

11227

//

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO NACIONAL  
"LA RAZA"

**PRESENTACION BIOQUÍMICA E INMUNOFENOTIPICA EN  
PACIENTES CON HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA**

**TESIS DE POSTGRADO**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**P R E S E N T A :**

Dr. ANDRES ~~CABELLO MIGUEL~~

**ASESOR DE TESIS:**

Dr. MOISES XOLOTL CASTILLO



MEXICO, D F

2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

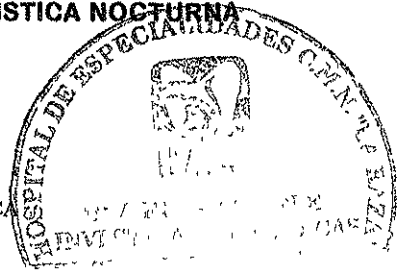
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PRESENTACIÓN BIOQUÍMICA E INMUNOFENOTÍPICA EN  
PACIENTES CON HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA**

**DR. JESÚS ARENAS OSUNA**

JEFE DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN MÉDICA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MÉDICO NACIONAL  
"LA RAZA"



**DR. CAROLINA ARIZA ANDRACA**

JEFE DE SERVICIO DE MEDICINA INTERNA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MÉDICO NACIONAL  
"LA RAZA"

**ASESOR:**

**DR. MOISES XOLOTL CASTILLO**

MEDICO INTERNISTA  
ADSCRITO AL SERVICIO DE HEMATOLOGIA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MÉDICO NACIONAL  
"LA RAZA"



**PRESENTA:**

**DR. ANDRÉS CABELLO MIGUEL**

RESIDENTE DE MEDICINA INTERNA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MÉDICO NACIONAL  
"LA RAZA"

SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
U. N. A. M.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON NÚMERO DE REGISTRO

2001-690-0045

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

# INDICE

INDICE .....	2
RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	4
ANTECEDENTES.....	5
MATERIAL Y METODOS .....	8
RESULTADOS .....	11
DISCUSION .....	18
CONCLUSIONES .....	22
BIBLIOGRAFÍA .....	23
ANEXOS .....	25
ANEXO 1 .....	25
ANEXO 2 .....	26
ANEXO 3 .....	27
ANEXO 4 .....	28

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# RESUMEN

## Objetivo:

Correlacionar severidad de lisis eritrocitaria vs tipo de células (I, II y III) en pacientes con HPN de población mexicana

## Material y métodos:

Pacientes de clínica de anemia aplásica/HPN del HECMNR. Previo consentimiento informado, incluimos a  $> 16$  años, ambos sexos, positividad a Ham, Ham negativos con hemosiderinuria, excluimos pacientes trasfundidos 30 días previos, con insuficiencia hepática o renal, patología biliar y que por citometría descartase HPN. La hemólisis se determinó por Hb, BI, DHL y reticulocitos según expediente y en una medición parámetros de citometría, que reportó porcentaje de poblaciones HPN I, II o III para CD55 y CD59.

Correlación con R de Pearson para asociar eritrocitos I, II y III de CD55 y CD59 con los indicadores de lisis, así mismo, cada población celular se estratificó en tres grupos para encontrar diferencia intragrupal entre cantidad de una determinada población y marcadores de hemólisis.

## Resultados

Los análisis de correlación mostraron una relación directamente proporcional entre GRIII CD 59 y DHL con R de Pearson 0.427 ( $p = 0.021$ ) y relación directamente proporcional entre GRIII CD 59 y reticulocitos con R de Pearson 0.426 ( $p = 0.010$ ). Demás análisis de correlación sin resultados estadísticamente significativos.

La estratificación de tipos eritrocitarios no mostró diferencia entre cantidad de éstos y severidad de hemólisis.

## Conclusiones

Consistente a reportes de literatura, la cantidad de GRIII CD59 fue proporcional a severidad de hemólisis, aunque esta asociación fue leve y solo cierta para elevación de DHL y reticulocitos.

Aunque el tipo celular predominante fueron las células tipo II, esperándose hemólisis en grado variable, no se encontró diferencia entre cantidad de algún tipo celular e indicadores de hemólisis.

**Palabras clave:** Hemoglobinuria, HPN, citometría, hemólisis



# ABSTRACT

## Objective:

To correlate severity of erythrocytic lysis vs type of cells (I, II and III) in patient with PNH of Mexican population

## Material and methods:

Patients of aplastic anemia /PNH's clinic of the HECMNR Previous informed consent, we include to: > 16 years, both sexes, positive to Ham, negative Ham with hemosiderinuria, we exclude patients transfused 30 previous days, with liver or renal failure, biliary pathology and that for citometry discards PNH The hemolysis was determined by Hb, BI, DHL and reticulocytes according to archive and in one mensuration, citometry's parameters that reported percentage of populations PNH I, II or III for CD55 and CD59

Correlation with R of Pearson to associate erythrocytes I, II and III of CD55 and CD59 with the lysis indicators, likewise, each cellular population was stratify in three groups to find difference intragrupal between quantity of certain population and hemolysis's markers

## Results

The correlation analyses showed a directly proportional relationship among GRIII CD 59 and DHL with R of Pearson 0.427 ( $p = 0.021$ ) and directly proportional relationship among GRIII CD 59 and reticulocytes with R of Pearson 0.426 ( $p = 0.010$ ) Another analysis of correlation without results statistically significant

The stratification of erythrocytic types didn't show difference among quantity of these and severity of hemolysis

## Conclusions

Consistent to literature reports, the among of GRIII CD59 was proportional to hemolysis's severity, although this association was light and only certain for elevation of DHL and reticulocytes

Although the predominant cellular type was the cells type II, being expected hemolysis in variable grade, No there was difference between among of some cellular type and hemolysis's indicators.

**Key words:** Hemoglobinuria, PNH, citometry, hemolysis



## ANTECEDENTES

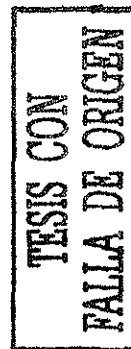
La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) se define como una anemia crónica adquirida en la cual existe hemólisis intravascular como resultado de defectos intrínsecos en la membrana de los eritrocitos, que los hace mas susceptibles a la acción del complemento, la hemólisis no es mediada por anticuerpos.<sup>4,11</sup> La anomalía celular en este trastorno es causada por mutaciones somáticas adquiridas en las células tallo, dando origen a clonas anormales que son deficientes en Glicosil-fosfatidil-inisitol (GPI), considerada molécula de anclaje para otras moléculas, entre las cuales figuran CD55 “decay-accelerating factor” (DAF) y CD 59 “membrane inhibitor of reactive lysis” (MIRL)<sup>18,3</sup>. A menudo se presenta con dolor abdominal asociado a microtrombosis, cuadros de trombosis, así mismo tiene estrecha relación con anemia aplásica.<sup>5,6</sup>

La HPN fue descrita por primera vez en 1882 por Strübing al encontrar alteraciones de la orina después de dormir, posteriormente la demostración del aumento de hemólisis eritrocitaria mediada por complemento al colocar las células en un medio ácido por Ham, hizo que se estableciera este examen diagnóstico que lleva su nombre en 1930.<sup>21</sup>

Posteriormente en base a los resultados positivos de prueba de Ham en pacientes con anemia aplásica, Lewis y Dance en 1967 establecieron una “sobreposición” de las dos enfermedades, sin embargo la bases fisiopatológicas de ésta asociación aun son desconocidas.<sup>1, 12,19</sup>

La causa de deficiencia de GPI es por la falta de transferencia de N-acetilglucosamina a Fosfatidilinositol, que requiere de una proteína que es codificada por el gene “Phosphatidyl Inositol Glycan A” o PIG-A, el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma X (X.p22.1), conociéndose hasta ahora 125 posibles mutaciones.<sup>3,7,21</sup>

Existe una amplia gama de proteínas unidas a GPI, entre las que figuran moléculas de adhesión, antígenos de grupo sanguíneo, enzimas, receptores de membrana, reguladores de complemento y algunas otras de función desconocida; de todas ellas las que toman principal interés son CD 55, proteína inhibidora de C3



convertasa y CD 59 que protege al eritrocito del complejo de ataque a membrana C5-C9. En la literatura se han documentado deficiencias hereditarias de CD 55, en dichos pacientes no ha habido desarrollo de hemólisis o hemoglobinuria, no así para deficiencia selectiva de CD 59 en cuyo caso las manifestaciones de hemólisis son típicas de HPN, por lo que podemos asumir que la deficiencia de CD 59 es la principal responsable del incremento de la sensibilidad a la lisis mediada por complemento y por ende hemólisis<sup>3</sup>

La característica cardinal de la HPN es la hemólisis de grado variable, por lo que usando anti-CD 59, se han identificado tres fenotipos de eritrocitos HPN con base en que no todos los glóbulos rojos (GR) HPN son igual de sensibles a la lisis mediada por complemento. La células HPN I tienen una expresión casi normal de proteínas unidas a GPI, las HPN II expresión intermedia y las HPN III no tienen expresión detectable, con base a ello su sensibilidad al complemento es diferente, las células HPN I se comportan como prácticamente normales, las HPN II moderadamente sensibles (3 o 4 veces mas sensibles) y las HPN III altamente sensibles a la lisis mediada por complemento (15 a 20 veces mas de lo normal). En base a lo anterior, se a identificado que un mismo paciente puede tener "mosaicos" de poblaciones celulares de HPN y dependiendo del dominio de uno u otro tipo celular, la presentación clínica.<sup>22</sup>

La enfermedad tiene un curso crónico y desfavorable, por ejemplo Marks reporta una media de sobrevivida de 6.6 años en 22 pacientes a partir de la fecha de diagnóstico, en otro estudio de seguimiento a 48 años la media de sobrevivencia fue 10 años, con un 28% de sobrevivientes a los 25 años. La causa de muerte son hemorragias principalmente por trombocitopenias o bien trombosis venosas. No obstante la recuperación espontánea también es posible.<sup>14, 15,16</sup>

No existen índices pronósticos para evaluar la severidad de la enfermedad, no obstante en 1996 Sociè, G & cols<sup>23</sup>, publican un seguimiento de arriba de 200 pacientes, donde los factores de mal pronostico para la evolución de la HPN con valor estadísticamente significativos, son: Trombosis, progresión de pancitopenia, desarrollo de leucemia aguda, edad mayor de 55 años, mas de un tratamiento, trombocitopenia al diagnostico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



La clona de células HPN tiene una vida larga, pero posiblemente finita, lo que hace pensar que cuando esta clona se agota y la médula ósea no se recupera, evolucionará hacia anemia aplásica y por otra parte si llegara a existir recuperación medular el paciente evolucionaría hacia la curación.<sup>13,15,16</sup>

Otro aspecto a considerar es la evolución hacia mielodisplasia o bien hacia leucemia aguda, debido al carácter clonal de la enfermedad.<sup>8, 10</sup>

Hasta la fecha la prueba de Ham es la útil para el diagnóstico de HPN, además de otras como la lisis con sucrosa, no obstante éstos dan muchos falsos negativos. En últimas fechas la citometría de flujo es el método más exacto para el diagnóstico, utilizando anti CD 55 o anti CD 59, ello a hecho posible la detección de pacientes clínicamente sanos con expresión de células HPN y aun no se conoce en que cantidad deben éstas clonas estar presentes para manifestar la enfermedad.<sup>2,9</sup>

A pesar lo los avances en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, el tratamiento de esta entidad continua siendo de soporte con antibióticos, anticoagulantes y terapia transfusional y la única alternativa potencialmente curativa es el trasplante de médula ósea con lo que se ha logrado sobrevivida de a dos años en 56% de los pacientes trasplantados.<sup>14,15,16,20</sup> Así mismo se han intentado manejo con inmunomoduladores e incluso con factores estimulantes de colonias, sin embargo la experiencia es pobre al respecto.<sup>17</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **MATERIAL Y METODOS**

Previa aceptación del protocolo por el comité local de investigación del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza (HECMNR), se condujo este estudio de carácter ambispectivo, documentando la severidad de la enfermedad mediante indicadores de hemólisis eritrocitaria: Hemoglobina (Hb), bilirrubina indirecta (BI), deshidrogenasa láctica (DHL) y reticulocitos (retis); según reportes históricos de laboratorio tomados del expediente clínico y realizándose en una sola medición (transversal) la obtención de citometría de flujo para determinación de CD 55 y CD 59 con citómetro de flujo FACScan (becton-Dickenson) en el programa "Cell Quest", en la sección de citometría de flujo del laboratorio de hematología especial del HECMNR.

Se estudiaron a los pacientes asignados a la clínica de anemia aplásica / HPN del HECMNR los cuales fueron mayores de 16 años de edad en adelante por tratarse de un hospital que atiende población adulta, no haciendo distinción de género, una vez informados del protocolo de estudio y habiendo comprendido la importancia de conocer el comportamiento celular de su patología se solicitó firmasen carta de consentimiento informado (ver anexo 2) para proceder así a citarlos a toma de muestra sanguínea y realización de citometría de flujo en el laboratorio ya mencionado, cumpliendo así eficazmente los criterios para la investigación en humanos, de acuerdo a la declaración de Helsinki, dando cumplimiento a Normas de Buenas Prácticas Médicas y a la Norma Oficial Mexicana para la Investigación en Humanos

Los criterios de inclusión fueron por tanto: Edad mayor de 16 años, sexo masculino o femenino, diagnóstico clínico de HPN que hayan resultado positivos a la prueba de Ham, pacientes con alta sospecha clínica Ham negativos, pero con hemosiderinuria (ver anexo 1), pacientes con afección de 1, 2 o 3 líneas celulares que tengan positividad para prueba de Ham, consentimiento del paciente por escrito.

