

Hemoglobinuria paroxística nocturna

COORDINADORES: R. ARRANZ. *Madrid*
J.C. VALLEJO. *Madrid*

Resumen del simposio

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), también conocida como síndrome de Marchiafava-Michelli, es una hemopatía adquirida poco frecuente de la que aún quedan aspectos por conocer. Se presenta principalmente en el adulto joven, aunque existen casos que debutan en la infancia o en la senectud. La HPN es consecuencia de la expansión clonal no maligna de células progenitoras hematopoyéticas que han adquirido una mutación somática en el gen *pig-a* (fosfatidil-inositol-glucano A), situado en el brazo corto del cromosoma X. Como consecuencia de la misma, las células afectas son deficientes en una serie de proteínas que se anclan a la membrana a través del glucosil-fosfatidil-inositol (GPI-AP). Entre ellas, se encuentran MIRL (inhibidor de la lisis reactiva de la membrana; CD59) y DAF (factor acelerador de la degradación del complemento; CD55). Estas glucoproteínas son reguladoras fisiológicas de la actividad lítica del complemento y su déficit provoca la existencia hemólisis intravascular crónica, característica de la HPN. Más compleja es la explicación fisiopatológica de la hipercoagulabilidad, la insuficiencia medular y la distonía de la musculatura lisa que pueden presentar los pacientes.

La expresividad clínica de la HPN es muy variable, desde casos con escasa sintomatología hasta casos muy graves e incapacitantes. La supervivencia media de la HPN se sitúa en torno a los 10-15 años tras el diagnóstico. Los fenómenos tromboembólicos, característicamente recurrentes y de localización atípica (abdominal, visceral, cerebral, cutánea), ocurren en casi la mitad de los pacientes y constituyen la principal causa de mortalidad de la enfermedad. El diagnóstico clásico de la HPN se ha basado en test que demuestran el incremento de la sensibilidad de los hematíes a la lisis mediada por complemento (Ham, sacarosa). Hoy en día, la demostración del déficit de GPI-AP (CD55, CD59) en las células sanguíneas por citometría de flujo es el método de elección y está al alcance de la mayoría de los centros. Por el contrario, la identificación de mutaciones en el gen *pig-a* tiene unos requerimientos técnicos que la hacen irrealizable fuera de laboratorios especializados. El tratamiento actual de los pacientes con HPN debe basarse en el mejor conocimiento fisiopatológico de la enfermedad. La prevención y el manejo precoz de ciertas circunstancias (infecciones, esfuerzos físicos, estrés, etc.) pueden evitar el desarrollo de un brote de hemólisis aguda, cuyo tratamiento se basa en la hidratación y los corticoides. El soporte trasfusional debe ser individualizado y juicioso, entre otras razones porque puede ser el desencadenante de un brote hemolítico. La pertinencia o no del empleo de anticoagulación universal en los pacientes con HPN es un tema aún debatido. Sí existe consenso en la conveniencia de la anticoagulación permanente de los pacientes con antecedentes de trombosis o con factores de riesgo protrombótico adicionales, así como en el empleo de tratamiento trombolítico precoz en el manejo de las trombosis establecidas, siempre que sea posible.

En el futuro, la terapia génica, mediante la inserción de un gen *pig-a* normal, podría suponer la curación de la HPN. Sin embargo, en la actualidad, el único tratamiento curativo de la enfermedad es el alotrasplante hematopoyético. Debido a la morbimortalidad asociada a dicho procedimiento, la indicación del trasplante debe establecerse de forma cuidadosa, sobre la base de los factores de riesgo individuales de cada paciente. El empleo de acondicionamientos de intensidad reducida puede reducir el riesgo del trasplante en algunos pacientes. La reciente introducción del eculizumab (anticuerpo monoclonal dirigido frente a la fracción C5 del complemento) ha supuesto un importante avance en el manejo de los pacientes con HPN. La administración de eculizumab ha demostrado reducir, de forma muy significativa, no sólo la hemólisis intravascular y los requerimientos trasfusionales, sino también los temidos fenómenos tromboembólicos, con escasos efectos secundarios. Con todo, ahora más que nunca resulta necesario elaborar guías de actuación clínica para facilitar a los facultativos el manejo de los pacientes con esta infrecuente enfermedad.

En el presente simposio, un panel de expertos formado por el doctor J. L. Vives-Corrons (Hospital Clínico de Barcelona), la doctora B. Vidriales (Hospital Universitario de Salamanca), el doctor J. Deeg (Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle) y el doctor L. Luzzatto (Universidad de Firenze, Instituto Toscano

de Tumores) revisa las bases moleculares, la fisiopatología, el diagnóstico y el manejo de la HPN a la luz de los conocimientos actuales de la enfermedad.

Bibliografía

1. Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699-709.
2. Luzzatto L, Notaro R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Young N, Gerson SL, High KA (eds). *Clinical Hematology*. Philadelphia: Mosby; 2006. p. 326-39.
3. Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006; 355: 1233-43.
4. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007; 137: 181-92.

FISIOPATOLOGÍA Y BASES MOLECULARES DE LA HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

J.L. VIVES CORRONS

Unidad de Patología Eritrocitaria.
Hospital Clínic i Provincial. Barcelona

Introducción

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal de la hematopoyesis que, entre otras manifestaciones clínicas, se caracteriza por anemia hemolítica, hipercoagulabilidad e insuficiencia de la médula ósea. La HPN se origina por mutaciones somáticas adquiridas del gen PIG-A, a nivel de la célula madre pluripotente, que se halla localizado en el cromosoma X y codifica la síntesis de grupos glicosilados fosfatidilinositol (GPI), necesarios para el anclaje de ciertas proteínas (proteínas GPI) a la membrana celular. Las proteínas GPI tienen funciones muy diversas, y su déficit explica la práctica totalidad de las manifestaciones clínicas de la HPN. Un ejemplo de proteínas GPI son los antígenos de membrana CD55 y CD59, que inhiben la convertasa C3 y la activación de la cascada del complemento modulando la actividad lítica del complemento. Recientemente, el hallazgo de un inhibidor del complemento (eculizumab), potencialmente útil en pacientes con HPN y hemolisis intensa, ha despertado un renovado interés por esta enfermedad. Igualmente ha sido motivo de estudio la relación entre HPN e insuficiencia medular, para cuya explicación se han propuesto varias hipótesis. La más aceptada es que la existencia de mutaciones del gen PIG-A favorecería la expansión clonal de las células madre sin proteínas GPI, que predominarían sobre las células madre normales, evitando de esta forma el desarrollo de una insuficiencia medular. Según esta hipótesis, la HPN constituiría una alternativa al desarrollo de una aplasia medular, enfermedad mucho más grave. Igualmente, se postula que la expansión de la clona HPN sólo es posible cuando la mutación PIG-A coexiste con una lesión inductora de insuficiencia medular. El diagnóstico de HPN exige demostrar un déficit de antígenos de membrana en eritrocitos (CD55 y CD59), granulocitos neutrófilos (CD55 y CD24) y monocitos (CD55 y CD14) mediante citometría de flujo y anticuerpos monoclonales. Finalmente, no existe un tratamiento específico para la HPN, y éste se ha de adaptar a cada paciente. El acceso a Internet facilita hoy día la información sobre aspectos generales de la enfermedad (www.enerca.org) y registros informatizados (www.pnhregistry.com).

Mecanismos etiológicos y moleculares

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una causa de hemólisis intravascular con episodios intermitentes de hemoglobinuria, trombofilia y alteraciones de la hematopoyesis^{1,2}. Su origen reside en una mutación somática del gen fosfatidilinositol glicano clase A (PIG-A) a nivel de la célula madre pluripotente o progenitora de la hematopoyesis³, que desencadena la proliferación clonal de una línea celular con déficit del componente de membrana glicosil fosfatidilinositol (GPI). El gen PIG-A se halla situado en el cromosoma X y su función es sintetizar N-acetilglucosaminil-fosfatidilinositol (GlcNAc-PI), un intermediario de la vía metabólica que interviene en la síntesis del componente GPI⁴. El grupo GPI constituye el puente de unión entre las proteínas GPI y la membrana celular, de manera que, cuando no existe, no se puede efectuar tal unión (Figura 1). Recientemente se ha demostrado un déficit hereditario de GPI en pacientes con un síndrome de Budd-Chiari, valores muy elevados de lactatodeshidrogenasa sérica (LDH) y ausencia de hemoglobinuria que obedece a una mutación del gen PIG-M⁵.

El mecanismo íntimo de la hemólisis en la HPN reside en una activación incontrolada de la cascada del complemento en la superficie de eritrocitos como consecuencia del déficit de proteínas GPI. Entre estas proteínas destacan la DAF (*decay accelerating factor*) o CD55 y la CD59. La CD55 regula la actividad de las convertasas C3 y C5, y la CD59 inhibe la formación del complejo MAC6. Aunque las proteínas

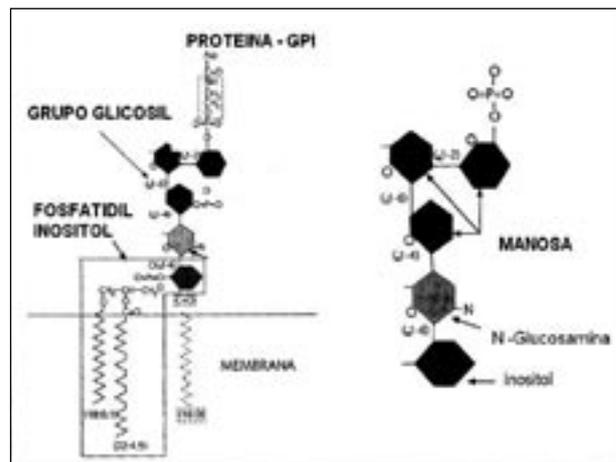


Figura 1. Mecanismo molecular del déficit de glicosil fosfatidilinositol (GPI) en la HPN. El grupo GPI consta de un fragmento glicosilado (glicosil) unido a una molécula de fosfatidilinositol que forma parte estructural de la membrana celular (bicapa lipídica). Las proteínas protectoras frente a la actividad lítica del complemento (proteínas GPI) se unen al extremo periférico del grupo glicosil. En la HPN el defecto adquirido del gen PIG-A impide la síntesis del grupo glicosil, con lo que las proteínas GPI no pueden unirse a la membrana celular.

