4 colores, para la identificación correcta de las poblaciones celulares de interés y la detección y cuantificación de clones HPN < 1 %. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros investigadores.⁽²⁷⁻²⁹⁾

Para realizar el diagnóstico de la HPN por esta técnica, es necesario demostrar la deficiencia de al menos dos proteínas dependientes de anclaje a GPI en dos líneas celulares diferentes, para excluir que el proceso clínico sea una consecuencia de una deficiencia hereditaria y aislada de una sola proteína dependiente de anclaje a GPI.⁽²²⁾ De acuerdo con lo planteado por estos investigadores, en el presente estudio se demostró la deficiencia de cinco proteínas diferentes (CD14, CD16, CD24, CD55, CD59) que son dependientes de anclaje a la membrana por el GPI en las tres líneas celulares evaluadas. La estrategia basada en el ensayo de 4 colores propuesta por los autores de esta investigación, fue efectiva y precisa en el diagnóstico de la HPN.

En los últimos cinco años se han desarrollado mejoras en la técnica y en las estrategias de análisis, con la incorporación de marcadores novedosos para incrementar la sensibilidad con un límite de detección de 0,001 %, ya que se conoce que pacientes con anemia aplásica o SMD que presentan clones HPN muy pequeños, tienen un mejor pronóstico en la respuesta a los tratamientos con inmunosupresores.⁽⁷⁾ Entre los nuevos marcadores introducidos se puede citar la proaerolisina marcada con fluoresceína (FLAER) que reconoce y se une de manera específica al GPI en la membrana citoplasmática de los leucocitos y el CD157, un antígeno que se encuentra expresado en las líneas granulocíticas y monocíticas. Con estos marcadores se han diseñado ensayos de 6 y de 8 colores lo cual aumenta significativamente la especificidad y sensibilidad de la técnica de CFM.^(4,30)

Desde el punto de vista económico, el ensayo multiparámetro de 4 colores es costoso en cuanto a recursos tecnológicos y de reactivos. Sin embargo, en un estudio realizado en el 2016 se demostró que la utilización de este tipo de ensayo redujo los costos económicos 37,0 % cuando se comparó con un ensayo de 2 colores, mientras que aumentó los costos 10 % solamente, cuando fue comparado con ensayos de 5 o más colores.⁽²⁹⁾

Con los resultados obtenidos en este trabajo se demostró que el algoritmo diagnóstico propuesto permitió identificar y cuantificar los clones HPN. Se determinó la expresividad de los antígenos dependientes de anclaje a GPI, así como el grado de afectación de los eritrocitos en la expresión de CD59, como medida directa de la susceptibilidad que experimentan a la lisis mediada por el sistema del complemento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brodsky RA. New Insights into Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;24(8):516.
2. Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, et al. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science*. 1993;259(5099):1318-20.
3. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993;73(4):703-11.
4. Hai-Su Yang, Min Yang, Xiaoyu Li, Tugulea S, Dong H. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in peripheral blood and bone marrow with six-color flow cytometry *Biomarkers Med*. 2013;7(1):99-111.
5. Elena G, Milovic V, Ramos A, Rossi BM, Toullet V. Síndrome de fallo medular. *Sociedad Argentina de Hematología: Guías de Diagnóstico y Tratamiento*; 2017.p.306-13.
6. Raza A, Ravandi F, Rastogi A, Bubis J, Lim SH, Weitz I. A Prospective Multicenter Study of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Cells in Patients with Bone Marrow Failure. *Cytometry B Clin Cytom* 2014;86(3):175-82.
7. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106(12):3699 -709.
8. Galeano A, Sapia S, Spinelli O, Geraghty G, Ferreyra Y. Hemoglobinuria paroxística nocturna: diagnóstico y seguimiento por Citometría de Flujo. *Hematología*. 2014;18(1):67-9.
9. Luzzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *F1000Res*.2016;5.pii:F1000 Faculty Rev-209.
10. Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Hematológica*. 2009 Jan;94(1):3-7.
11. Devine DV, Gluck LW, Rosse WF, Weinberg BJ. Acute Myeloblastic Leukemia in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Evidence of Evolution from the Abnormal Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuna Clone. *J. Clin. Invest*. 1987;79:314-7.