Los criterios de eliminación y no inclusión fueron: Hemotransfusión 30 días previos, diagnóstico conocido de Insuficiencia hepática Child C, diagnóstico conocido de Insuficiencia renal terminal, diagnóstico conocido de patología biliar y finalmente los criterios de exclusión fueron los pacientes que fallezcan sin lograrse la determinación inmunofenotípica y aquellos que por citometría de flujo se les descarte diagnóstico de HPN.

El método de laboratorio llevado a cabo para el análisis de CD 55 y CD 59 fue el siguiente:

1. Se ajustó la cantidad de células a  $1 \times 10^6$  células/100 $\mu$ l de amortiguador de fosfatos
2. Se depositó en un tubo Falcon  $1 \times 10^6$  células/100 $\mu$ l, adicionar 20 $\mu$ l de anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (fitc) ó ficoeritrina (PE)
3. Se mezcló e incubó a 4° C en oscuridad.
4. Se adicionó 1 ml de solución de lisis (1:10), mezclado e incubado durante 5 minutos a 4° C en oscuridad.
5. Centrifugación a 300 X g por minuto durante cinco minutos.
6. Decantado y se adicionó amortiguador de fosfatos.
7. Centrifugado a 300 X g durante 5 minutos; transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionó 0.8 ml de amortiguador de fosfato, más 0.2 ml de paraformaldehído al 1%, se resuspendió en vortex a baja velocidad y con el tubo en esas condiciones se procedió a la adquisición de datos en el programa de "cell quest".

Los indicadores de lisis se recabaron en formatos de registro (ver anexo 3) a partir de fuentes secundarias de información ubicadas en archivo clínico, tomando como principales indicadores de lisis eritrocitaria a la Hb, BI, DHL y retis.

Con respecto al tamaño de la muestra es importante considerar que no existe información precedente en población mexicana, siendo además esta patología de

baja incidencia, por lo que el tamaño de muestra se determinó por el tiempo, incluyendo a todos aquellos pacientes que tengan el diagnóstico clínico al momento del inicio del estudio y hasta el término del mismo.

Los resultados de laboratorio de cada paciente fueron promediados y tabulados, junto con los resultados de citometría de flujo los cuales reportaron el porcentaje de cada tipo eritrocitario HPN (I, II o III) ya sea para CD 55 o CD 59, es decir: Glóbulos rojos tipo I CD 55 (GR I CD 55), glóbulos rojos tipo II CD 55 (GR II CD 55), glóbulos rojos tipo III CD 55 (GR III CD 55), glóbulos rojos tipo I CD 59 (GR I CD 59), glóbulos rojos II CD 59 (GR II CD 59), glóbulos rojos III CD 59 (GR III CD 59).

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v10 y consistió en la realización de graficas de dispersión para la identificación de correlación entre el tipo celular reportado y los indicadores de hemólisis (Hb, BI, DHL y retis), así mismo el análisis numérico de correlación se llevó a cabo mediante la prueba R de Pearson.

Para tratar de identificar si la cantidad de células de algún tipo eritrocitario HPN (I, II o III) de CD 55 o CD 59, modifica los indicadores de hemólisis, fue necesaria la estratificación de la población eritrocitaria reportada (GR I CD 55, GR II CD 55, GR III CD 55, GR I CD 59, GR II CD 59 y GR III CD 59) en tres subgrupos cada uno, lo cual se hizo restando el valor porcentual mínimo de cada población al máximo y dividiéndolo entre tres, estableciendo así el rango porcentual para cada subgrupo como se demuestra en la tabla 3 en el apartado de resultados. Para cada rango de población celular se obtuvo la media de los indicadores de hemólisis (Hb, BI, DHL y retis) utilizándose T de student no pareada de 2 colas para la comparación de medias entre grupos no homogéneos y ANOVA de 1 vía con análisis post hoc por corrección con Bonferroni para comparación de grupos que guardaban cierta equidad entre el numero de sus elementos.

## RESULTADOS

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Los parámetros de laboratorio de cada paciente, incluyendo los resultados de citometría de flujo (expresada en porcentaje para cada tipo eritrocitario), son descritas en la tabla 1. En el anexo 4 se muestra los resultados reportados por el laboratorio de hematología especial para cada uno de los casos. La tabla 2 resume los promedios de la población estudiada para cada indicador de hemólisis y tipo celular encontrado, el rango mínimo y máximo, así como la desviación estándar para cada uno de ellos.

ID	Edad	Hb	Hct	Leuc	Pla	RI	DHL	GRI CD55	GRII CD55	GRIII CD55	GRI CD59	GRII CD59	GRIII CD59
1	31	7.25	16.7	5 450	215 61	2.87	1792 6	0	89.16	10.84	15.12	75.62	9.26
2	37	16.90	1.8	7 730	285.00	0.25	174 0	0	96.71	3.29	0	99.56	0.44
3	31	7.90	9.5	1 900	245.00	1.43	1965 0	0	84.87	13.4	83.51	15.12	0.95
4	55	8.78	6.9	2 750	36.25	0.55	559 4	0	93.67	5.46	14.37	81.04	2.45
5	39	7.57	23.3	4 013	133 73	1.39	2152.0	0	95.4	4.6	36.02	53.42	8.33
6	27	7.20	9.2	3 955	142.00	1.42	1045.0	0	94.2	5.8	0	74.64	25.36
7	41	7.96	15.2	3 623	126.00	1.90	1914.0	8.07	75.5	17.87	81.1	19.19	0.44
8	39	8.94	3.1	3 431	35.88	0.38	213.3	0	93.5	6.5	0	95.7	4.3
9	25	7.41	7.0	2 700	44.13	1.40	1037 0	0	95.05	4.14	4.32	73.14	18.61
10	47	8.14	18.6	3.902	273.10	1.27	2219 0	0	90.6	9.4	4.5	51.9	43.6
11	60	8.96	7.4	3.510	170.17	1.93	1638 0	0	94.5	5.5	0	95	5
12	33	10.44	5.5	2.969	91.77	0.59	760 9	0	93	7	99.6	0.4	0
13	59	9.62	19.9	2.968	154.00	2.68	2497.0	0	81.6	18.4	22.9	47.7	29.4
14	27	10.11	10.6	2.089	158.25	0.88	1164.0	0	29.6	70.4	56.5	38.9	4.6
15	57	12.89	5.2	3.150	70.05	0.66	462.2	0	90.6	9.4	31.69	68.31	0
16	77	11.42	5.3	4.356	132.43	1.09	677.6	0	91.5	8.5	73.7	23	3.3
17	27	10.67	16.1	6.150	161.00	1.12	1752 0	4.6	81.3	14.4	13.2	74.2	12.6
18	39	6.53	9.8	1.740	120.14	1.77	2517 0	0	91.3	8.7	38.7	49.3	12
19	33	13.27	4.7	4.991	94.73	0.50	350.7	0	68.8	31.2	33.7	46.1	20.2
20	22	12.56	28.6	9.800	155.71	2.32	268.8	16.7	43.1	40.2	46.4	50.6	14
21	42	9.60	3.8	2.180	263.80	0.48	573.8	0	86.6	13.4	27.6	72.4	0
22	45	8.33	1.5	3.045	137.27	0.44	185.1	29.18	70.61	0	31.95	65.49	0.3
23	77	9.95	7.7	2.638	175.58	1.44	1106 0	0	94.29	4.75	0	87.22	6.93
24	40	8.29	14.1	2.494	175.53	1.85	1663 0	0	96.1	3.9	35.9	64.1	0
25	31	11.75	3.5	2.888	32.19	0.34	225.7	0	95.5	4.5	72.9	23.5	3.6
26	83	9.90	9.1	4.031	254.77	0.55	886.7	13.13	66.6	18.4	38	45	9.26
27	50	11.75	3.5	2.608	47.85	0.56	191.5	0	94.56	4.86	95.82	1.03	0.07
28	30	10.15	5.4	4.699	153.75	0.64	1731.0	0	71.78	26.21	25.4	67.02	10.11
29	54	11.91	2.1	5.030	59.47	0.24	335 0	0	89.36	9.04	26.64	69.79	0.95

Tabla 1: características generales de los 29 pacientes incluidos en el estudio

Variable	Rango	Media	DS
Hb	6.53 - 16.90	9.8670	2.2912
Reticulocitos	1.49 - 28.57	9.4801	6.9038
Leucocitos	1.740 - 9.800	3.821	1.769
Plaquetas	32.19 - 285.00	142.93	74.63
BI	0.24 - 2.87	1.1341	.7395
DHL	174.00 - 2517.00	1105.4238	776.2477
GR I CD 55	0.00 - 29.18	2.4717	6.5788
GR II CD 55	29.60 - 96.71	84.1159	16.0665
GR III CD 55	0.00 - 70.40	13.1055	14.2105
GR I CD 59	0.00 - 99.60	34.8117	30.2243
GR II CD 59	0.40 - 99.56	56.1514	27.2574
GR III CD 59	0.00 - 43.60	8.4848	10.4569

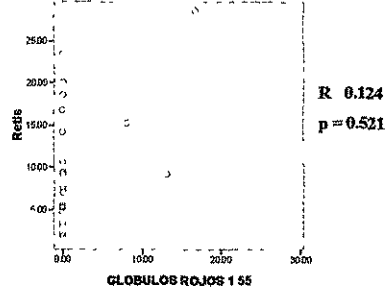
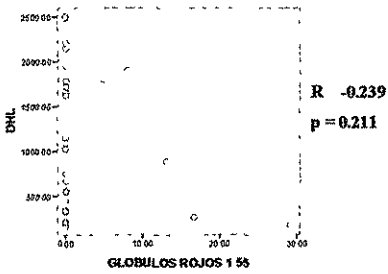
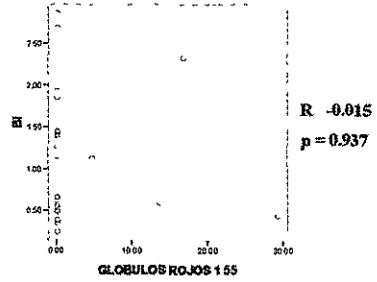
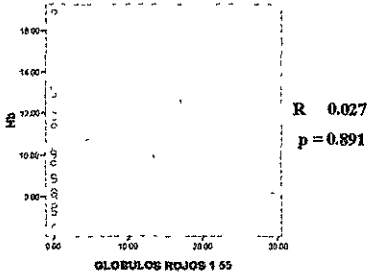
Tabla 2: Promedio de resultados, rangos de presentación y desviación estándar (DS)

Como se observa en estas tablas la Hb promedio fue de  $9.8 \pm 2.2$  DS, reticulocitos  $9.4 \pm 6.9$  DS, BI  $1.1 \pm 0.73$  DS y DHL  $1105.4 \pm 776.2$  DS. En lo que respecta a los tipos celulares encontrados, estos fluctuaron para los glóbulos rojos tipo I CD55 (GR I CD 55) desde 0 a 29.1 %, para GR II CD 55 de 29.6 a 96.7 %, para GR III CD 55 de 0 a 70.4 % y finalmente los glóbulos rojos CD 59 presentaron los siguientes rangos: GR I CD 59 de 0 a 99.6%, GR II CD 59 de 0.4 a 99.5% y GR III CD 59 de 0 a 43.6%. Si bien no es el propósito de nuestro estudio, mencionamos además la cifra encontrada de leucocitos y plaquetas dada la tendencia a falla medular en la mayoría de nuestros pacientes.