CD55 y CD59 son hoy día las más implicadas en la fisiopatología de la HPN, existen muchas otras cuyo déficit también se halla asociado a la HPN. Entre las primeramente descritas destacan la acetil colinesterasa (AChE) eritrocitaria y la fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG). Actualmente se conocen más de veinte de estas proteínas, pero sólo las que se unen a la membrana celular mediante grupos GPI tienen importancia fisiopatológica en la HPN (Tabla 1).

Un hecho muy llamativo es que, en la sangre de pacientes con HPN, las poblaciones celulares con déficit de proteínas GPI coexisten con células normales (mosaicismo) y que estas poblaciones surgen como consecuencia de mutaciones somáticas que no se perpetúan. Debido a ello, aunque las células HPN poseen carácter clonal, no adquieren propiedades proliferativas; más bien al contrario: en algunos casos, su presencia resulta ventajosa para el paciente, ya que impide el desarrollo de una insuficiencia medular, de pronóstico mucho más grave.

La presencia de mutaciones del gen PIG-A supone un hallazgo constante en los pacientes con HPN, por lo que constituye un criterio diagnóstico de gran valor. No obstante, debido a los requerimientos tecnológicos que implica su estudio, sólo se halla al alcance de laboratorios especializados o de investigación.

La hemólisis es la característica clínica más destacada de la HPN, cuya intensidad puede variar en función del mosaicismo presente en cada paciente o fase evolutiva de la enfermedad⁷. De acuerdo con la sensibilidad a la lisis mediada por el complemento, los eritrocitos de la HPN se han clasificado en tres grupos⁸:

1. HPN-I, con sensibilidad normal o prácticamente normal.
2. HPN-II, con sensibilidad intermedia (de 3 a 5 veces superior a la normal).
3. HPN-III, con sensibilidad elevada (de 15 a 20 veces superior a la normal).

A su vez, los eritrocitos HPN III pueden dividirse en dos subgrupos -IIIa y IIIb-, de los cuales el primero es el más sensible a la lisis por complemento. El 78% de los pacientes con HPN exhiben una mezcla de células HPN I y III. En cualquier caso, las proporciones entre las células HPN I, HPN II y HPN III suelen mantenerse estables durante mucho tiempo, y sólo al inicio de la enfermedad o durante la recuperación espontánea pueden observarse variaciones en las mismas. Las células HPN III muestran, además, una mayor susceptibilidad a la lisis por el complemento C5b-9, lo que explica por qué son aún más propensas a la destrucción que las HPN II. Esta variable sensibilidad a la lisis se corresponde con diferencias cuantitativas en la expresión del DAF y el ILRM.

Si bien el déficit de proteínas GPI explica prácticamente todas las manifestaciones clínicas de la HPN,

su relación con la insuficiencia medular no es tan evidente, y probablemente implica un mecanismo más complejo y multifactorial. La teoría más aceptada es la de la patogénesis dual, según la cual la HPN sería el resultado de la coexistencia de dos factores: la insuficiencia medular y la mutación somática del gen PIG-A. Sólo cuando ambos factores coexisten en un mismo individuo, el clon HPN se haría dominante en la médula ósea y se produciría un predominio de células hematopoyéticas HPN (con déficit de proteínas GPI), causantes del desarrollo del cuadro clínico característico de la enfermedad. Por el contrario, las mutaciones aisladas del gen PIG-A no permitirían la expansión del clon HPN, con lo que la enfermedad se autolimitaría y su expresividad clínica sería mínima o prácticamente inexistente. Es de señalar que en el primer caso la expansión del clon HPN desplazaría a la hematopoyesis normal, con lo que, si bien induciría hemólisis y trombofilia, ejercería un efecto protector frente a la aplasia medular, enfermedad de la médula ósea mucho más grave que la HPN^{9,10}. Existe también otra teoría¹¹, según la cual la expansión del clon HPN dependería de factores externos, étnicos o ambientales, que de alguna forma lesionarían la médula ósea y favorecerían la expansión del clon HPN (Figura 2).

Aspectos fisiopatológicos y formas clínicas

De acuerdo con sus mecanismos fisiopatológicos, la expresividad clínica de la HPN es variable, siendo las manifestaciones más características el dolor abdominal, la disfagia y la impotencia, a las que se suele añadir un estado de letargia persistente que depende de la intensidad de la hemólisis intravascular. Ésta depende a su vez de tres factores:

1. El porcentaje de población clonal con déficit de proteínas GPI, concretamente de las proteínas reguladoras del complemento CD55 y CD59 (células HPN), que condiciona la intensidad del cuadro hemolítico, principal manifestación clínica de la HPN.
2. La ausencia del receptor celular activador del plasminógeno (uPAR) con descenso de la fibrinólisis que, acompañada de hipercoagulabilidad y activación de las plaquetas, favorece el desarrollo de fenómenos trombóticos, principal causa de morbilidad y mortalidad de la enfermedad.
3. La asociación a una lesión medular causante de insuficiencia grave de la hematopoyesis. Según el predominio e interacción de estos diferentes factores, la HPN puede presentarse bajo tres formas clínicas: a) HPN clásica; b) HPN asociada con citopenia; c) HPN subclínica (HPNsc).

Tabla 1. Proteínas GPI de mayor interés fisiopatológico en la HPN

Factor acelerador de la degradación del complemento (DAF, CD55)

Proteína que modula o controla la activación del complemento mediante unión a los fragmentos C3b o C4b y su degradación mediante activación de la convertasa C3. Su déficit produce un mayor tiempo de acción del complemento sobre la membrana celular, favoreciendo su efecto citolítico

Inhibidor de la lisis reactiva de la membrana (ILRM, CD59)

Proteína que inhibe la citolisis mediante bloqueo de la unión del complejo lítico del complemento a la membrana (C5b-9)

Receptor Fc-IIIa (CD16)

Proteína que se expresa en la superficie de los granulocitos neutrófilos y se une a la fracción Fc de la IgG. Su ausencia en la HPN puede contribuir a la susceptibilidad de estos pacientes a las infecciones

Receptor activador del plasminógeno (uPAR)

Se une con la uroquinasa activando el plasminógeno a plasmina e iniciando la fibrinolisis. Su déficit al disminuir la fibrinolisis favorece la aparición de fenómenos trombóticos

CDw52 (Campath-1)

Es una proteína que se localiza en la membrana de linfocitos, monocitos y granulocitos neutrófilos. Es responsable de la activación linfocitaria T y también del complemento, con lo que favorece la lisis de células T. f) Factor de restricción homóloga (C8bp). Proteína que actúa mediante con el C8 y protege a las células frente a la acción lítica del propio complemento. Esta acción desaparece en la HPN

HPN clásica

Consiste en un síndrome hemolítico crónico, generalmente de inicio insidioso y, casi siempre, sin esplenomegalia palpable. Suele mantenerse estabilizado durante largos periodos de tiempo o presentar crisis de agudización intensas (paroxísticas) durante el sueño (nocturnas). Con menor frecuencia, pueden aparecer también como consecuencia de situaciones de estrés diversas, como infecciones, esfuerzo físico, intervenciones quirúrgicas y otras. Las crisis de agudización suponen un agravamiento del cuadro anémico, con aparición de cefaleas, fiebre, dolores abdominales o lumbares y, prácticamente siempre, orinas oscuras (hemoglobinuria). Durante la fase crónica de la enfermedad, las pequeñas cantidades de hemoglobina que atraviesan el filtro glomerular son fijadas por las células epiteliales del túbulo, que acumulan hierro en su citoplasma bajo forma de hemosiderina. Ésta puede ser fácilmente visualizada mediante la tinción del hierro (tinción de Perls) del sedimento urinario, fenómeno conocido con el nombre de *hemosiderinuria* (Figura 3). Tan frecuente es la pérdida crónica de hemoglobina (y, por tanto, de hierro) por la orina que la HPN suele venir acompañada de un estado de ferropenia latente de gran valor para su orientación diagnóstica.