12. Araten DJ, Sanders KJ, Anscher D, Zamechek L, Hunger SP, Ibrahim S. Leukemic Blasts with the Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Phenotype in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *AJP* 2012;181(5):1862-9.
13. Biswajit H, Pratim PP, Kumar ST, Shilpi S, Krishna GB, Aditi A. Aplastic anemia: a common hematological abnormality among peripheral pancytopenia. *N Am J Med Sci* 2012;4:384-8.
14. Sahin F, Comert M, Gokmen N, Yilmaz M, Oruc N, Gurgun A, *et al.* Multidisciplinary clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Blood Res* 2015;5(1):1-9.
15. Ham TH, Dingle JH. Studies on destruction of red blood cells. II. Chronic immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest.* 1939 Nov; 18(6): 657-72.
16. Hartmann RC, Jenkins DE. The "sugar-water" test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1966;275:155-7.
17. Rosse WF, Dacie JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966;45:736-48.
18. Hall SE, Rosse WF. The Use of Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry in the Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood* 1996;87(12):5332-40.
19. Kahng J, Kim Y, Kim JO, Koh K, Lee JW, Han K. A Novel Marker for Screening Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Using Routine Complete Blood Count and Cell Population Data. *Ann Lab Med* 2015;35(1):35-40.
20. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of Flow Cytometry to the Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry (Comm. Clin. Cytometry)* 2000;42:223-33.
21. Villegas A, Arrizabalaga B, Bonanad S, Colado E, Gaya A, González A, Jarque I, Núñez R, Ojeda E, Orfao A, Ribera JM, Vicente V, Urbano-Ispizua A y Grupo de Trabajo de HPN de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. *Med Clin (Barc)* 2016;146(6):278.e1-278.e7.
22. Borowitz MJ, Craig FE, DiGiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, *et al.* Guidelines for the Diagnosis and Monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Related Disorders by Flow Cytometry. *Cytometry Part B Clin Cytometry.* 2010;78B:211-30.
23. Mondragón-Cardona A, Rojas-Mirquez J, Jiménez-Canizales CE, Umaña-Giraldo HJ. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: reporte de un caso. *Invest Andina.* 2012;15(26):716-23.
24. Dworacki G, Sikora J, Mizera-Nyczak E, Trybus M, Iwona ML, Czyz A. Flow cytometric analysis of CD55 and CD59 expression on blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria *Folia Histochem Cytobiol.* 2005;43(2):117-20.

25. Hongying L, Chuan H, Huanling Z, Xianglong L, Chunli Y, Dewan Z, Xiujin W. A Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria Progress with Waldenstro"m Macroglobulinemia Along with T Cell Monoclonal Expansion Indian J Hematol Blood Transfus. 2014;30(1):227-31.
26. Fletcher M, Sutherland R, Whitby L, Whitby A, Richards SJ, Acton E, *et al.* Standardizing Leucocyte PNH Clone Detection: An International Study. Cytometry Part B Clin Cytometry. 2014;86B:311-8.
27. DeZern AE, Symons HJ, Resar LS, Borowitz MJ, Armanios MY, Brodsky R. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones to exclude inherited bone marrow failure síndromes. Eur J Haematol. 2014;92(6):467-70.
28. Azambuja AP, Malvezzi M, Bitencourt MA, Oliveira MM, Medeiros LA, Pasquini R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone in 103 Brazilian patients: diagnosis and classification. Rev Bras Hematol Hemoter. 2015;37(2):90-7.
29. Patussi Correia R, Cameirão Bento L, Apelle Bortolucci AC, Anderson Marega A, da Costa Vaz A, Schmidell D, *et al.* Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Einstein (Sao Paulo). 2016;14(3):366-73.
30. Chun-Fai, Chan R, Leung RH, Posadas A, Lorey TS, Shaw AJ. High sensitivity 8-color flow cytometry assay for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria granulocyte and monocyte detections. Biomed Rep. 2018;8:224-34.