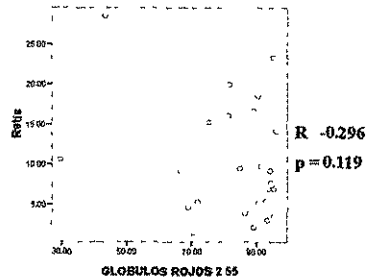
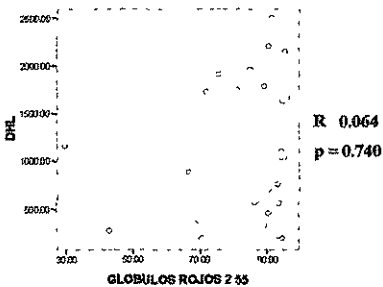
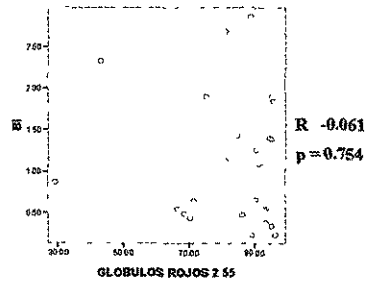
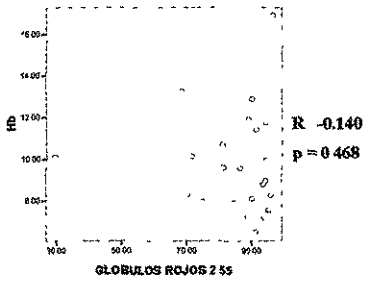
Para la determinación de correlación entre los glóbulos rojos tipo I, II o III para CD 55 como para CD 59 con indicadores de hemólisis (Hb, BI, DHL y retis), se realizaron graficas de dispersión y su significancia estadística fue determinada por R de Pearson, comportándose de la siguiente manera:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Glóbulos rojos tipo I CD 55**

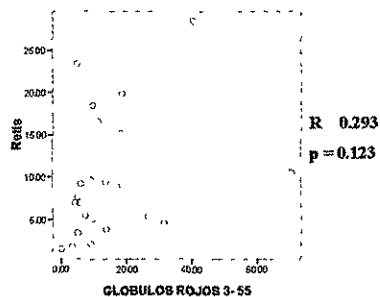
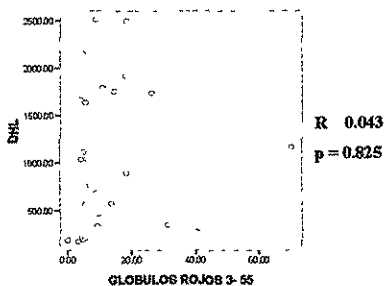
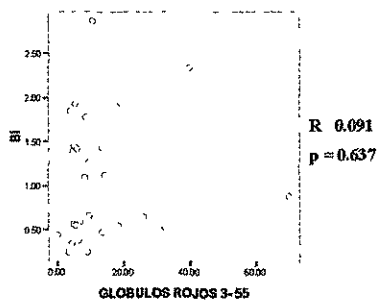
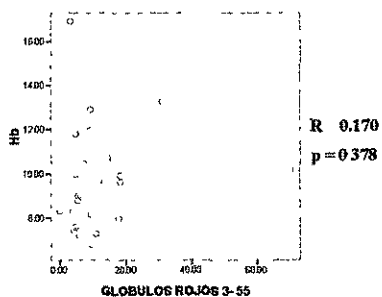


**Glóbulos rojos tipo II CD 55**

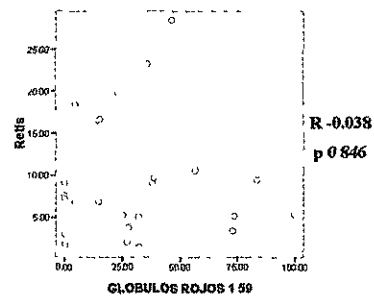
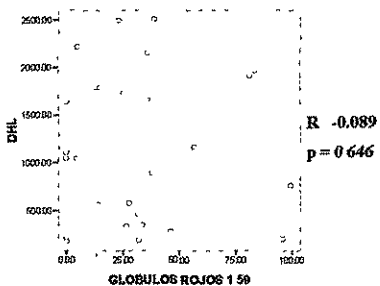
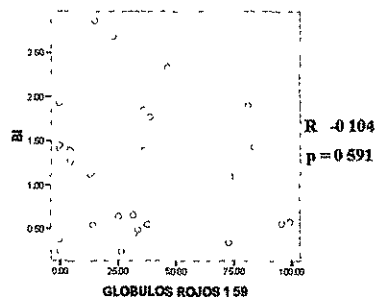
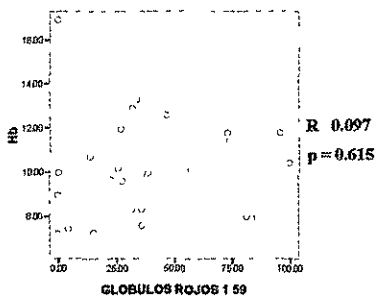


**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### Glóbulos rojos tipo III CD 55



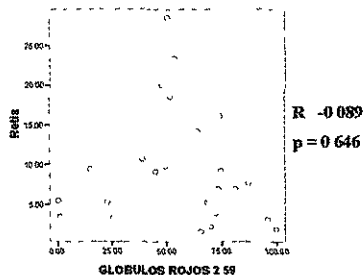
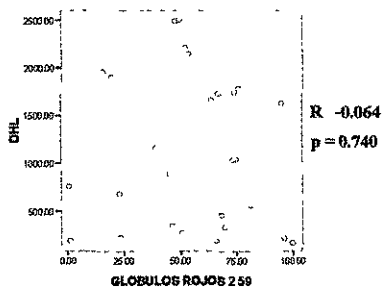
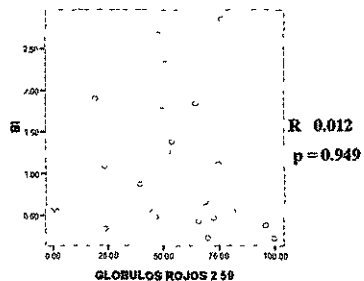
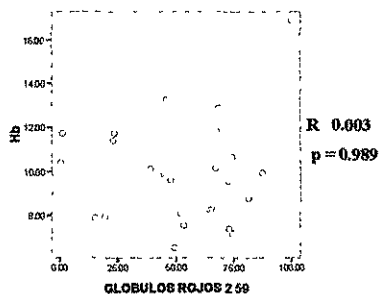
### Glóbulos rojos tipo I CD 59



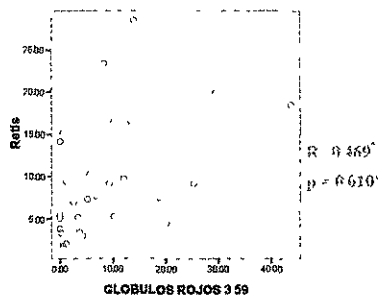
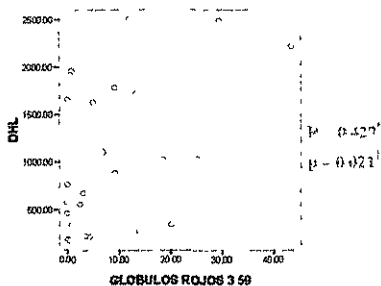
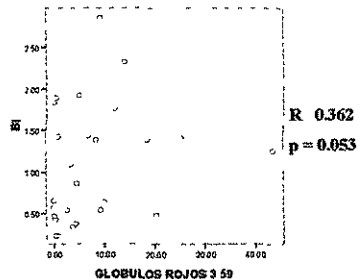
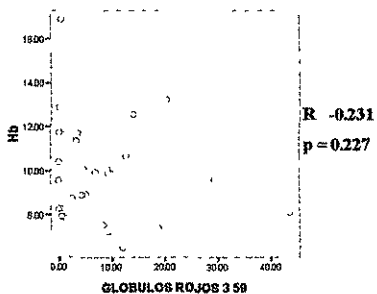
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## Glóbulos rojos tipo II CD 59



## Glóbulos rojos tipo III CD 59



\* Para R de Pearson, los valores entre 0.4-0.6 indican correlación leve, de 0.6-0.8 moderada y > 0.8 alta correlación

† Valor estadísticamente significativo

De acuerdo a estas gráficas la mayoría de los análisis de correlación no demostraron alguna significancia entre el tipo de eritrocito HPN vs indicadores de hemólisis, a excepción de las dos últimas donde existe una correlación directamente proporcional entre la cantidad de eritrocitos HPN III CD59 y el aumento de DHL y reticulocitos; numéricamente hablando esto fue para los GR I CD55 vs Hb [R -0.027 (p = 0.891)], para GR I CD55 vs BI [R -0.015 (p = 0.937)], para GR I CD55 vs DHL [R -0.239 (p = 0.211)], para GR I CD55 vs retis [R 0.124 (p = 0.521)], para GR II CD55 vs Hb [R -0.140 (p = 0.468)], para GR II CD55 vs BI [R -0.061 (p = 0.754)], para GR II CD55 vs DHL [R 0.064 (p = 0.740)], para GR II CD55 vs retis [R -0.296 (p = 0.119)], para GR III CD55 vs Hb [R 0.170 (p = 0.378)], para GR III CD55 vs BI [R 0.091 (p = 0.637)], para GR III CD55 vs DHL [R 0.043 (p = 0.825)], para GR III CD55 vs retis [R 0.293 (p = 0.123)], para GR I CD59 vs Hb [R 0.097 (p = 0.615)], para GR I CD59 vs BI [R -0.104 (p = 0.591)], para GR I CD59 vs DHL [R -0.089 (p = 0.646)], para GR I CD59 vs retis [R -0.038 (p = 0.846)], para GR II CD59 vs Hb [R 0.003 (p = 0.989)], para GR II CD59 vs BI [R 0.012 (p = 0.949)], para GR II CD59 vs DHL [R -0.064 (p = 0.740)], para GR II CD59 vs retis [R -0.089 (p = 0.646)], GR III CD59 vs Hb [R -0.231 (p = 0.227)] y para GR III CD59 vs BI [R 0.362 (p = 0.053)]

A considerar solamente GR III CD59 vs DHL [R .427 (p = 0.021)] y GR III CD59 vs retis [R .469 (p = 0.010)], que demostraron un valor de R mayor de 0.4 sugiriendo una correlación leve entre las variables anteriores, siendo además estadísticamente significativo.

Dado los resultados anteriores y a la pobre correlación encontrada fue necesario subdividir a las poblaciones celulares de eritrocitos para establecer un punto de asociación en el cual alguna determinada cantidad de una población celular de GR fuese más significativa en el condicionamiento de hemólisis. Se realizó una estratificación de cada población celular en tres grupos, según se describe en material y métodos cada una de la siguiente manera: Tabla 3

Tipo celular	Rango 1 (%)	# CASOS	Rango 2 (%)	# CASOS	Rango 3 (%)	# CASOS
GR I CD 55	0 - 9.73	26	9.74 - 19.46	2	19.47 - 29.18	1
GR II CD 55	29.6 - 51.97	2	51.98 - 74.34	5	74.35 - 96.71	22
GR III CD 55	0 - 23.47	25	23.48 - 46.94	3	46.95 - 70.4	1
GR I CD 59	0 - 33.2	16	33.3 - 66.4	7	66.5 - 99.6	6
GR II CD 59	0.4 - 33.46	6	33.47 - 66.52	10	66.53 - 99.56	13
GR III CD 59	0 - 14.54	24	14.55 - 29.08	4	29.09 - 43.6	1

**Tabla 3:** Distribución por rango de cada población celular y número de casos por cada grupo de pacientes

A cada rango de tipo celular se le determinó la media de los indicadores de hemólisis (Hb, BI, DHL y retis) para poder así llevar a cabo análisis de comparación de medias y encontrar diferencias entre grupos. Esto se llevó a cabo con t de student de 2 colas para GR I CD55, GR III CD55 y GR III CD59 y con ANOVA de 1 vía con análisis post hoc por corrección con Bonferroni para identificar variabilidad intragrupal para GR II CD55, GR I CD59 y GR II CD59, puesto la factibilidad de aplicar uno u otro análisis en cada grupo; no encontrándose diferencias estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre la cantidad de algún tipo de GR I, II o III CD55 ó CD59 y la severidad de hemólisis (según nuestros indicadores).

## DISCUSION

La hemoglobinuria paroxística nocturna, trastorno clonal de tipo adquirido en el que una mutación del gen PIG A condiciona deficiencia de glucosfosfatidilinositol, molécula de anclaje que sirve para fijar a la membrana celular una amplia gama de proteínas, entre ellas las inhibidoras del complemento CD 55 y CD 59, resultando éste defecto en un síndrome clínico que incluye hemoglobinuria per sé, hemólisis intravascular mediada por complemento, trombosis venosa y falla medular en grado variable que en éste último caso ha hecho que algunos autores identifiquen al síndrome de aplasia/HPN como fue descrito por Lewis & Dacie hace más de 4 décadas y cuya fisiopatología aun en fecha reciente es incierta.

No obstante la amplia gama de manifestaciones que se pueden presentar y lo complejo que puede ser su fisiopatología, lo característico de ésta entidad es la hemólisis intravascular mediada por complemento, para lo cual desde hace varios años ha habido numerosos esfuerzos en correlacionar las alteraciones fenotípicas eritrocitarias con los parámetros bioquímicos y clínicos, mientras esto es fácil de hacer en algunos casos, en otros es mucho más difícil.

La sensibilidad de los eritrocitos HPN a la acción lítica del complemento es debida a la ausencia parcial o completa de 2 o quizás 3 proteínas unidas a GPI: CD 55, CD 59 y posiblemente una proteína denominada C8, de éstas ya se ha determinado que la ausencia de CD 59 es la más importante (véase antecedentes). Ya hemos mencionado los tres fenotipos eritrocitarios conocidos de HPN y en base a ello la literatura menciona que la intensidad del componente hemolítico de la enfermedad está relacionada a tres factores:

1- La proporción de células anormales: Los pacientes con menos del 20% de células anormales casi no tienen hemoglobinuria, aunque casi siempre hay evidencia de hemólisis ya sea por marcadores bioquímicos o por hemosiderinuria, muchos pacientes con HPN III de más de 60% tienen hemoglobinuria diaria, pero algunos otros no, por razones desconocidas.

- 2- El tipo de anormalidad celular: La anormalidad celular intermedia (HPN II), tienen menos hemólisis que los pacientes con igual número de células tipo III
- 3- El grado de activación del complemento: Ya sea por infecciones virales o bacterianas, transfusiones, etc.

Tomando en cuenta lo anterior nosotros deberíamos esperar que en nuestra población el comportamiento fuese similar, es decir a mayor cantidad de células anormales, principalmente de tipo III, mayor aumento en los indicadores de lisis celular y a la inversa, a mayor cantidad de células tipo I (normales) conferirían de alguna manera protección a lisis eritrocitaria.

En nuestra casuística los pacientes presentaron células tipo I en el menor porcentaje de los casos, por ejemplo para los GR I CD 55, 26 de 29 pacientes (89.6%) solo tuvieron menos del 9.7% de las mismas y para GR I CD 59, 16 de 29 pacientes (55.1%) tuvieron menos del 33% de éstas y aunque estas cifras fueron las esperadas puesto el diagnóstico implícito de HPN, para fines de análisis estadístico no hubo conferencia de protección alguna el tener mayor a menor porcentaje de las mismas. (Tabla 3)

Pasando a las células con expresión intermedia de proteínas CD 55 y CD 59 (tipo II), es de mencionarse que fueron el tipo celular predominante en la población estudiada; 27 de 29 pacientes (93.1%) tuvieron más de 51% de GR II CD 55 y 23 de 29 pacientes (79.3%) tuvieron más de 33% de GR II CD 59 (tabla 3), esperando que para ellos la hemólisis que indistintamente se debió de haber manifestado en grado variable, fuera proporcional a la cantidad de éste tipo celular, sin embargo las diferencias intragrupalas demostraron que no fue así.