Junto a la anemia hemolítica, la HPN clásica suele incluir otras manifestaciones clínicas cuya presen-

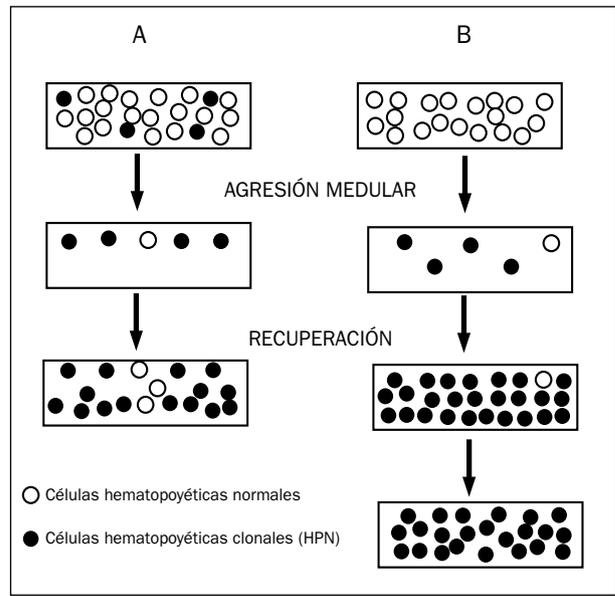


Figura 2. Esquema de las dos teorías (A y B) existentes para explicar el mecanismo etiopatogénico de la HPN y su relación con la aplasia medular. En ambos casos existiría una lesión previa de la médula ósea (MO) que induciría el desarrollo de una aplasia medular; pero mientras que, según el modelo A, la MO ya tendría células hematopoyéticas con el defecto HPN antes de la agresión, en la teoría B las células HPN aparecerían también como consecuencia de la misma. En cualquier caso, la expansión clonal ulterior de células hematopoyéticas HPN protegería frente al desarrollo de la aplasia medular, mucho más grave.

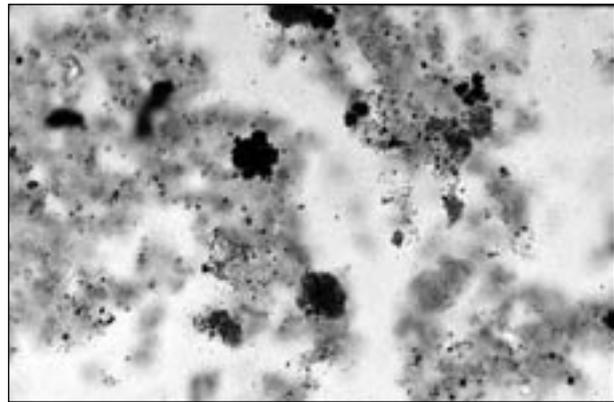


Figura 3. Imagen característica de la tinción del hierro (tinción de Perls) del sedimento urinario en un paciente con HPN. Obsérvanse los característicos aglomerados de hemosiderina procedentes del interior de las células tubulares del riñón descamadas (hemosiderinuria).

cia facilita también el diagnóstico de la enfermedad. Entre ellas destacan los fenómenos trombóticos, infecciones de repetición, hemorragias y afectación renal (Tabla 2). El tromboembolismo venoso se presenta entre el 12 y el 40% de los casos de HPN y es una de sus complicaciones más temidas, además del peor factor pronóstico¹². La mayoría de las trombosis son intraabdominales, principalmente de las ve-

Tabla 2. Manifestaciones clínicas que pueden observarse en la HPN clásica

Síndrome anémico (35%)
Hemoglobinuria (26%)
Hemorragias (18%)
Aplasia medular (13%)
Trastornos gastrointestinales (10%)
Anemia hemolítica (9%)
Ferropenia (6%)
Tromboembolismo (6%)
Infecciones (5%)
Trastornos neurológicos (5%)
Otras:
Disfagia
Odinofagia
Impotencia
Disfunción renal

nas hepática y mesentérica, siendo la más frecuente y grave la trombosis de la vena hepática o síndrome de Budd-Chiari¹³. En general, aparece coincidiendo con una crisis hemolítica y se caracteriza por dolor abdominal intenso, hepatomegalia blanda, ascitis y una marcada alteración de las pruebas hepáticas. El mecanismo de la trombofilia en la HPN se desconoce, aunque se considera multifactorial. Por un lado, se ha postulado que la hemoglobina libre del plasma, presente siempre en estos pacientes, contribuiría a la activación plaquetaria y, con ello, a la trombosis¹⁴. La acción de la hemoglobina libre sobre la función plaquetaria se atribuye a su efecto neutralizante del óxido nitroso (ON), un potente inhibidor de la agregación plaquetaria. El hiperconsumo de ON en la HPN podría ser también la causa de otras manifestaciones clínicas relacionadas con la distonía muscular (disfagia e impotencia). Otro mecanismo podría ser el propio déficit de CD59, que protege a las plaquetas contra la formación de microvesículas, lo que facilitaría la aparición de fenómenos trombóticos. Otras manifestaciones –como, por ejemplo, las infecciones– se atribuyen a defectos cuantitativos o cualitativos de linfocitos y leucocitos debido a su elevada sensibilidad a la lisis mediada por complemento y a la disminución en la expresión de proteínas GPI (FcdRIIIa, CD16 y CD55), que intervienen en la quimiotaxis y fagocitosis.

Las complicaciones hemorrágicas suelen ser una consecuencia de la intensa trombocitopenia que en ocasiones acompaña a la HPN, por lo que constituyen también una importante causa de morbilidad y mortalidad de la enfermedad¹³. Un 3%, aproximadamente, de los pacientes con HPN muestran insuficiencia renal moderada o intensa atribuible a las crisis

hemolíticas o microtrombosis de las vénulas renales. Cursa con hematuria, proteinuria, hipertensión o deterioro de la capacidad de concentración de la orina. Su recuperación es generalmente espontánea y sin secuelas.

Finalmente, es de señalar que la HPN puede aparecer también en niños y jóvenes de edad no superior a los 20 años, lo que, debido al desconocimiento que se tiene de la enfermedad (la HPN es una de las llamadas “enfermedades raras”), explica que muchas veces pase inadvertida o permanezca durante mucho tiempo sin diagnosticar o mal diagnosticada¹⁵. A ello contribuye el que a esta edad exista un predominio del síndrome hemolítico sobre la presencia de fenómenos trombóticos y que la hemoglobinuria sea una manifestación poco habitual. Con todo, un trabajo reciente realizado sobre un número significativo de pacientes con HPN juvenil señala la relativa frecuencia de aplasia de médula ósea como primera manifestación clínica de la HPN¹⁵.

HPN con citopenia

En esta forma clínica, el síndrome hemolítico es prácticamente inexistente y la HPN se caracteriza por leucopenia o trombocitopenia, también de evolución prolongada. El examen de la médula ósea muestra, en general, un patrón morfológico compatible con hipoplasia o aplasia celular o, más rara vez, mielodisplasia o mielofibrosis. Aunque –cuando existe– la hemolisis constituye un criterio clínico altamente orientativo, el patrón morfológico de la médula ósea puede desviar la atención hacia otras hemopatías, como, por ejemplo, la aplasia de médula ósea (AMO) en fase inicial, un síndrome mielodisplásico (SMD) de tipo anemia refractaria con displasia multilineal (ARDM) o una mielofibrosis de difícil catalogación. Así se ha demostrado que, a la larga, entre el 10 y el 25% de los pacientes con HPN pueden desarrollar una AMO, y que entre un 9 y un 13% de los pacientes con AMO presentan HPN como complicación tardía¹⁶. Por ello, ante la sospecha de esta forma clínica de HPN, deben realizarse todos los estudios pertinentes para confirmar o descartar su diagnóstico (Tabla 3).

HPN subclínica

En HPN subclínica (HPNsc) no hay hemolisis, y el único dato orientativo es la presencia de un porcentaje muy reducido de eritrocitos o granulocitos con déficit de proteínas GPI (CD55 o CD59). En general, constituye un fenómeno asociado a formas de insuficiencia medular grave, como la aplasia de médula ósea (AMO) o ciertos SMD con intensa anemia. La AMO

Tabla 3. Estudios imprescindibles en el diagnóstico de la HPN con citopenia

Historia clínica
Investigación de hemoglobinuria, trombofilia, disfagia, odinofagia, dolor abdominal e impotencia
Citometría de flujo
Análisis de la proporción de subpoblaciones eritrocitarias HPN (I, II y III)
Análisis del porcentaje de granulocitos neutrófilos con déficit de GPI
Bioquímica sérica
Estudio completo del hierro (ferritina, sideremia e IST)
Creatinina y pruebas de funcionalismo renal
Eritropoyetina
Orina
Hemosiderinuria
Médula ósea
Regeneración eritroblástica con signos morfológicos de diseritropoyesis

es una enfermedad estrechamente relacionada con la HPN, ya que entre un 10 y un 75% de los pacientes muestran células con déficit de proteínas GPI en sus fases iniciales. Este fenómeno, descrito como síndrome HPN/anemia aplásica, se caracteriza por una disminución *in vitro* del número y función de las células progenitoras que afecta por igual a clones celulares normales y deficientes¹⁷. Su interés clínico reside en que la presencia de una pequeña población de células HPN en pacientes con AMO mejora su respuesta al tratamiento con inmunosupresores¹⁸. La frecuente detección de clones celulares con déficit de proteínas GPI en pacientes con AMO sugiere la posible asociación de la insuficiencia medular con un mecanismo inmune, ya que en estos pacientes se ha demostrado un elevado número de linfocitos T supresores activados capaces de inducir apoptosis de las células CD34+ (células madre) y, con ello, insuficiencia medular. De acuerdo con esta hipótesis, se ha sugerido la existencia de vínculos patogénicos comunes entre AMO y HPN a través de alguna proteína GPI capaz de actuar como responsable de la agresión inmunológica de los precursores hematopoyéticos¹⁹.

El diagnóstico de las HPNsc requiere el empleo de citometría de flujo de alta sensibilidad, que permite detectar menos de un 1% de células (eritrocitos o leucocitos) con déficit de proteínas GPI (Figura 4).