Ahora bien, las células tipo III fueron las menos prevalentes en la población de estudio, siendo de menos del 23% en 25 de 29 pacientes (86%) y de menos de 14.5% en 24 de 29 pacientes (82%), pero su significancia de más importancia que

la de ningún otro tipo celular. Si bien en los análisis de variabilidad intragrupal no se demostró que existiese diferencia alguna entre la cantidad de éste tipo celular y la severidad de la hemólisis tanto para células rojas tipo III CD 55 o CD 59 ( $p > 0.05$ ) en ambos casos; los análisis de correlación, específicamente a CD 59 (que según la literatura es la más importante en el condicionamiento de hemólisis), demostraron una tendencia inversamente proporcional entre la cantidad de GR III CD 59 y la cantidad de hemoglobina de cada paciente ( $R -0.231$ ) y tendencia directamente proporcional entre la cantidad de GR III CD 59 y la cantidad de bilirrubina ( $R 0.362$ ), aunque en ambos casos la significancia fue pobre ( $p > 0.05$ ), no así para el comportamiento observado con la DHL, bien o mal uno de los mejores indicadores de lisis eritrocitaria, donde al análisis de correlación se demostró una relación directamente proporcional entre GR III CD 59 y nivel de DHL con una  $R$  de Pearson de  $0.427$  ( $p = 0.021$ ) y una relación directamente proporcional entre GR III CD 59 y porcentaje de reticulocitos con valor de  $R$  de Pearson de  $0.426$  ( $p = 0.010$ ) (véase gráficas para este tipo celular en resultados).

Si bien no fue el propósito de este estudio es importante mencionar la asociación reportada y encontrada en nuestra serie con respecto a los síndromes de falla medular. Desde el año 1944 Dacie & Gilpin hicieron la primera descripción de HPN asociada a síndromes de falla medular, posteriormente confirmada por Letman en 1952 y Dacie & Lewis en 1961, en fechas recientes Dunn et al (1999) encontraron evidencia de HPN en 22% de pacientes con anemia aplásica e inclusive Luzzatto en 1996 concluye que la HPN siempre coexiste con falla medular; el motivo de esta asociación es difícil de explicar y hasta el momento lo que se maneja son teorías, una de ellas y quizá la más aceptable postula que la anemia aplásica como entidad aislada es el resultado al menos en algunas circunstancias de ataques inmunológicos contra células tallo, ataque que no se presenta en las células tallo con trastornos del gen PIG A posiblemente debido a que alguna molécula anclada a GPI puede ser de vital importancia en el reconocimiento por células efectoras del sistema inmunológico. Tomando en cuenta lo anterior para desarrollar HPN un paciente debería tener una mutación

del gen PIG A y un proceso aplásico subyacente, de esta manera la falla medular sería obvia en pacientes quienes inicialmente se presentan con anemia aplásica y posteriormente desarrollan HPN, pero cuando se presenta inicialmente la HPN la falla medular podría no ser obvia debido a que en el momento que se hace el diagnóstico la clona de células HPN se ha expandido a un punto tal que representa una proporción importante de la hematopoyesis. De esta manera podemos establecer dos tipos de pacientes: los que inicialmente presentan HPN y evolucionan a aplasia situación referida por Luzzatto como "agotamiento de HPN" y aquellos con aplasia quienes desarrollan posteriormente características clínicas y de laboratorio de HPN, estimándose en aproximadamente 30% de los casos de recuperación de aplasia.

La asociación HPN/aplasia tiene por ende importantes repercusiones, en el caso de nuestra casuística encontramos que la cifra promedio de leucocitos fue de 3,821 células (1,740 a 9,800), plaquetas 142,940 (32,190 a 285,000) y Hb de 9.8 gr/dl (6.5 a 16.9); donde queremos decir que la característica predominante fue la pancitopenia y bajo esta consideración puede haber pacientes con aplasia medular con HPN sub-diagnosticada de trasfondo, aquellos donde predomine la aplasia y por tanto no tengan elevados los indicadores de lisis celular o bien aquellos que estén evolucionando hacia un "agotamiento clonal", etc.; pudiéndose modificar en todas aquellas circunstancias los marcadores bioquímicos de lisis eritrocitaria.

Si bien este trabajo es el reporte de serie de pacientes con HPN mas grande que se ha logrado en esta institución, es importante considerar sus limitaciones pues aun así 29 pacientes son pocos para establecer subgrupos homogéneos comparables entre sí con respecto al numero de una determinada población celular y por ende se requerirán de estudios prospectivos para poder dar mayor validez a la asociación entre el numero de una determinada población celular y los marcadores bioquímicos de hemólisis.

## CONCLUSIONES

La hemoglobinuria paroxística nocturna es un trastorno clonal adquirido de la célula tallo donde una mutación del gen PIG A localizado en el brazo corto del cromosoma X, condiciona deficiencia de GPI molécula implicada en el anclaje de varias proteínas y moléculas, entre ellas CD 55 y CD 59 encargadas de la inhibición de la acción lítica del complemento principalmente sobre células rojas.

Las manifestaciones clínicas y de laboratorio pueden ser variables y dependerán si la enfermedad se presenta con predominio de manifestación aplásica o predominio de hemoglobinuria o bien síndromes de sobreposición como se ha descrito previamente. En una u otra circunstancia la característica cardinal es la hemólisis intravascular crónica de grado variable, misma que es influenciadas por muchos factores externos pero que en gran medida depende de la cantidad de células con mayores defectos de membrana.

En este estudio pudimos demostrar que efectivamente y de acuerdo a reportes de la literatura, el tipo celular que guardó mayor correlación entre cantidad y elevación de marcadores bioquímicos de lisis eritrocitaria fueron los glóbulos rojos tipo III de CD 59, aunque la asociación haya sido débil y solamente se haya presentado para dos marcadores bioquímicos (DHL y reticulocitos). Llamó la atención que aunque el predominio celular encontrado fueron células de tipo II tanto para CD 55 como para CD 59, no hubo diferencias al menos estadísticamente significativas entre cantidad de una población y severidad bioquímica de la enfermedad por lo que deben de haber otros factores que influyan en el condicionamiento de hemólisis además de las alteraciones fenotípicas celulares. Pero no así para los eritrocitos III CD 59, cuya cantidad por si sola guarda correlación directamente proporcional con la severidad de la lisis eritrocitaria.

La limitaciones a este trabajo pueden ser varias, pero es la serie de pacientes mas grande con HPN y a partir del cual podríamos iniciar para el posterior planteamiento de estudios prospectivos.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Young N, Maciejewski J The Pathophysiology of Acquired Aplastic Anemia N Engl J Med 1997; **336**: 1365-72.
- 2 Araten D, Nafa K. Clonal Populations of Hematopoietic Cells With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Genotype and Phenotype are Present in Normal Individuals Proc Natl Acad Sci USA 1999; **96**: 5209-14
- 3 Rosti V The Molecular Basis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Haematologica 2000; **85**: 82-87
- 4 Chrobák L Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (Membrane Defect, Patogenesis, Aplastic Anemia, Diagnosis) Acta Medica (Hradec Kralove) 2000; **43**: 3-9
- 5 Ninomiya H, Kawashima Y Complement-induced Procoagulant Alteration of Red Blood Cell Membranes With Microvesicle Formation in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (PNH): Implication for Thrombogenesis in PNH. Br J Haematol 1999, **106**: 224-31
- 6 Hugel B, Socié G Elevated Levels of Circulating Procoagulant Microparticles in Patients With Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Aplastic Anemia Blood 1999, **93**: 3451-56
- 7 Kanai N, Vreeke T, Parker C Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Análisis of the Effects of Mutant PIG-A on Gene Expresión Am J Hematol 1999; **61**: 221-31
- 8 Iwanaga M, Furukawa K Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria Clones in Patients with Myelodysplastic Syndromes Br J Haematol 1998, **102**: 465-74
- 9 Richards S, Rawstron A. Application of Flow Cytometry to the Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Cytometry 2000; **42**: 223-33
- 10 Benz E. Clonal Variation, Autoimmunity, and Neoplasia: An Ecology Lesson from Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Ann Intern Med 1999; **131**: 467-8
- 11 Nakakuma H. Mechanism of Intravascular Hemolysis in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH). Am J Hematol 1996; **53**: 22-9.
- 12 Dunn D, Tanawattanacharoen P Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Cells in Patients With Bone Marrow Failure Syndromes Ann Intern Med 1999, **131**: 401-8

13. Socié G, Rosenfeld S Late Clonal Disease of Treated Aplastic Anemia. *Semin Hematol* 2000; **37**: 91-101
14. Rosse W The Natural History of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Rev Invest Clin* 1997; **49 (supl 1)**: 8-9
15. Góngora-Biachi R, González-Matínez P Historia Natural de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna en Adolescentes, Adultos y en la Edad Pediátrica: La Experiencia Mexicana *Sangre* 1997; **42**: 171-7
16. Hillmen P, Lewis S. Natural History of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria *N Engl J Med* 1995, **333**: 1253-8
17. Jégo P, Le Strat A. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Efficacy of Prolonged Treatment With Granulocyte Colony-Stimulating Factor *Blood* 1997, **90**: 2841-3
18. Nishimura J, Murakami Y Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: An Acquired Genetic Disease. *Am J Hematol* 1999, **62**: 175-82
19. Beutler E, Luzzatto L. Hemolytic Anemia *Semin Hematol* 1999; **36**: 38-47
20. Bemba M, Guardiola P Bone Marrow Transplantation for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria *Br J Haematol* 1999; **105**: 366-68
21. Wendell R. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria as a Molecular Disease *Medicine* 1997, **76**: 63-93
22. Lee, et al. *Wintrobe's, Clinical Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins 1999, 10a. Edición pp 1265
23. Socié G, Yves J. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria long-term follow-up and prognostic factors. *The lancet* 1996; **348**: 573-77.
24. Góngora-Biachi PA, Khoury L, Dillman E, Hurtado-Monroy R. Relación entre los sistemas de hemólisis y las variaciones celulares en hemoglobinuria paroxística nocturna. *Sangre* 1984; **29**: 384-90

# ANEXOS

## ANEXO 1

Aunque la prueba de Ham es la mayormente utilizada para tamizaje diagnóstico de HPN, se ha demostrado que ésta no es lo suficientemente sensible y específica como la citometría de flujo, la cual al ser plenamente cuantitativa, solo podría dar resultados falsos negativos en presencia de factores externos como hemotransfusiones recientes<sup>9</sup>. En un análisis realizado por Góngora-Biachi et al, la sensibilidad obtenida fue de 90% para la prueba de inulina, y 80% para la prueba de Ham y sucrosa respectivamente; e inclusive se ha demostrado positividad a éstas pruebas en un 30% de los pacientes con anemia aplásica y en 10% de pacientes con síndrome mielodisplásico siendo por tanto no específica.<sup>24</sup> Es por ello que consideraremos a pacientes con “alta sospecha” a aquellos que se les demuestre hemólisis no mediada por anticuerpos mediante indicadores como hemoglobina, bilirrubinas, DHL, retis y productos de metabolismo de hemoglobina en orina, siendo finalmente nuestro estándar de oro la citometría de flujo.

## ANEXO 2

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D F , a \_\_\_de\_\_\_\_\_ de 2000

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado PRESENTACIÓN BIOQUÍMICA E INMUNOFENOTÍPICA EN PACIENTES CON HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA, registrado ante el comité local de investigación médica con el número 2001-690-0045. El objetivo de este estudio es evaluar si existe una relación entre, los resultados de laboratorio y el tipo de células HPN (I, II ó III), para con ello poder establecer relaciones al respecto del curso clínico y pronostico mas exacto de su padecimiento

Se me ha explicado que mi participación consistirá en admitir la toma de una muestra sanguínea de aproximadamente 15 ml

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

- La toma de una muestra sanguínea
- El beneficio de poder saber el curso clínico de mi padecimiento y por lo tanto un pronostico mas exacto

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto

El investigador principal me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre, matricula y firma del investigador

Testigo

Testigo



ANEXO 3

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Paciente: \_\_\_\_\_ Filiación \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Tratamiento base \_\_\_\_\_

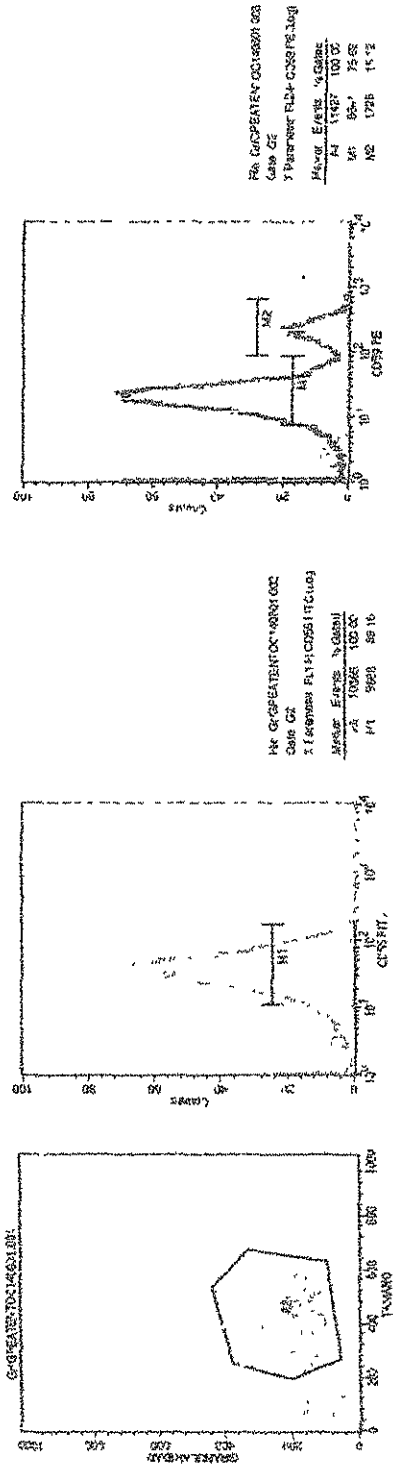
Otras patologías \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Laboratorios

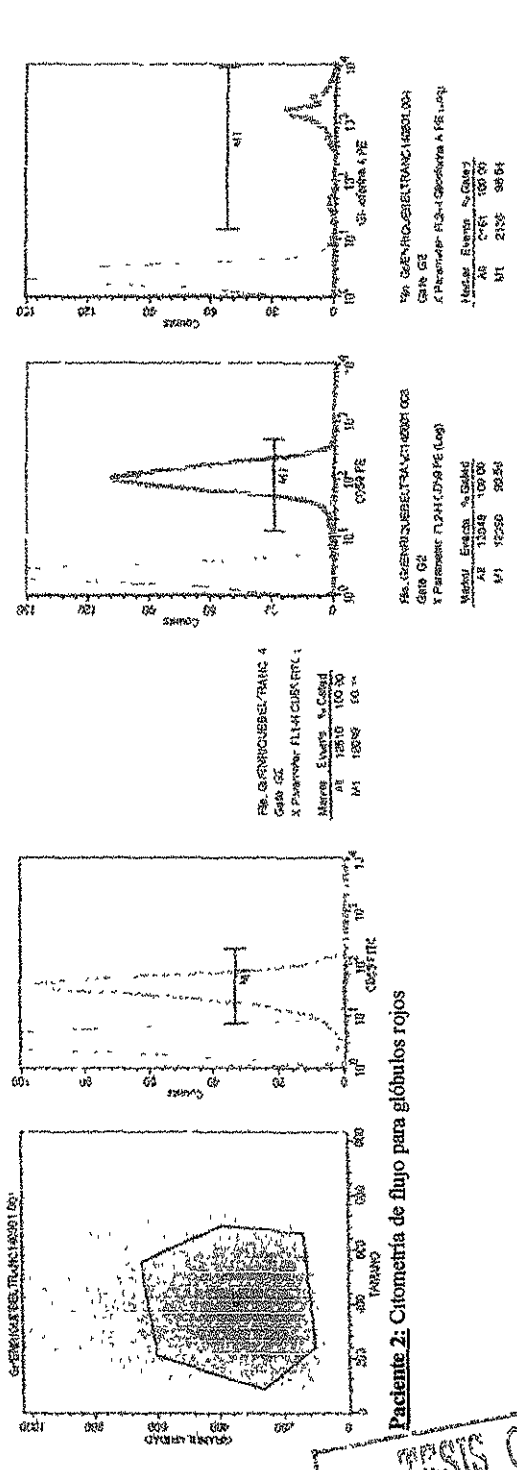
Hb:	_____	Análisis de citometría de Flujo
Leucocitos.	_____	_____
Plaquetas	_____	_____
DHL	_____	_____
Bilirrubinas	_____	_____
Reticulocitos	_____	_____
Ham	_____	
Sucrosa	_____	
Inulina	_____	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

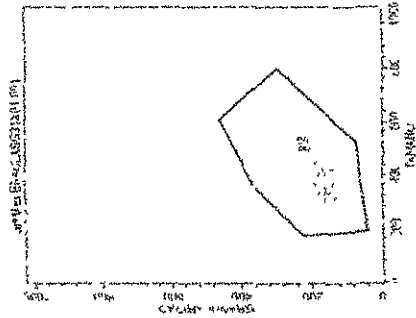
# ANEXO 4



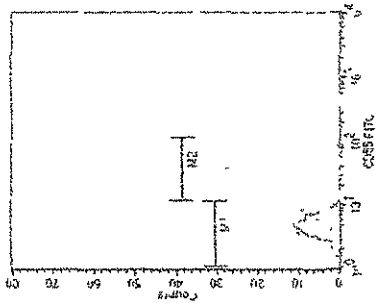
**Paciente 1: Citometría de flujo para glóbulos rojos**



TESIS CON FALLA DE ORIGE

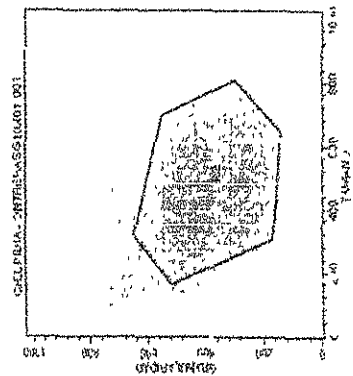


HEMOPARABLASTIC (R1) 240  
 Canal 02  
 A Parametro FLUORESCENCIA R1  
 Histograma de la muestra  
 Muestra: 240  
 M1 84 0.76  
 M2 132 15.13  
 M3 246 22.51

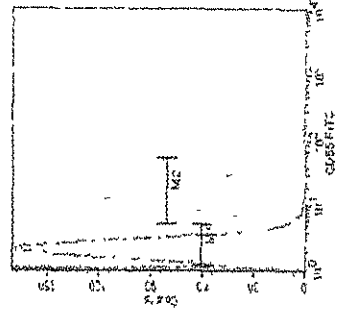


HEMOPARABLASTIC (R1) 300  
 Canal 02  
 A Parametro FLUORESCENCIA R1  
 Histograma de la muestra  
 Muestra: 300  
 M1 282 3.40  
 M2 508 14.87

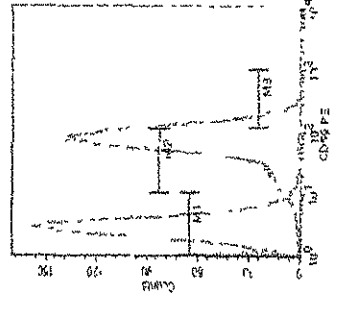
**Paciente 3:** Citometria de flujo para glóbulos rojos



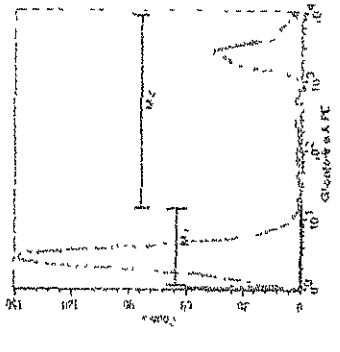
HEMOPARABLASTIC (R1) 300  
 Canal 02  
 A Parametro FLUORESCENCIA R1  
 Histograma de la muestra  
 Muestra: 300  
 M1 282 3.40  
 M2 508 14.87



HEMOPARABLASTIC (R1) 300  
 Canal 02  
 A Parametro FLUORESCENCIA R1  
 Histograma de la muestra  
 Muestra: 300  
 M1 282 3.40  
 M2 508 14.87

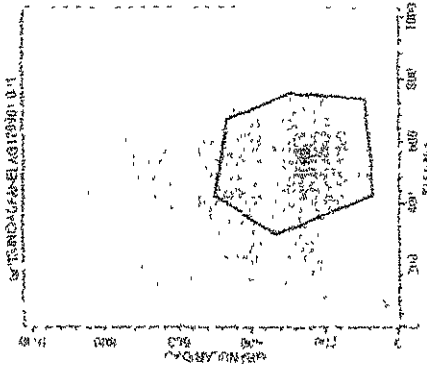


HEMOPARABLASTIC (R1) 300  
 Canal 02  
 A Parametro FLUORESCENCIA R1  
 Histograma de la muestra  
 Muestra: 300  
 M1 282 3.40  
 M2 508 14.87

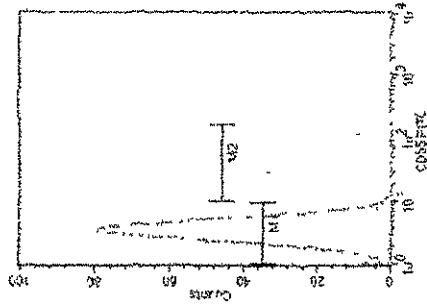


HEMOPARABLASTIC (R1) 300  
 Canal 02  
 A Parametro FLUORESCENCIA R1  
 Histograma de la muestra  
 Muestra: 300  
 M1 282 3.40  
 M2 508 14.87

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

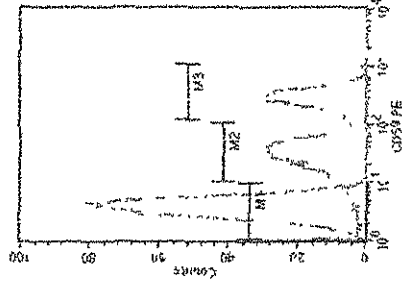


Paciente 5: Citometría de flujo para glóbulos rojos



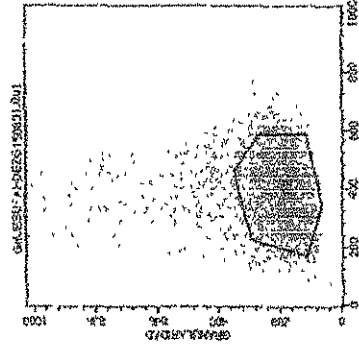
File: GSRINCAJ-APELLAS1.K  
Gate: G2  
Parameter: FL1-HCD06 FITC1

Match	Events	% Count
M1	268	7.16
M2	4382	92.84

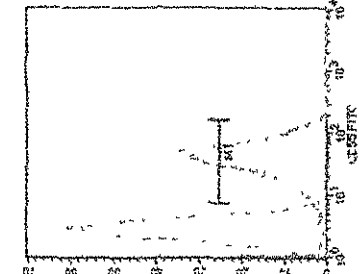


File: GSRINCAJ-APELLAS1.K  
Gate: G2  
Parameter: FL2-HCD06 PE10x

Match	Events	% Count
M1	634	6.33
M2	4087	53.62
M3	2742	36.07

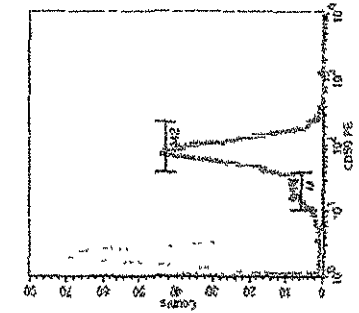


Paciente 6: Citometría de flujo para glóbulos rojos



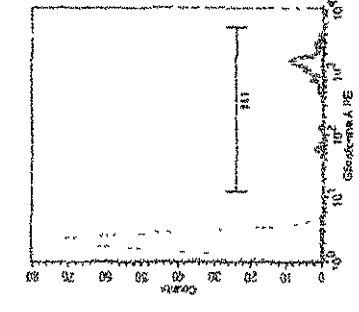
File: GSRINCAJ-APELLAS1.K  
Gate: G2  
Parameter: FL1-HCD06 FITC10x

Match	Events	% Count
M1	4672	1.420
M2	4672	1.420



File: GSRINCAJ-APELLAS1.K  
Gate: G2  
Parameter: FL2-HCD06 PE10x

Match	Events	% Count
M1	1034	9.12
M2	4220	74.88

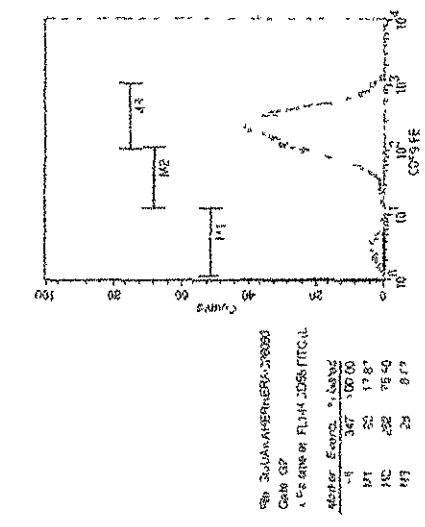
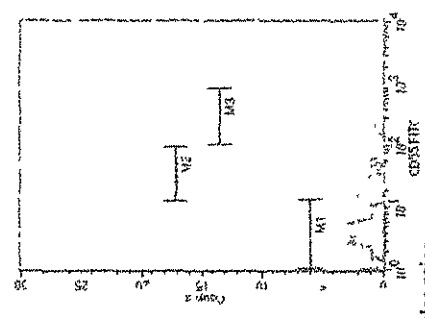
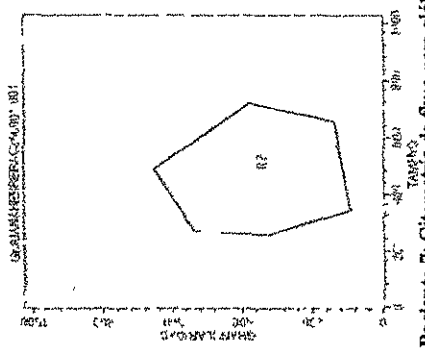