Procedimientos diagnósticos

El signo guía de la HPN es la hemoglobinuria (orinas oscuras), aunque, en general, el clon de células HPN no alcanza la proporción necesaria como para

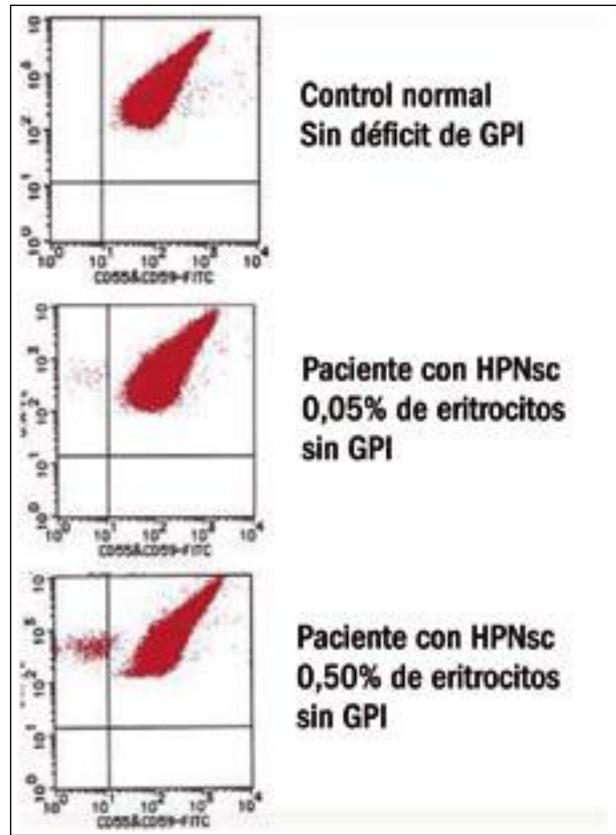


Figura 4. Análisis de proteínas-GPI mediante citometría de flujo de alta sensibilidad en un control normal y pacientes con HPN y bajo porcentaje de eritrocitos deficientes (eritrocitos-HPN). (Modificada de Blood 2005; 106: 3699.)

producir una hemolisis tan intensa capaz de colorear la orina. Por ello, un signo prácticamente constante en la HPN, y que refleja la presencia de hemolisis intravascular crónica, es la hemosiderinuria, debida a la eliminación de pequeñas cantidades de hemoglobina por el riñón que, al ser reabsorbidas por las células del túbulo, se degradan a hemosiderina (hemosiderinuria). Como se ha mencionado en el apartado anterior, la hemosiderinuria se visualiza muy fácilmente mediante tinción de Perls del sedimento urinario (Figura 3); esta técnica ha sido, durante muchos años, junto a la llamada prueba de Ham-Dacie o de la hemolisis en suero acidificado, el único arsenal diagnóstico de HPN²⁰. Aunque estas pruebas continúan siendo ampliamente utilizadas en la práctica clínica, la confirmación diagnóstica de HPN requiere siempre la demostración del déficit de proteínas GPI mediante citometría de flujo²¹. La prueba de la hemolisis en medio ácido consiste en incubar los eritrocitos del paciente a 37 °C frente al propio suero y un suero homólogo acidificados y demostrar la aparición de hemolisis. Se solía complementar con la prueba de la sacarosa, algo más sensible pero menos específica, consistente en incubar los eritrocitos en presencia de

una solución de baja fuerza iónica (sacarosa), cuyo efecto es similar al de la acidificación. Otras pruebas también utilizadas durante años en el diagnóstico de la HPN, aunque menos que las anteriores, son las *fosfatasas alcalinas granulocíticas* (FAG), que suelen hallarse disminuidas en la HPN y la *acetilcolinesterasa eritrocitaria* (AChE), que al tratarse de una proteína GPI también disminuye en la HPN.

La *citometría de flujo*, al ser un método directo, es mucho más fiable que los procedimientos antes mencionados, y su empleo permite no sólo detectar la presencia de células con déficit de GPI, sino también cuantificarlas. La proteína GPI de mayor resolución en eritrocitos es la CD59, y según la intensidad de su disminución en la HPN éstos se clasifican en tres grupos: de tipo III (déficit total), de tipo II (déficit parcial con un 10%, aproximadamente, de expresividad) y de tipo I (sin déficit o eritrocitos normales). El conocimiento de estas diferentes subpoblaciones de eritrocitos HPN es muy útil para valorar el cuadro anémico en estos pacientes, excepto cuando son sometidos a transfusiones frecuentes. En este caso, el procedimiento más fiable es el análisis de los antígenos directamente a partir de leucocitos (neutrófilos y monocitos), ya que, además de salvar los inconvenientes derivados de las transfusiones, facilita el seguimiento de la evolución del proceso basándose en la cuantificación periódica del número de células HPN en el curso de la enfermedad. Para los leucocitos, los antígenos con mayor poder de resolución son el CD55 y CD24 (granulocitos neutrófilos) y el CD14 y CD55 (monocitos)^{20,21}. En general, un perfil citométrico simple suele ser suficiente para detectar con precisión hasta un 3% de células con déficit de proteínas GPI, pero es sabido que la hemolisis no aparece hasta que el porcentaje de células deficitarias supera el 10% del total de la población. Muchos de estos casos son pacientes portadores de diferentes formas de insuficiencia medular, en los que resulta especialmente interesante detectar la presencia de clones HPN, ya que ello comporta implicaciones pronósticas¹⁷. Por ello, tal y como ya se ha mencionado anteriormente, tanto para la detección inicial de HPN como para el seguimiento evolutivo de la enfermedad, es necesario emplear citometría de flujo de alta sensibilidad.

Opciones terapéuticas

El tratamiento básico de la HPN es el soporte transfusional, siempre que sea imprescindible, y el tratamiento de las complicaciones trombóticas. La única estrategia curativa en la HPN es el trasplante alogénico de médula ósea (TMO), aunque presenta aún un elevado riesgo, por lo que sólo es aconsejable en ca-

sos muy concretos, como, por ejemplo, la existencia de un donante singénico o de complicaciones muy graves, como la aplasia de médula ósea. No debe olvidarse que un 15% de los pacientes con HPN pueden presentar remisión espontánea de su enfermedad, ni que en la mayoría de los casos la aplasia de médula ósea responde al tratamiento inmunosupresor con ciclosporina o globulina antitumócica (ATG). El abordaje terapéutico de la HPN es triple:

- a) Tratamiento de la anemia.
- b) Tratamiento de la trombosis.
- c) Estimulo de la hematopoyesis.

Tratamiento de la anemia

Siendo la hemolisis el resultado de la activación del complemento, la administración de glucocorticoides a dosis de 1 mg/kg/día constituye el tratamiento de elección tanto para su prevención como tratamiento. No debe olvidarse que en la HPN la anemia es hemolítica y que, por tanto, es muy recomendable la administración preventiva de ácido fólico. Más discutible es la administración de hierro para el tratamiento del estado de ferropenia secundario a la pérdida crónica de hierro por la orina (hemosiderinuria), ya que puede inducir a la aparición de crisis de hemolisis por citolisis reticulocitaria¹. Este fenómeno puede prevenirse administrando dosis elevadas de prednisona simultáneamente con el hierro al inicio del tratamiento.

Tratamiento de la trombosis

La aparición de fenómenos trombóticos son siempre de carácter agudo, y por ello deben ser tratados con carácter urgente mediante administración de agentes trombolíticos, como la estreptoquinasa, la uroquinasa y el activador tisular del plasminógeno²². Asimismo, durante la trombosis aguda, el paciente debe recibir heparina de la forma habitual bajo control riguroso y periódico del estado de la coagulación. Una vez superada la fase aguda, los pacientes deben ser sometidos a tratamiento cumarínico durante un mínimo de 6 meses, aunque actualmente se recomienda que esta administración sea permanente.

Estímulo de la hematopoyesis

El tratamiento de la insuficiencia medular es un proceso complejo y depende de diversas circunstancias acompañantes. En principio se ha empleado la administra-

ción de andrógenos, citocinas recombinantes y globulina antitumoral. Los andrógenos son efectivos en sólo un pequeño porcentaje de pacientes y su efecto es limitado. Entre los compuestos más utilizados destacan el danazol, la fluoximesterona y la oximetolona.

Las *citocinas recombinantes*, como la eritropoyetina y el factor estimulador de colonias granulocíticas (CSF-G), son en general poco efectivas y difíciles de administrar.

La *globulina antitumoral* (GAT) se administra en base al papel que muy probablemente desempeñan los linfocitos T en la patogenia de la insuficiencia medular. Diversos estudios demuestran que la administración de GAT puede corregir la citopenia en un 70% de los casos, principalmente la trombocitopenia. En casos extremadamente graves puede plantearse el *trasplante de médula ósea* (TMO), pero este tipo de tratamiento, en la HPN, es poco aconsejable, porque los riesgos de complicaciones graves superan con creces los beneficios que pueden obtenerse con este tratamiento.

Nuevos agentes terapéuticos

Una alternativa terapéutica en la HPN es la administración de sustancias protectoras de la membrana celular frente a la acción clínica del complemento, como, por ejemplo, CD59 nativa o recombinante²³. Recientemente se ha descrito el uso de sustitutos artificiales de proteínas GPI, como el gliolípido prodaprina, que une el CD59 a la membrana celular²⁴. Finalmente, otro agente terapéutico prometedor para disminuir la sintomatología de la HPN es el eculizumab (Soliris™, Alexion Pharmaceuticals), consistente en un anticuerpo monoclonal que inhibe, de manera específica, el desarrollo de la cascada del complemento y evita la proteólisis de la fracción C5²⁵.

Directrices futuras

La HPN tiene aún muchos aspectos que o bien se desconocen o se conocen parcialmente. Por ello, todos cuantos trabajan en el campo de las anemias raras o poco comunes tienen la obligación de continuar profundizando en el estudio de esta enfermedad.

En lo que se refiere a los aspectos etiológicos, es muy importante profundizar en: a) el mecanismo fisiopatológico de la trombofilia y muy especialmente el de su peculiar localización hepática, mesentérica, cerebral y cutánea; b) las bases de la relación entre HPN e insuficiencia medular (aplasia medular y SMD de tipo anemia refractaria, principalmente) y de la se-

lección clonal de células HPN+ en las diferentes formas clínicas de HPN (clásica, con citopenia y subclínica); y c) las bases de la expansión clonal de células hematopoyéticas HPN+ en caso de lesión medular y su relación con las mutaciones del gen *PIG-A*.

En lo que se refiere a los aspectos clínicos, es muy importante conocer: a) si la administración de inhibidores del complemento (eculizumab) puede tener algún efecto sobre la trombofilia en la HPN; b) disponer de recomendaciones o guías basadas en estudios aleatorizados sobre prevención y tratamiento de la trombofilia; c) conocer el riesgo fetal y materno que comporta el embarazo en pacientes con HPN, así como la correspondiente conducta terapéutica; d) analizar en profundidad los factores étnicos y geográficos que pueden favorecer la aparición de la HPN y, en caso necesario, elaborar guías o recomendaciones para su prevención y tratamiento; y e) profundizar en el estudio de la historia natural de las formas de HPN con citopenia o subclínicas.

Finalmente, en lo que se refiere a los aspectos epidemiológicos es muy importante profundizar en el conocimiento de su prevalencia real en los diferentes países de la Unión Europea (UE). De hecho, la HPN pertenece al grupo de las llamadas “enfermedades raras”, definidas por la Comisión Europea como todas aquellas enfermedades cuya prevalencia en la población es inferior a 5 casos por cada 10.000 nacimientos. Esta escasa prevalencia explica el poco conocimiento que se tiene de la HPN y lo difícil que muchas veces resulta su diagnóstico. Esta limitación viene impuesta por las diferencias sanitarias existentes entre los diferentes Estados de la Unión Europea, lo que hace muy necesario aunar esfuerzos para crear redes internacionales –en nuestro caso europeas– que difundan el conocimiento de estas enfermedades y faciliten la identificación de expertos capaces de atender a este colectivo de pacientes en todos los aspectos posibles (diagnósticos, manejo clínico y terapéutico). En el campo de las anemias, recientemente se ha creado una red europea para el estudio de aquellas con escasa prevalencia o “raras”, que se conoce como ENERCA (*European Network for Rare and Congenital Anaemias*). La red ENERCA engloba todas aquellas enfermedades “raras” cuya manifestación clínica fundamental es la anemia, es decir, todos aquellos defectos congénitos o adquiridos de los eritrocitos y de la eritropoyesis que cursan con anemia. ENERCA dispone de una página web (www.enerca.org) donde pueden realizarse consultas y recogerse datos epidemiológicos para la creación de un futuro registro europeo de anemias raras. Su desarrollo, con inclusión del mayor número posible de expertos europeos, permitirá no sólo un mejor conocimiento de esta patología, sino también la posibilidad de prestar una mejor asistencia a los enfermos que la padecen.

Bibliografía

- Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. En: Hoffman R, Benz EJ, Shatill SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein E, McGlave P. Hematology: Basic principles and practice. 3.^a edición. USD: Churchill Livingstone; 2000. pp. 331-42.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653-62.
- Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993; 73: 703-11.
- Rosse NW, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 86: 3277-86.
- Almeida AM, Murakami Y, Layton DM, Hillmen P, Sellick GS, Maeda Y, Richards S, Patterson S, Kotsianidis, I, Mollica L, Crawford DH, Baker A, Ferguson M, Roberts I, Houlston R, Kinoshita T, Karadimitris A. Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nature Medicine* 2006; 12: 846-51.
- Wilcox LA, Ezzell JL, Bemshaw NJ, et al. Molecular basis for the enhanced susceptibility of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to hemolysis in acidified serum. *Blood* 1991; 78: 820-9.
- Luzzatto L, Nafa K. Genetics of PNH. En: Young NS, Moss J (eds.). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the glycosylphosphatidylinositol-linked proteins. San Diego: Academic Press; 2000: 21-47.
- Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2000; 18: 82-7.
- Richard-Lee G. Hemoglobinuria paroxística nocturna. En: Wintrobe M. Hematología Clínica. 9.^a edición. Inter-Médicos S.A.I.C.L.; 1994. pp. 1072-83.
- Luzzatto L, Bessler M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996; 3: 101-10.
- Rosti V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2000; 85: 82-9.
- Ray JG, Burrows RF, Ginsberg JS, Burrows EA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis. Review in nonpregnant patient. *Haemostasis* 2000; 30: 103-17.
- Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253-8.
- Olsen SB, Tang DB, Jackson MR, Gómez ER, Ayala B, Alving BM. Enhancement of platelet deposition by crosslinked hemoglobin in a rat carotid endarterectomy model. *Circulation* 1996; 93: 327-32.
- Van den Heuvel-Eibrink MM, Bredius RG, Te Winkel ML, et al. Childhood paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH), a report of 11 cases in the Netherlands. *Br J Haematol* 2005; 128: 571-7.
- Young NS. Acquired aplastic anemia. *JAMA* 1999; 282: 271-8.
- Machín S, Svarch E, Dorticós E. Aplasia medular. Actualización. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999; 15: 79-90.
- Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002; 100: 3897-902.
- Meletis J, Terpos E. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical presentation and association with other haematological disorders. *Haema* 2001; 4: 79-88.
- Vives Corrons JL, Aguilar i Bascompte JL. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3.^a edición. Madrid: Elsevier; 2006.
- Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42: 223-33.
- McMullin MF, Hillmen P, Jackson J. Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Intern Med* 1994; 235: 85-7.
- Rother RP, Rollins SA, Mennone J, Chodera A, Fidel SA, Bessler M, Hillmen P, Squinto SP. Expression of recombinant transmembrane CD59 in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria B cells confers resistance to human complement. *Blood* 1994; 84: 2604-11.
- Hill A, Ridley SH, Esser D, Oldroyd RG, Cullen MJ, Karelac P, Gallagher S, Smith GP, Richards SJ, White J, Smith RA, Hillmen P. Protection of erythrocytes from human complement-mediated lysis by membrane-targeted recombinant soluble CD59: a new approach to PNH therapy. *Blood* 2006; 107: 2131-7.
- Thomas TC, Rollins SA, Rother RP, Giannoni MA, Hartman SL, Elliott EA, Nye SH, Matis LA, Squinto SP, Evans MJ. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Molecular Immunology* 1996; 33: 1389-401.

DIAGNÓSTICO DE HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA Y TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES MÁS FRECUENTES

M.^aB. VIDRIALES^{1,2}, P. HERNÁNDEZ-CAMPO³, J. ALMEIDA^{2,3}, M.^aL. SÁNCHEZ³, J.F. SAN MIGUEL^{1,2}, A. ORFAO^{2,3}

¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. ²Centro de Investigación del Cáncer (CIC). Salamanca. ³Servicio General de Citometría. Universidad de Salamanca

Introducción

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad adquirida y clonal de la célula *stem* hematopoyética en cuyo gen PIG-A, localizado en el cromosoma X1a, se han producido mutaciones somáticas^{1,2}. Este gen codifica una proteína que participa en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI), necesario para el anclaje de diferentes proteínas a la membrana celular, que se han denominado *glycosilfosfatidilinositol-anchorage proteins* (GPI-AP). Como consecuencia, la progenie de esta célula *stem* es deficitaria en proteínas que emplean el GPI como molécula de anclaje (Tabla 1). El déficit de proteínas de la membrana del hematíe como CD55 (*decaying accelerating factor* [DAF]), el CD59 (inhibidor de la lisis reactiva de membrana-MIRL), o el C8bp (C8 *binding protein*) condiciona una sensibilidad anormal de los hematíes al complemento, causando hemolisis intravascular, que es considerada

Tabla 1. Moléculas que emplean el GPI como anclaje a la membrana celular

Molécula	Distribución
CD14*	Monocitos
CD16*	Neutrófilos
CD24*	Linfocitos B, neutrófilos
CD48*	Panleucocitario
CD52*	Panleucocitario
CD55*	Panleucocitario, hematíes, plaquetas
CD58	Panleucocitario, hematíes, plaquetas
CD59*	Panleucocitario, hematíes, plaquetas
CD66*	Neutrófilos, monocitos
CD75	Linfocitos T y B
CD87	Neutrófilos, monocitos, linfocitos T activados
CD90	Progenitores hematopoyéticos
CD108	Linfocitos T activados
CD109	Linfocitos T activados, plaquetas
CD157	Neutrófilos, monocitos

*Moléculas más empleadas en el diagnóstico de HPN mediante CMF.

como la manifestación principal de la enfermedad. La HPN aparece con frecuencia asociada a fallo medular, especialmente anemia aplásica, y la principal causa de morbimortalidad son los fenómenos trombóticos^{1,2}.