File: GSRINCAJ-APELLAS1.K  
Gate: G2  
Parameter: FL2-HCD06 PE10x

Match	Events	% Count
M1	634	100.00
M2	634	100.00

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





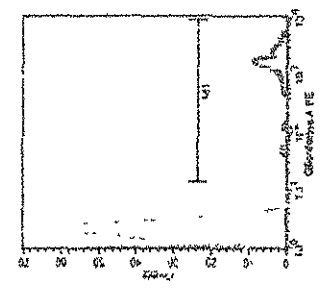
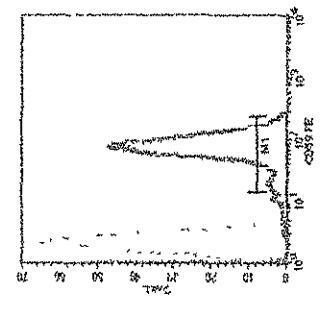
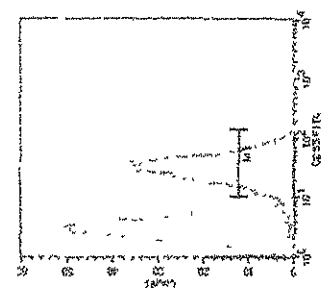
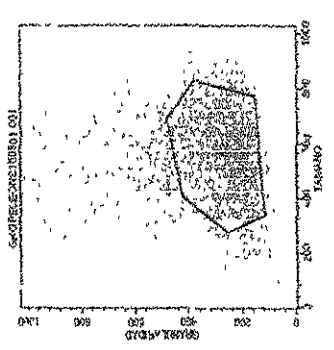
5th de JUAN AHERNBERG 270803  
 Caso 07  
 4 Es tipo de FL34 CD35 FITC L

Marker	Event	%	Count
M1	52	17.8%	100
M2	292	15.4%	100
M3	25	8.1%	100

9th de JUAN AHERNBERG 02-2001 7  
 Caso 06  
 4 Es tipo de FL34 CD35 FITC L

Marker	Event	%	Count
M1	25	1.4%	100
M2	183	1.1%	100
M3	807	8.1%	100

**Paciente 7: Citometría de flujo para glóbulos rojos**



9th de JUAN AHERNBERG 01-2002  
 Caso 06  
 4 Es tipo de FL34 CD35 FITC II 030

Marker	Event	%	Count
M1	172	1.0%	20
M2	434	2.6%	51

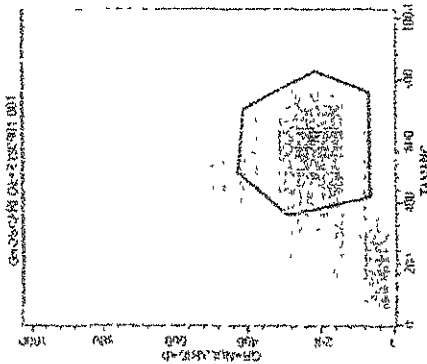
9th de JUAN AHERNBERG 02-2003  
 Caso 03  
 4 Es tipo de FL34 CD35 PE II 007

Marker	Event	%	Count
M1	46	1.0%	10
M2	4650	10.3%	225

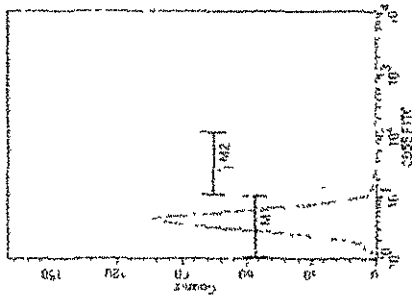
9th de JUAN AHERNBERG 03-2004  
 Caso 06  
 4 Es tipo de FL34 CD35 ALTA PE II 051

Marker	Event	%	Count
M1	758	1.0%	100
M2	740	9.8%	100

**Paciente 8: Citometría de flujo para glóbulos rojos**

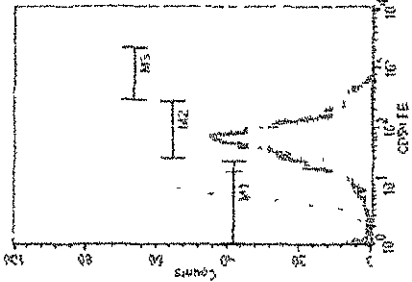


**Paciente 9: Citometría de flujo para glóbulos rojos**



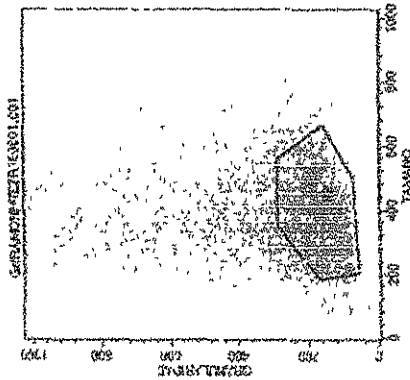
File: GANSECARIL-DZ-160901  
Gate: G2  
% Parameter: FL4-CD45-APC

Meas. Events	% Gated
M1	5280 100.00
M2	305 4.34
M3	690 95.36

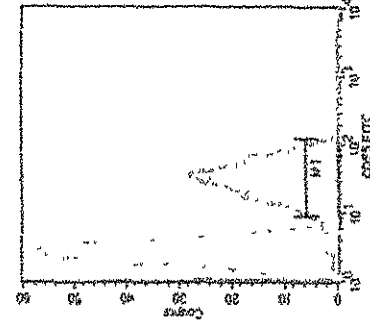


File: GANSECARIL-DZ-160901  
Gate: G2  
% Parameter: FL2-H-CD45-PE

Meas. Events	% Gated
M1	1492 16.61
M2	6894 73.34
M3	345 3.65

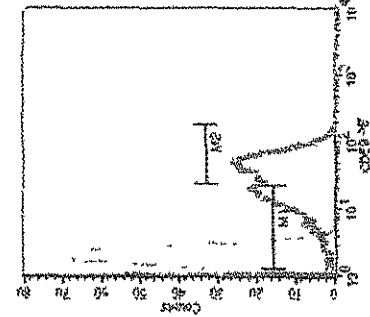


**Paciente 10: Citometría de flujo para glóbulos rojos**



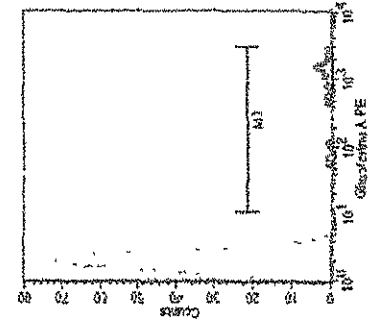
File: GANSECARIL-DZ-160901  
Gate: G2  
% Parameter: FL4-CD45-APC

Meas. Events	% Gated
M1	4679 100.00
M2	41 0.95



File: GANSECARIL-DZ-160901  
Gate: G2  
% Parameter: FL2-H-CD45-PE

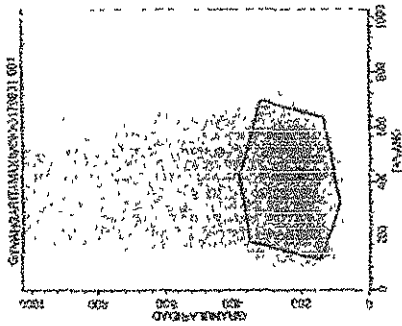
Meas. Events	% Gated
M1	1608 100.00
M2	2469 45.53
M3	2962 51.64



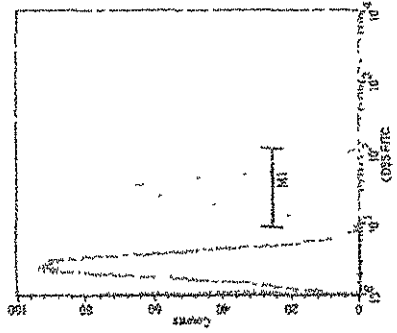
File: GANSECARIL-DZ-160901  
Gate: G2  
% Parameter: FL2-H-CD45-APC

Meas. Events	% Gated
M1	250 100.00
M2	222 87.24

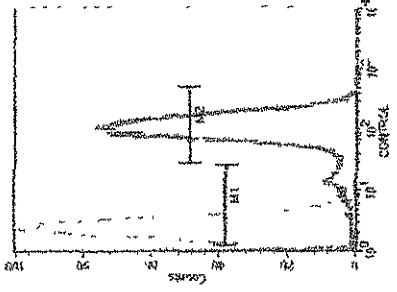
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



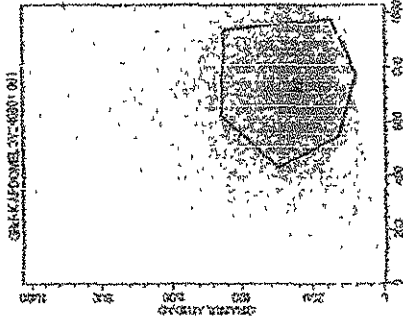
**Paciente 11: Citometria de flujo para globulos rojos**



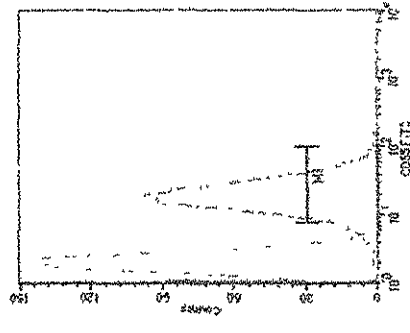
File: G:\ANALIZAS\TAMA\CM\CM007190  
 Gate: G2  
 Plot: Histogram FLUORESCENCIA vs. Counts  
 Marker: Events % Gated  
 M1 4824 100.00  
 M1 8266 94.17



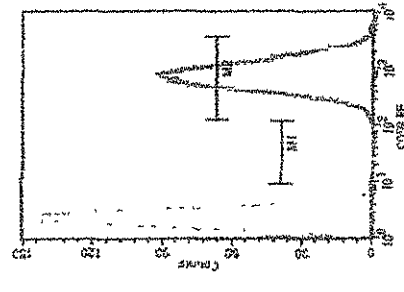
File: G:\ANALIZAS\TAMA\CM\CM007190  
 Gate: G2  
 Plot: Histogram FLUORESCENCIA vs. Counts  
 Marker: Events % Gated  
 M1 10193 100.00  
 M2 2575 99.95  
 M2 12 0.07



**Paciente 12: Citometria de flujo para globulos rojos**

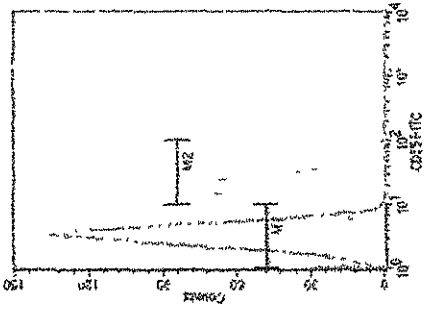
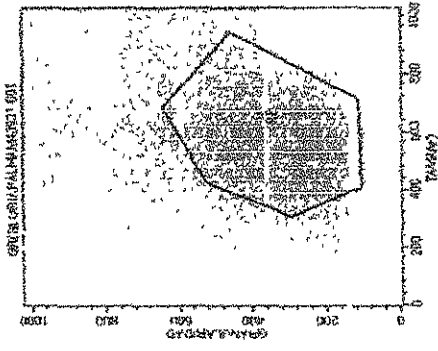


File: G:\ANALIZAS\TAMA\CM\CM007190  
 Gate: G2  
 Plot: Histogram FLUORESCENCIA vs. Counts  
 Marker: Events % Gated  
 M1 12247 100.00  
 M1 12247 100.00



File: G:\ANALIZAS\TAMA\CM\CM007190  
 Gate: G2  
 Plot: Histogram FLUORESCENCIA vs. Counts  
 Marker: Events % Gated  
 M1 15211 100.00  
 M2 21 0.16  
 M2 18487 98.88

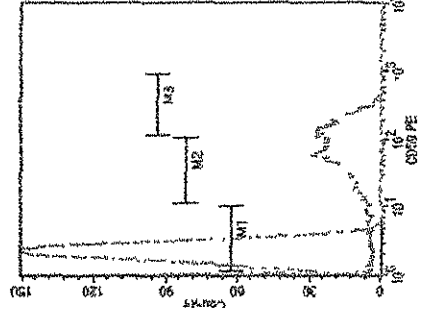
**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



Pa. GRUCORIN PALMAREZ 001  
 Gate G2  
 Y-Axis: FL1-H CD-45-ITC  
 X-Axis: GR45-ITC

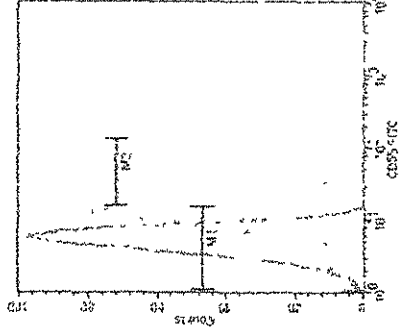
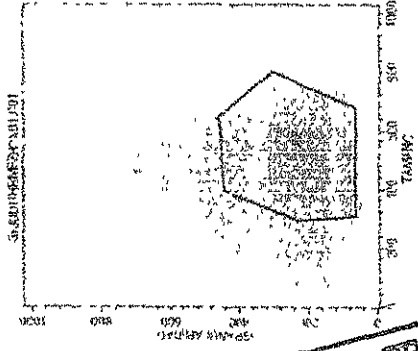
Gate	Events	% Gated
M1	10708	100.00
M2	1887	18.56
M3	8747	81.52