La HPN fue descrita por primera vez en Londres en 1866 por William W. Gull, que publicó una detallada descripción clínica de un paciente con hemoglobinuria intermitente, reconociendo que el pigmento de la orina provenía de la sangre³. Casi simultáneamente, P. Strübing en Alemania describió un caso similar, y sugirió que la causa era una anomalía en las células rojas. En 1911, Van der Bergh demostró la lisis de los hematíes en presencia de suero, lo que condujo a la descripción del test de Ham⁴, prueba diagnóstica de hemólisis en suero acidificado, que fue desarrollado casi simultáneamente por Thomas H. Ham, John V. Dacie y F. L. J. Jordan, y que ha constituido la principal herramienta diagnóstica de la enfermedad durante más de sesenta años. Otros tests diagnósticos dependientes de complemento que se desarrollaron más tarde fueron la lisis con sacarosa de Hartmann y la lisis por sensibilidad al complemento (CLS), descrita por Rosse y Dacie en 1966⁵. La naturaleza clonal de la HPN se demostró en los años sesenta por Dameshek, confirmándose posteriormente en los estudios de por Luzzatto en 1970, al demostrar que los glóbulos rojos afectados de mujeres heterocigotas para la enzima G6PD sólo tenían una de las dos variantes. En 1977 Low y Finean demostraron la existencia del glicosilfosfatidilinositol (GPI) como molécula de anclaje de proteínas, y en 1986 se demostró que el DAF (CD55) era una proteína GPI. Ya en 1993, Kinoshita *et al.* identificaron el defecto genético en el gen PIG-A que es el causante de la enfermedad⁶. En la actualidad

la técnica diagnóstica con un mayor nivel de sensibilidad y especificidad en la identificación de poblaciones HPN es el análisis de proteínas GPI-AP mediante citometría de flujo^{1,2,8}.

La HPN es una enfermedad que se presenta en una gran variedad de manifestaciones clínicas y evolutivas, por lo que se ha propuesto una clasificación diagnóstica en tres categorías^{1,2}: HPN clásica (pacientes con hemólisis intravascular, sin evidencia de fallo medular ni alteraciones citogenéticas), HPN en el contexto clínico de otras enfermedades de la médula ósea (hemólisis asociada a anemia aplásica, síndromes mielodisplásicos u otras mielopatías) y HPN subclínica (pacientes sin evidencia de hemólisis pero con pequeñas subpoblaciones HPN).

En una gran mayoría de pacientes es posible identificar la coexistencia de distintas poblaciones de hematíes que presentan diferente sensibilidad al complemento, y que se clasifican en función de la cantidad de proteínas GPI-AP (principalmente de CD59) que poseen en su membrana: hematíes de tipo I o células normales, hematíes HPN de tipo II, con ausencia parcial de CD59 y hematíes HPN de tipo III, con ausencia completa de CD59. Este mosaicismo fenotípico es consecuencia del mosaicismo genotípico, ya que diferentes mutaciones PIG-A contribuyen de forma distinta a la hematopoyesis del paciente^{2,9}.

Diagnóstico

El diagnóstico de la HPN puede basarse en análisis bioquímicos^{1,2,4,5} (debido a la elevada sensibilidad de los hematíes a la lisis mediada por complemento), análisis mediante citometría de flujo^{1,2,8} (que demuestra el fenotipo de las células que carecen de GPI-AP) y análisis moleculares^{1,2,6,7} (mediante secuenciación e identificación de mutaciones en el gen PIG-A), que no son aplicables en los laboratorios de rutina.

Los métodos bioquímicos se basan en la prueba de la hemólisis en suero acidificado (test de Ham/Dacie). Los hematíes del paciente se incuban a 37 °C con el suero acidificado del propio paciente y con un suero normal, también acidificado. Los eritrocitos del paciente se lisan tanto con el propio suero como con el suero normal, debido a la activación del complemento que produce la acidificación. Esta prueba es también positiva en la diseritropoyesis congénita de tipo II o HEM-PAS; pero, a diferencia de la HPN, en esta enfermedad no se produce hemólisis en presencia del suero propio. En el test de la sacarosa, ésta ejerce el mismo efecto que la acidificación, y es una prueba más sensible aunque menos específica. Aunque en la actualidad apenas se usan, estas pruebas han tenido una gran importancia histórica en el diagnóstico de HPN, y se siguen em-

pleando en centros que carecen de técnicas basadas en citometría de flujo. Son técnicas laboriosas y de difícil estandarización; el análisis se puede realizar sólo sobre poblaciones de hematíes, y tienen baja sensibilidad, ya que requieren la presencia de al menos un 5-10% de hematíes de tipo III para que den resultados positivos.

En la actualidad y desde los años noventa, el método de elección para el diagnóstico de HPN es el estudio de la expresión de proteínas GPI-AP mediante citometría de flujo (CMF), que demuestra una relación directa entre la alteración genética (mutaciones en PIG-A) y el fenotipo HPN (déficit de proteínas GPI-AP). Una ventaja es que todas las células hematopoyéticas son susceptibles de ser analizadas, no sólo los hematíes como ocurre con las pruebas bioquímicas. Los resultados pueden obtenerse rápidamente, en menos de una hora, y es una técnica de gran especificidad y sensibilidad, ya que se pueden identificar fácilmente subpoblaciones HPN que suponen menos del 1% de la celularidad global. Además, permite la discriminación entre células normales (tipo I), con deficiencia parcial (tipo II) y con deficiencia completa (tipo III) de GPI, y es de gran utilidad en la monitorización clínica de la respuesta al tratamiento, ya que permite la cuantificación del clon HPN durante el seguimiento^{10,11}.

El diagnóstico de la HPN mediante CMF se basa en el análisis del defecto molecular fundamentalmente en hematíes y leucocitos, cuantificando la presencia de proteínas que emplean el GPI para unirse a la membrana (Tabla 1). El análisis de los hematíes tiene la ventaja de que puede realizarse hasta 2 semanas tras la extracción si la muestra se mantiene a 4 °C, mientras que para el análisis de los leucocitos es recomendable la realización de la técnica durante las primeras 24 horas. Aunque también se puede analizar el defecto molecular en las plaquetas, este análisis es menos utilizado en los laboratorios clínicos de rutina.

Para el análisis de los hematíes se recomienda el estudio de al menos dos GPI-AP, CD55 y CD59, para obtener mayor fiabilidad diagnóstica. Aunque se ha descrito que el marcaje múltiple de hematíes puede ocasionar agregación de los mismos, en nuestra experiencia esto no es un inconveniente real; por el contrario, facilita mucho la identificación de subpoblaciones HPN minoritarias, al permitir una mejor selección de los elementos celulares y eliminar ruido de fondo y las plaquetas. Es el CD59 el que permite definir mejor las poblaciones de hematíes HPN I, II y III. Los pacientes con manifestaciones hemolíticas presentan mayores cantidades de hematíes HPN de tipo III, mientras que los pacientes con anemia aplásica suelen presentar poblaciones minoritarias. Además, hay que tener en cuenta que las transfusiones pueden alterar las proporciones de los clones HPN.

Para el análisis de los leucocitos se pueden estudiar diferentes moléculas (Tabla 1), y en este caso es im-

prescindible el marcaje múltiple, que permite demostrar el déficit simultáneo de distintas GPI-AP. Para obtener resultados fiables se deben seleccionar AcMo dirigidos frente a GPI-AP que se expresen intensamente en células normales, que estén presentes específicamente en una línea celular, que tengan poca afinidad por uniones no específicas y que puedan combinarse en marcajes múltiples. Además, la adquisición de un gran número de leucocitos o el empleo de ventanas específicas de adquisición en el citómetro de flujo facilitan la identificación de subpoblaciones HPN que pudieran estar presentes en la muestra en pequeñas cantidades^{1,10,12}.

La mayoría de los laboratorios clínicos estudian por separado hematíes y leucocitos, ya que las condiciones de adquisición de ambas poblaciones en el citómetro de flujo son diferentes. Sin embargo, se ha demostrado que es posible emplear una única combinación de AcMo que marque GPI-AP tanto en hematíes como en leucocitos mediante técnica de marcaje sin lisis posterior, con una doble adquisición de la muestra en el citómetro de flujo, adaptando las condiciones de adquisición en primer lugar para los hematíes y en segundo lugar para los leucocitos¹³. En estos casos es muy importante que la cantidad de muestra y la cantidad de AcMo que se emplean sea adecuada, ya que éstos deben estar en condiciones de saturar las moléculas frente a las que van dirigidos tanto en los hematíes como en los leucocitos. Por ello, el estudio de moléculas como CD55, CD59 o CD58 en poblaciones leucocitarias se debe realizar tras el lisado de hematíes.

Recientemente, se ha demostrado que las GPI-AP actúan como receptores de la aerolisina, una toxina bacteriana procedente de la *Aeromonas hydrophila*. La deficiencia de las GPI en las células HPN les confiere resistencia a la lisis inducida por esta toxina. En base a este hecho se ha desarrollado un nuevo método diagnóstico mediante citometría de flujo, que emplea una variante no hemolítica de la aerolisina marcada con fluoresceína (FLAER: *FLuorescent AERolysin*) para la identificación de células HPN¹⁴. El marcaje con FLAER tiene gran sensibilidad, ya que permite la identificación de células HPN en proporciones de hasta 0,5%, y es además altamente específico, ya que reconoce el GPI. Además, se ha sugerido que proporciona una estimación más exacta del clon HPN presente en la muestra y que resulta una técnica más sencilla de realizar y fácilmente estandarizable.