Paciente 13: Citometria de flujo para glóbulos rojos



Pa. GRUCORIN PALMAREZ 001  
 Gate G2  
 Y-Axis: FL1-H CD45-PE  
 X-Axis: CD45-PE

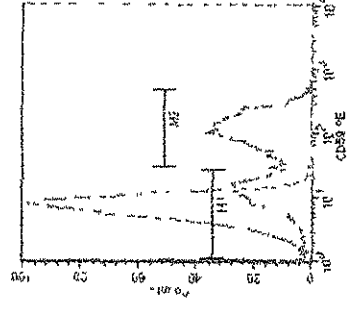
Gate	Events	% Gated
M1	7620	100.00
M2	822	10.82
M3	2629	47.75
M3	1747	22.85



Pa. GRUCORIN PALMAREZ 001  
 Gate G2  
 Y-Axis: FL1-H CD45-ITC  
 X-Axis: GR45-ITC

Gate	Events	% Gated
M1	16822	100.00
M2	5722	34.21
M3	2982	18.44

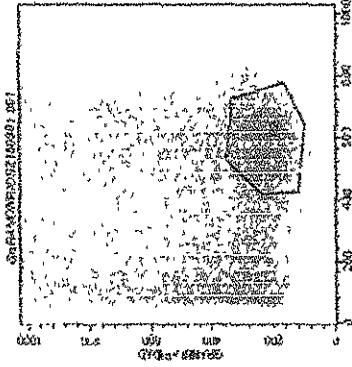
Paciente 14: Citometria de flujo para glóbulos rojos



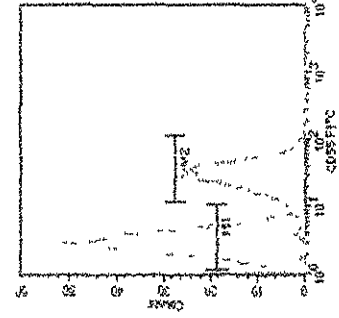
Pa. GRUCORIN PALMAREZ 001  
 Gate G2  
 Y-Axis: FL1-H CD45-PE  
 X-Axis: CD45-PE

Gate	Events	% Gated
M1	3720	100.00
M2	3765	10.12
M3	5457	14.67

TESIS CON FALLA DE ORIENTACION

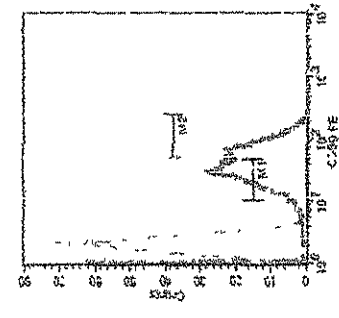


Paciente 15: Citometría de flujo para glóbulos rojos



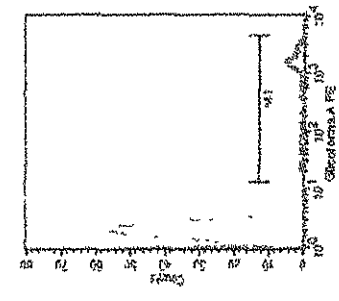
File: GCPARAMCIBICSCV60001.D02  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CD45-APC (log)

Marker	Events	% Gated
M1	3187	100.00
M2	282	7.49
M3	2895	89.80



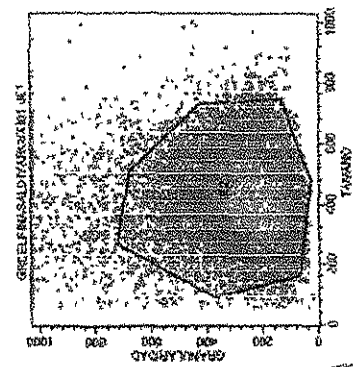
File: GCPARAMCIBICSCV60001.D03  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CD45 PE (Log)

Marker	Events	% Gated
M1	4061	100.00
M2	2794	68.82
M3	1183	31.68

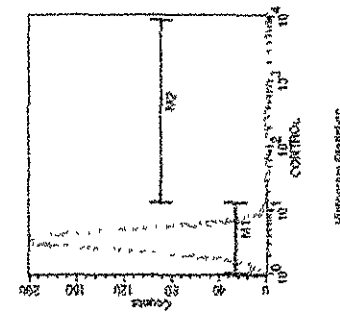


File: GCPARAMCIBICSCV60001.D04  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H Global CD45-A PE (log)

Marker	Events	% Gated
M1	675	100.00
M2	167	24.76
M3	593	87.24

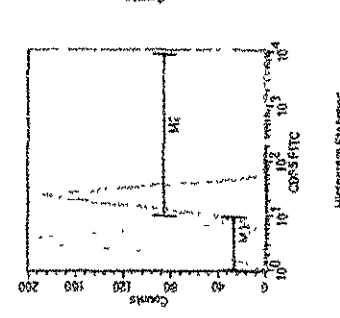


Paciente 16: Citometría de flujo para glóbulos rojos



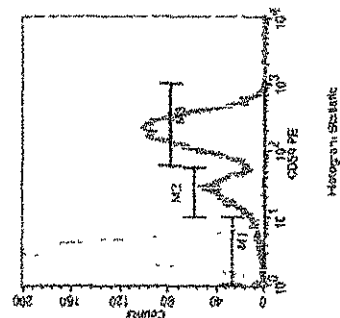
Histogram Statistics  
 File: GCPARAMCIBICSCV60001.D02  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CONTROL

Marker	Events	% Gated
M1	997	100.00
M2	542	54.36



Histogram Statistics  
 File: GCPARAMCIBICSCV60001.D03  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CD45 FITC

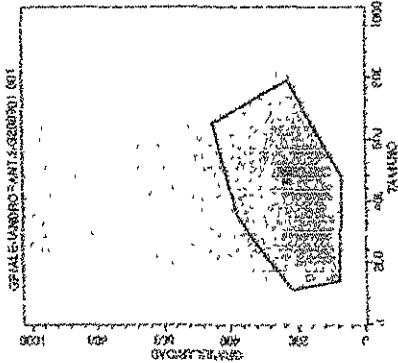
Marker	Events	% Gated
M1	100	100.00
M2	725	72.50
M3	9154	91.54



Histogram Statistics  
 File: GCPARAMCIBICSCV60001.D04  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CD45 PE

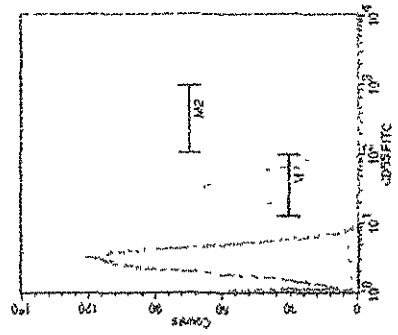
Marker	Events	% Gated
M1	2301	100.00
M2	7377	32.06
M3	285	12.43

TESIS CON FALLA DE OPIGEN

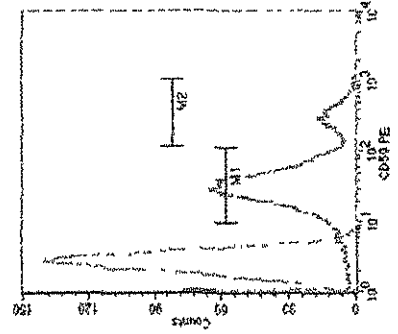


**Paciente 17: Citometria de flujo para glóbulos rojos**

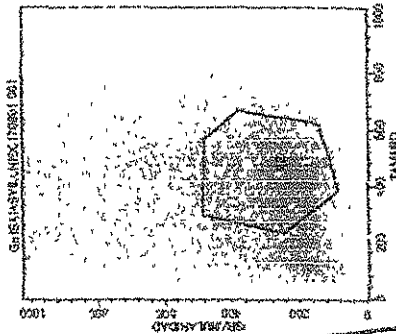
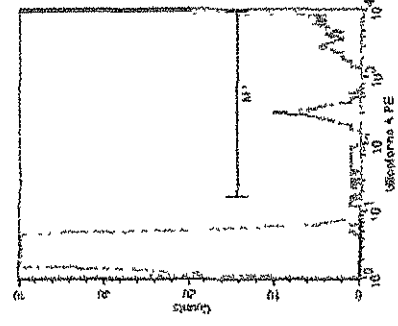
File: GRVIALEJANDRO-SANTISG030801402  
 Gate: GP  
 X Parameter: FL1-H-CD35 FITC (Log)  
 Marker: Events % Gated  
 M1 11370 100.00  
 M2 10249 91.34



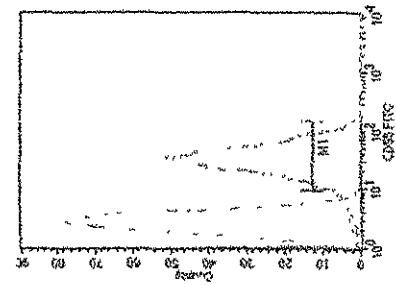
File: GRVIALEJANDRO-SANTISG030801003  
 Gate: GP  
 X Parameter: FL2-W-CD35 PE (Log)  
 Marker: Events % Gated  
 M1 12375 100.00  
 M2 9042 74.87



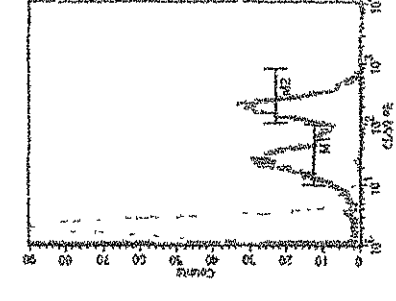
File: GRVIALEJANDRO-SANTISG030901004  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL2-W-CD35 PE (Log)  
 Marker: Events % Gated  
 M1 1446 100.00  
 M2 1420 98.20



**Paciente 18: Citometria de flujo para glóbulos rojos**

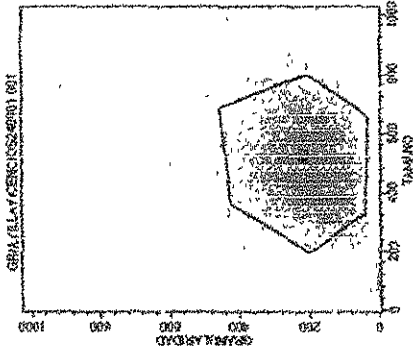


File: GRVIALEJANDRO-SANTISG030901007  
 Gate: GP  
 X Parameter: FL1-H-CD35 FITC (Log)  
 Marker: Events % Gated  
 M1 7053 100.00  
 M2 6810 97.94

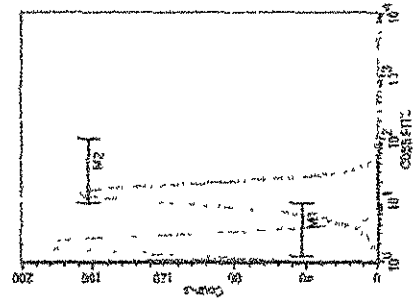


File: GRVIALEJANDRO-SANTISG030901003  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL2-W-CD35 PE (Log)  
 Marker: Events % Gated  
 M1 1446 100.00  
 M2 1420 98.20

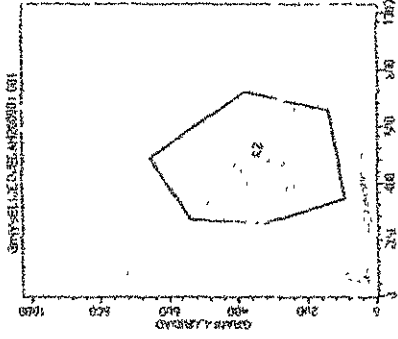
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



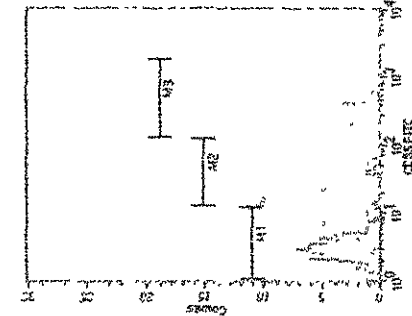
Paciente 19: Citometría de flujo para glóbulos rojos



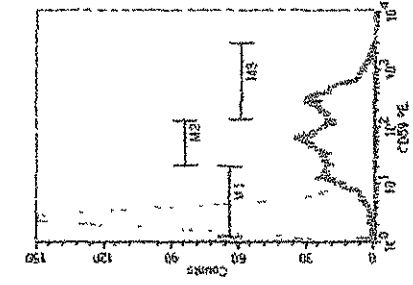
File: GRAYVILAV\_CROSS240801.D00  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CROSS FITC (log)  
 Mean of Events % Gated  
 All 1832 100.00  
 M1 8032 31.14  
 M2 13173 68.87



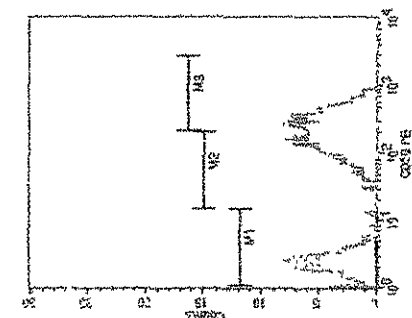
Paciente 20: Citometría de flujo para glóbulos rojos



File: GRAYSELICEUESAI-2800  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CROSS FITC-UR  
 Mean of Events % Gated  
 All 1550 100.00  
 M1 594 38.10  
 M2 654 43.14  
 M3 252 16.76