Otras pruebas que contribuyen a la sospecha diagnóstica de la HPN son la demostración de anemia macrocítica, a veces intensa, con reticulocitosis inferior a la observada en otras anemias hemolíticas. Sin embargo, en muchas ocasiones puede asociarse un déficit de hierro, por lo que también se presentaría como anemia microcítica hipocrómica, ferropenia y ausencia de reticulocitosis. La fosfatasa alcalina leucocitaria está dismi-

nuida o ausente, y puede existir neutropenia y trombopenia. La orina presenta un color característico debido a la presencia de hemoglobinuria, aunque la hemosiderinuria es el hallazgo más frecuente. La médula ósea muestra hiperplasia eritroide, con frecuente ausencia de hierro con la tinción de Perls. Además, es muy importante realizar estudios citogenéticos que descarten la presencia de alteraciones cariotípicas.

Tratamiento de las complicaciones más frecuentes

La anemia y los fenómenos trombóticos son las complicaciones más frecuentemente observadas en la HPN.

Los fenómenos trombóticos son la principal causa de morbimortalidad, aparecen en hasta el 40% de los casos durante el curso de la enfermedad^{15,16} y constituyen la causa de muerte en un tercio de los pacientes. Las localizaciones más frecuentes son las venas intraabdominales y las cerebrales. El diagnóstico en ocasiones es difícil, y signos o síntomas como dolor abdominal persistente, ganancia de peso y ascitis, esplenomegalia (trombosis intraabdominales), cefaleas persistentes (trombosis cerebrales), diarrea sanguinolenta o lesiones dérmicas migratorias dolorosas (trombosis de pequeños vasos) deben hacer sospechar la existencia de complicaciones trombóticas. El tratamiento antitrombótico precoz es crítico, especialmente en el caso de trombosis cerebrales y venas de gran calibre, como las suprahepáticas o la porta. Si se realiza un diagnóstico precoz se debe considerar la canalización de la vena afectada y el empleo de agentes trombolíticos directos, con lo que se pueden obtener buenos resultados. Posteriormente se debe mantener anticoagulación a largo plazo, aunque no existe acuerdo en si se debe mantener de por vida debido a la ausencia de estudios prospectivos y aleatorizados. En los últimos años se ha demostrado que la proporción del clon HPN es el factor pronóstico más importante para evaluar el riesgo trombótico¹⁷, por lo que algunos autores proponen el empleo de profilaxis con anticoagulantes orales en los pacientes con más del 50% de granulocitos HPN¹⁸. Un aspecto importante en el manejo diario de estos pacientes es que la asociación de otros factores como la trombocitopenia o la disminución de la ingesta durante las crisis hemolíticas, que dificulta mantener el rango adecuado de INR, aumenta la complejidad del control de la anticoagulación.

La anemia de la HPN es crónica, con exacerbaciones de hemólisis que pueden reducir notablemente los niveles de hemoglobina. Además, también pueden condicionar la intensidad de la anemia, tanto la existencia de ferropenia, debido a pérdidas urinarias, como el grado de déficit de eritropoyesis en la médula ósea. Es

recomendable la administración diaria de de ácido fólico y el control de los niveles de hierro, indicándose la administración de hierro si la saturación de la transferrina es menor del 20%^{1,10,16}. Cuando los niveles de hierro están corregidos, es importante conocer la Hb. Debido a las diferencias entre individuos en cuanto a la tolerancia ante la anemia, la indicación de la transfusión debe hacerse de forma individualizada, teniendo en cuenta los datos analíticos, la existencia e intensidad del síndrome anémico y la calidad de vida. Las necesidades transfusionales pueden variar mucho entre pacientes con niveles similares de Hb, e incluso en el mismo paciente a lo largo de su evolución. En la actualidad ya no se recomienda transfundir con hematíes lavados, al haberse demostrado que el empleo de filtros de leucocitos es suficiente. Sí es recomendable transfundir productos irradiados en los pacientes que puedan ser potencialmente candidatos a trasplante alogénico. En los casos en los que la aplasia medular contribuye más que la hemólisis al desarrollo de anemia, se puede producir una sobrecarga de hierro que precise tratamiento con quelantes. Se ha empleado eritropoyetina en pacientes con HPN, pero los resultados no han sido satisfactorios, probablemente debido a que sus niveles basales suelen estar muy altos. Aunque este tratamiento no se ha demostrado eficaz en la gran mayoría de los pacientes, puede estar indicado en algunos casos¹⁹.

Bibliografía

1. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socie G; International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699-709.
2. Parker CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007; 35: 523-33.
3. Rose W. A Brief history of PNH. En: Young NS, Moss J (eds.). *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the GPI-linked proteins*. New York: Academic Press; 2000. p. 1-20.
4. Ham TH. Chronic haemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A study of the mechanism of hemolysis in relation to acid-base equilibrium. *New Engl J Med* 1937; 217: 915-8.
5. Rosse WF, Dacie JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. II. The role of complement components in the increased sensitivity of PNH red cells to immune lysis. *J Clin Invest* 1966; 45: 749-57.
6. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993; 73: 703-11.
7. Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 86: 3277-86.
8. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 5332-40.

9. Rollinson S, Richards S, Norfolk D, Bibi K, Morgan G, Hillmen P. Both paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) type II cells and PNH type III cells can arise from different point mutations involving the same codon of the PIG-A gene. *Blood* 1997; 89: 3069-71.
10. Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2007 Jun 4; [Epub ahead of print]
11. Hernández-Campo PM, Almeida J, Sánchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70: 71-81.
12. Orfao A, Hernández-Campo PM, Almeida J, Jara M, Sánchez ML, Alberca I, Vidrales MB, Martínez E, Romero JR. Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: identification of diagnostically useful flow cytometry strategy and correlation with PIG-A gene abnormalities. (Manuscrito enviado para publicación.)
13. Hernández-Campo PM, Martín-Ayuso M, Almeida J, López A, Orfao A. Comparative analysis of different flow cytometry-based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 and CD55 expression on major peripheral blood cell subsets. *Cytometry* 2002; 50: 191-201.
14. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 459-66.
15. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253-8.
16. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007; 137: 181-92.
17. Moyo VM, Mukhina GL, Garret ES et al. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*, 2004; 126: 133-8.
18. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*, 2003; 102: 3587-91.
19. Hill A, Richards SJ, Rother RE, Hillmen P. Erythropoietin treatment during complement inhibition with eculizumab in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 2007; 92(3 Suppl): ECR14.

entations may include severe hemolysis, thrombotic events, or bone marrow failure. Frequently, PNH clones are detected in patients with aplastic anemia or with myelodysplastic syndromes (MDS). More than 20 genes have been identified as being possibly involved in a lack of GPI-anchored cell surface proteins, a hallmark of PNH. There is also evidence that such a deficiency may occur in healthy individuals, possibly related to transcriptional repression. Dependent upon the severity of the manifestations and the size of the PNH clone, no treatment may be necessary. For patients with severe hemolysis, a monoclonal antibody that interferes with complement activation has recently become available. The generally accepted indications for hematopoietic cell transplantation (HCT) are in patients who present with bone marrow failure. It is a matter of controversy whether patients without marrow failure but life-threatening vascular complications or hemolysis should also be considered for transplantation. In the latter case, the bone marrow may not be hypo- or aplastic. Historically, the approach to HCT in patients with PNH has followed the strategy used for aplastic anemia, i.e. conditioning of the patient with cyclophosphamide (CY)-containing regimens, possibly in combination with anti-thymocyte globulin (ATG). More recently, and in patients with cellular marrows, busulfan (BU) has often been incorporated in the conditioning regimen. Results with HLA-identical sibling donors have been encouraging, with survival probabilities in the range of 50% (in patients with hemolytic/thrombotic presentation) to 100% in patients presenting with marrow aplasia. The prognosis has been inferior for patients transplanted from HLA-matched unrelated donors, with survival figures in the range of 30-50%. Graft failure, pulmonary complications, GVHD and infections have been the major causes of death. There is evidence that the use of reduced-intensity conditioning regimens, for example, a combination of fludarabine, 90 mg/m², and TBI, 200 cGy, may be associated with less toxicity. In one report describing seven patients, five of whom were transplanted from unrelated donors following this conditioning regimen, four are surviving with complete donor chimerism, while three died from various complications. Since non-clonal cells can be enriched from patients with PNH, it has been suggested that autologous marrow reconstitution following ablation of the clone should be possible. Thus, HCT is effective therapy for patients with PNH, particularly those who present with marrow failure, but can also be successful in patients who present with a cellular marrow, although the success rate tends to be lower. For patients with predominant hemolytic presentations, treatment with monoclonal antibody can be effective, albeit expensive therapy. Cost/benefit aspects may have to be included in treatment decisions as well.

TRANSPLANTATION FOR PNH: INDICATIONS, STRATEGIES AND RESULTS

H. JOACHIM DEEG

*Fred Hutchinson Cancer Research.
Center and the University of Washington.
School of Medicine. Seattle, WA (USA)*

Introduction

PNH is an acquired clonal disorder of hematopoiesis which generally occurs in adult life. Clinical pres-

NEW TREATMENTS FOR PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA

L. LUZZATTO

Department of Haematology. University of Firenze and Istituto Toscano Tumori. Firenze (Italy)

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a chronic disease characterized by the clinical triad of hemolytic anemia, thrombosis and cytopenias¹. A unique feature of PNH is the presence of a population of blood cells that, being deficient in surface proteins tethered to the membrane through a glycosylphosphatidylinositol molecule (GPI-linked proteins), are said to have the PNH phenotype^{2,3}. This peculiar cell population originates through clonal expansion of a hematopoietic stem cell harboring a somatic mutation in the X-linked gene PIG-A^{4,5}. Since two GPI-linked proteins, CD55 and CD59, are natural regulators of complement on the surface of cells^{6,7}, their deficiency on PNH red cells is responsible for one of the most characteristic clinical features of PNH: i.e., paroxysms of intravascular haemolysis, that are triggered when complement is abruptly activated (for instance, by an antigen-antibody reaction in the course of infection). Several GPI-linked proteins are deficient also on granulocytes and on blood cells belonging to other lineages, including platelets⁸: this, directly or indirectly, must be at the basis of the thrombotic complications.

Long-term longitudinal studies^{9,10} of patients with PNH have clearly shown that often PNH follows aplastic anemia (AA), whether mild or severe; and less commonly PNH can evolve to AA. These and other data strongly suggest that an element of bone marrow failure is always present in PNH¹¹; but in many cases it is masked by the florid hematopoietic activity contributed by the PNH clone(s). This has led to the notion that PNH as a clinical disease only emerges if a PNH clone expands¹²: and this notion is supported by relatively recent evidence that blood cells with PIG-A mutation are present even in healthy individuals^{13,14}. To provide an explanation of the multiple features of PNH, a currently widely accepted model is that the PNH clones have a selective survival/growth advantage when they find themselves in an environment where normal hematopoietic stem cells are suffering a T cell-mediated auto immune attack¹⁵. Qualitative abnormalities of T lymphocytes expressing on their surface molecules that are members of the inhibitory receptor superfamily (IRS) including killer immunoglobulin-like receptor (KIR) have been reported: specifically, in PNH patients there is a marked increase, compare to healthy individuals, of T cells bearing activating isoforms of IRS¹⁶. Recently, by a systematic analysis of TCR-beta

clonotypes of the CD8+CD57+ T-cell population, we have demonstrated in PNH patients recurrent clonotypes that are not present in healthy controls¹⁷. The existence of T-cell clones bearing a set of highly homologous TCR-beta molecules in most patients with hemolytic PNH is consistent with an immune process driven by the same (or similar) antigen(s): probably a non-peptide antigen, because patients sharing clonotypes do not all share identical HLA alleles. Thus, the expansion of PNH clone(s) is probably the result of (i) damage to normal hematopoietic stem cells and (ii) the sparing of PNH hematopoietic stem cells.

The contemporary management of PNH must be grounded on our current understanding of pathogenesis and pathophysiology; and it may be useful to discuss it under four headings.

Supportive treatment. The mainstay, for a considerable proportion of patients with PNH, is the judicious use of blood transfusion, which can do a lot to improve the quality of life. Folic acid is always indicated; and iron is indicated whenever there is evidence of iron deficiency based on low transferrin saturation. Since endogenous erythropoietin (EPO) levels are usually high in PNH¹⁸, EPO administration is rarely indicated¹⁹. Platelet support and G-CSF support may be needed at times, just as in AA.

Anticoagulants. Patients with PNH who have had a documented episode of venous thrombosis, and patients with PNH who have additional thrombophilic risk factor(s) must be anti-coagulated indefinitely (but see "Control of hemolysis" below). Primary anticoagulation at diagnosis in patients with PNH who do not have known additional risk factors is more problematic²⁰. Tissue plasminogen activator (tPA) is strongly recommended for thrombolytic therapy in patients with PNH when they develop venous thrombosis²¹, particularly the Budd-Chiari syndrome. tPA can be effective even several days after the onset of thrombosis, and it can be used even in the face of thrombocytopenia: but its use requires always a balanced analysis of risks and benefits.

Causal treatment. Allogeneic bone marrow transplantation (BMT, or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) is at the moment the only curative treatment for PNH²²⁻²⁴. The outcome data are very similar to those seen in AA²⁵; although they tend to be somewhat poorer, probably for the main reason that there is on average a longer time interval between diagnosis and HSCT. The evaluation of risk factors such as the presence/severity of pancytopenia and the history of thrombosis must enter into the decision-making process re HSCT¹⁰: but in my view the most important factor is the wish of the patient to have the procedure or otherwise. In contrast to what applies in other clonal disorders, elimination of the PNH clone is not the most important result of HSCT: it is probably

more important – just like in AA – to supply new stem cells and to eliminate the auto-immune process underlying damage to existing non-PNH stem cells. For this reason conditioning should be intensely immunosuppressive but does not need to be myelo-ablative^{22,26}. Whenever there is pancytopenia PNH borders with AA^{27,28}: and in such cases, just like in AA itself, a viable alternative²⁹ to HSCT is intensive immunosuppression with a combination of anti-lymphocyte globulin and methylprednisolone^{30,31}, followed by cyclosporine for 1 year or longer.

Control of hemolysis. The most important advance in the management of PNH has been the recent introduction of a human monoclonal antibody (eculizumab) that is directed against the C5 component of complement³². In a recently published³³ double-blind, randomized, multicenter, phase III trial, 87 transfusion-dependent patients with severely haemolytic PNH received either placebo or eculizumab (900 mg intravenously every 14 days). Stable hemoglobin levels in the absence of blood transfusions were achieved in 49% (21 of 43) of the patients assigned to eculizumab, and in none (0 of 44) of those assigned to placebo ($p < 0.001$). Eculizumab reduced intravascular hemolysis very markedly, with a rapid, dramatic fall in lactate dehydrogenase. The quality of life was also significantly improved; there were only 4 serious adverse events, and all these patients recovered without sequelae. Why not all patients respond in the same way is currently under investigation, and it may become possible to predict which patients will respond best: but in the meantime a trial run of Eculizumab should be probably offered to every PNH patient who has clinically significant hemolysis. There is evidence that eculizumab administration has also a significant effect on the risk of thrombosis and this may further broaden the indications for this new agent. On the other hand, the risk of certain infections, although small, will need to be more accurately assessed as more patients receive this treatment for long periods of time.

References

- Luzzatto L, Notaro R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Young N, Gerson SL, High KA (eds). *Clinical Hematology*. Philadelphia: Mosby; 2006: 326-39.
- Rosse WF, Hoffman S, Campbell M, Borowitz M, Moore JO, Parker CJ. The erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis. *British Journal of Haematology* 1991; 79: 99-107.
- Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699-709.
- Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Kinoshita T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993; 73: 703-11.
- Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO Journal* 1994; 13: 110-7.
- Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci US* 1983; 80: 5066-70.
- Meri S, Morgan BP, Davies A, et al. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion into lipid bilayers. *Immunology* 1990; 71: 1-9.
- Bocconi P, Del Vecchio L, Di Noto R, Rotoli B. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 33: 25-43.
- Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New England Journal of Medicine* 1995; 333: 1253-8.
- Socié G, Mary JY, De Gramont A, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet* 1996; 348: 573-7.
- Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Baillière's Clinical Haematology* 1989; 2: 113-38.
- Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Seminars in Hematology* 1989; 26: 201-7.
- Araten D, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999; 96: 5209-214.
- Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005; 105: 3848-54.
- Karadimitris A, Luzzatto L. The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leukemia* 2001; 15: 1148-52.
- Poggi A, Negrini S, Zocchi MR, et al. Patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria have a high frequency of peripheral-blood T cells expressing activating isoforms of inhibiting superfamily receptors. *Blood* 2005; 106: 2399-408.
- Gargiulo L, Lastraioli S, Cerruti G, et al. Highly homologous T-cell receptor beta sequences support a common target for auto-reactive T cells in most patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007; 109: 5036-42.
- McMullin MF, Hillmen P, Elder GE, Lappin TR, Luzzatto L. Serum erythropoietin levels in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: implications for therapy. *Br J Haematol* 1996; 92: 815-17.
- Boschetti C, Fermo E, Bianchi P, Vercellati C, Barraco F, Zanella A. Clinical and molecular aspects of 23 patients affected by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 2004; 77: 36-44.
- Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003; 102: 3587-91.
- McMullin MF, Hillmen P, Jackson J, Ganly P, Luzzatto L. Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Journal of Internal Medicine* 1994; 235: 85-9.
- Antin JH, Ginsburg D, Smith BR, Nathan DG, Orkin SH, Rapoport JM. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment. *Blood* 1985; 66: 1247-50.
- Saso R, Marsh J, Cevreska L, et al. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1999; 104: 392-6.
- Raiola AM, Van Lint MT, Lamparelli T, et al. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2000; 85: 59-62.

25. Bacigalupo A, Brand R, Oneto R, et al. Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy—The European Group for Blood and Marrow Transplantation experience. *Semin Hematol* 2000; 37: 69-80.
26. Araten DJ, Luzzatto L. Allogeneic bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2000; 85: 1-2.
27. Lewis SM, Dacie JV. The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *British Journal of Haematology* 1967; 13: 236-51.
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: 401-8.
29. Paquette RL, Yoshimura R, Veiseh C, et al. Clinical characteristics predict response to antithymocyte globulin in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *British Journal of Haematology* 1997; 96: 92-7.
29. Frickhofen N, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H, et al. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporin 1991; 324: 1297-304.
30. Bacigalupo A, Bruno B, Saracco P, et al. Antilymphocyte globulin, cyclosporine, prednisolone, and granulocyte colony-stimulating factor for severe aplastic anemia: an update of the GITMO/EBMT study on 100 patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party on Severe Aplastic Anemia and the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2000; 95: 1931-4.
31. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004; 350: 552-9.
32. Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006; 355: 1233-43.