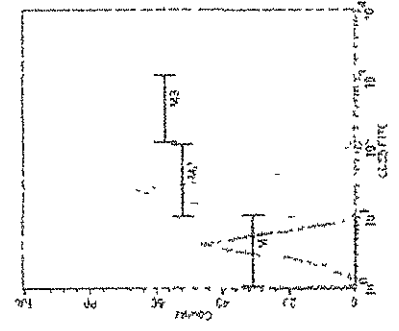
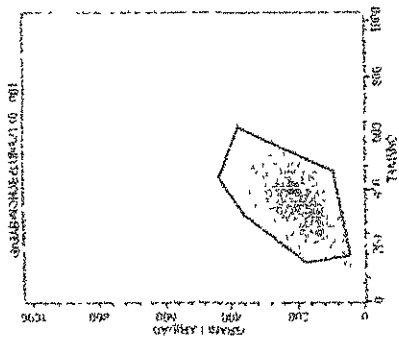


File: GRAYVILAV\_CROSS10026  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CROSS PE  
 Mean of Events % Gated  
 All 11022 100.00  
 M1 2857 20.48  
 M2 4729 42.91  
 M3 3009 26.59

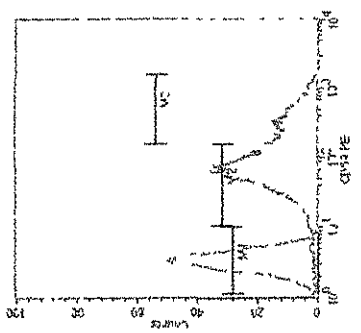


File: GRAYSELICEUESAI-400001.G2  
 Gate: G2  
 X Parameter: FL1-H CROSS PE (Log)  
 Mean of Events % Gated  
 All 1261 100.00  
 M1 451 35.79  
 M2 639 50.67  
 M3 171 13.54

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

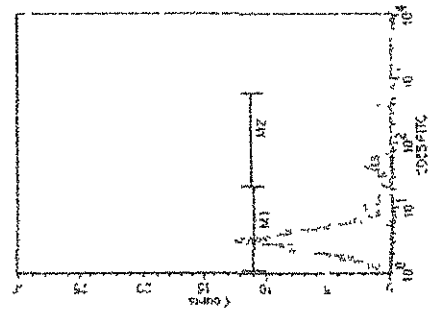
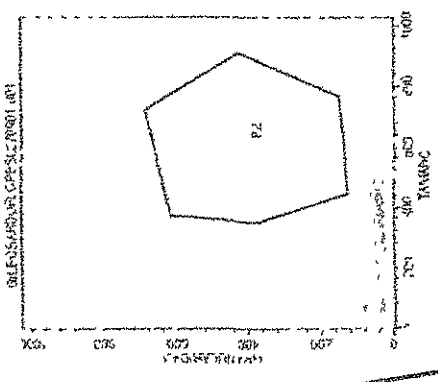


Pac GABINO CHELLAMAZO J.C.  
 Caso 02  
 X Parameter FL-H-CDS5 FITC  
 Nombre Eventos % Gated  
 M1 1170 13.52  
 M2 761 86.67  
 M3 0 0.41

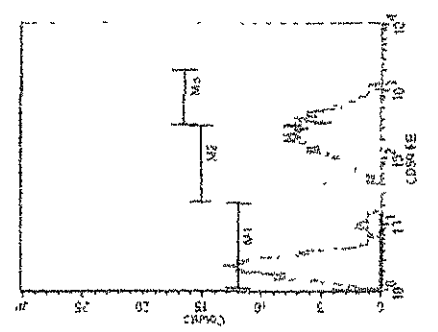


Pac GABINO CHELLAMAZO J.C.  
 Caso 02  
 X Parameter FL-H-CDS5 PE V-L  
 Nombre Eventos % Gated  
 M1 175 2.61  
 M2 435 69.09  
 M3 185 27.82

**Paciente 21:** Citometría de flujo para glóbulos rojos



Pac GLEIBER OROPELILLO  
 Caso 02  
 X Parameter FL-H-CDS5 FITC  
 Nombre Eventos % Gated  
 M1 473 100.00  
 M2 334 70.81  
 M3 138 29.18

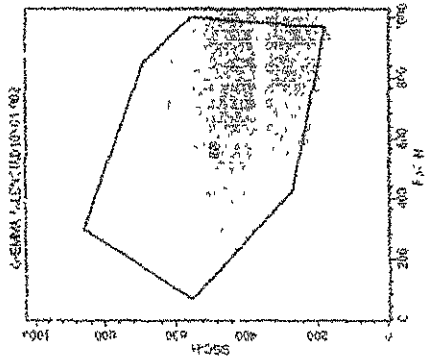


Pac GLEIBER OROPELILLO  
 Caso 02  
 X Parameter FL-H-CDS5 PE V-L  
 Nombre Eventos % Gated  
 M1 327 100.00  
 M2 4 0.72  
 M3 959 85.45  
 M4 404 35.92

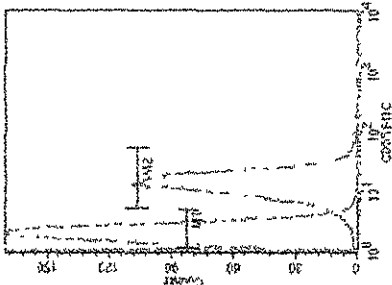
**Paciente 22:** Citometría de flujo para glóbulos rojos

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



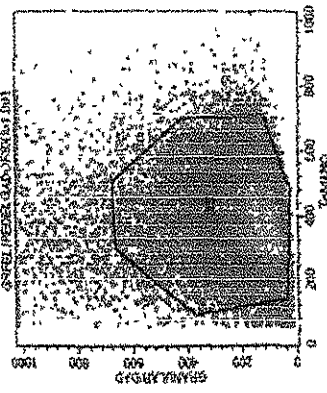


Paciente 23: Citometría de flujo para glóbulos rojos

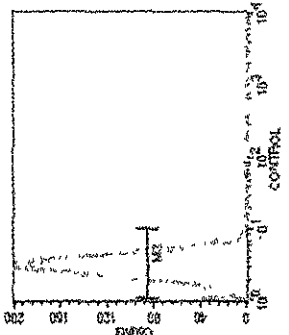


File: GEI/MVA/LEN/CD117-FLC  
Gate: G2  
X Parameter: F.L1+CD117-FLC

Mask	Event %	Gate
M1	4.7%	100.00
M2	11.5%	94.2%

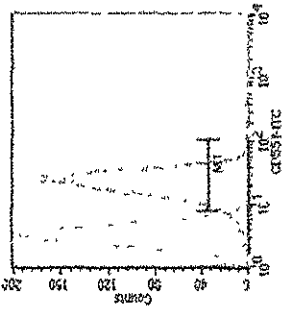


Paciente 24: Citometría de flujo para glóbulos rojos



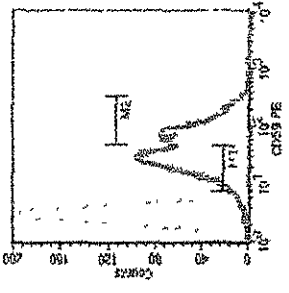
File: GEI/MVA/LEN/CD117-FLC  
Gate: G2  
X Parameter: F.L1+CD117-FLC

Mask	Event %	Gate
M1	4.7%	100.00
M2	11.5%	94.2%



File: GEI/MVA/LEN/CD33-ITC  
Gate: G2  
X Parameter: F.L1+CD33-ITC

Mask	Event %	Gate
M1	4.7%	100.00
M2	11.5%	94.2%

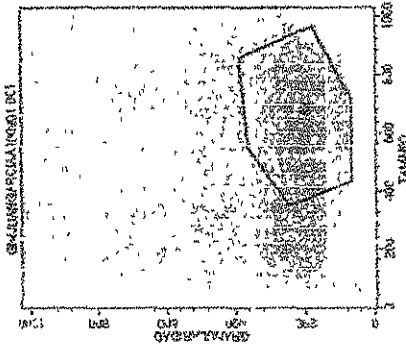


File: GEI/MVA/LEN/CD33-PE  
Gate: G2  
X Parameter: F.L1+CD33-PE

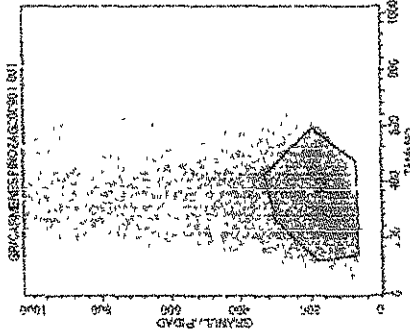
Mask	Event %	Gate
M1	4.7%	100.00
M2	11.5%	94.2%

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

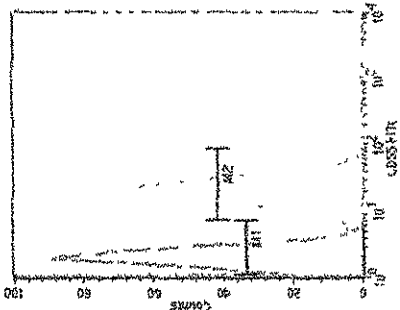
ESTA TESIS NO HA DE LA RESERVA



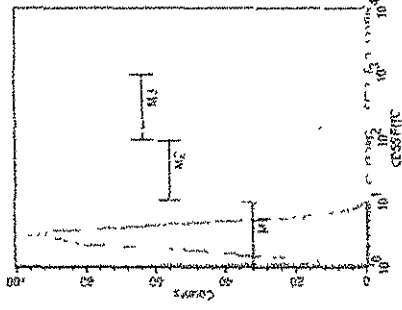
Paciente 25: Citometria de flujo para glóbulos rojos



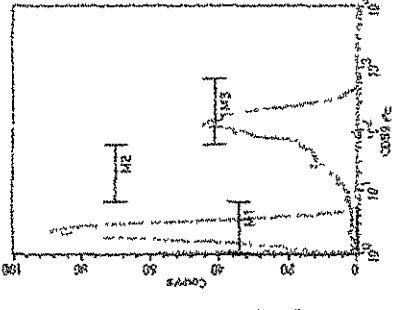
Paciente 26: Citometria de flujo para glóbulos rojos



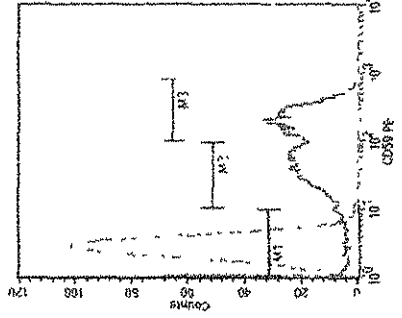
FE GRUBLA NGRVCJA X0005A LG  
 Gato G2  
 X Parameter FL1-H CD55-ITC (L)  
 Marker Events % Gate  
 M1 7253 100.00  
 M2 300 4.33  
 M3 7254 99.67



FE GRUBLA NGRVCJA X0005A LG  
 Gato G2  
 X Parameter FL1-H CD55-ITC (L)  
 Marker Events % Gate  
 M1 5537 100.00  
 M2 125 2.25  
 M3 4576 81.75  
 M4 803 14.11

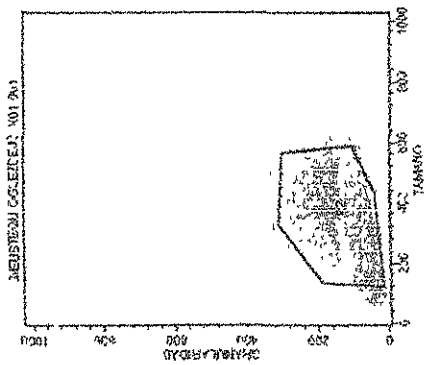


FE GRUBLA NGRVCJA X0005A LG  
 Gato G2  
 X Parameter FL2-H CD59-PE (L)  
 Marker Events % Gate  
 M1 286 3.68  
 M2 1877 23.69  
 M3 6164 78.36

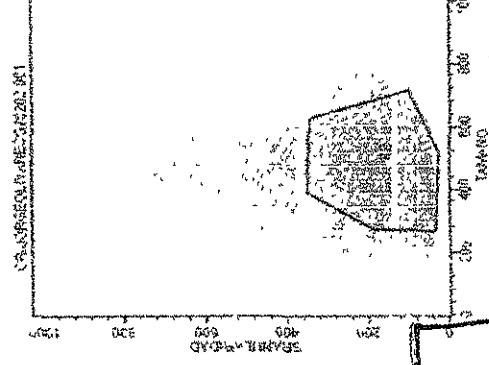


FE GRUBLA NGRVCJA X0005A LG  
 Gato G2  
 X Parameter FL2-H CD59-PE (L)  
 Marker Events % Gate  
 M1 943 100.00  
 M2 515 5.45  
 M3 854 89.54  
 M4 874 9.17

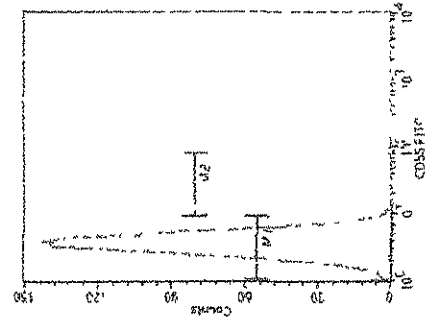
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



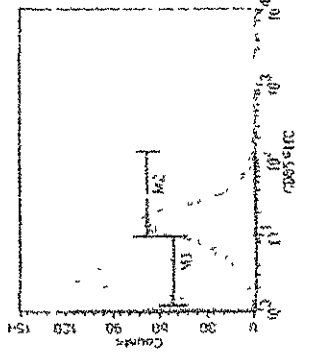
**Paciente 27:** Citometria de flujo para glóbulos rojos



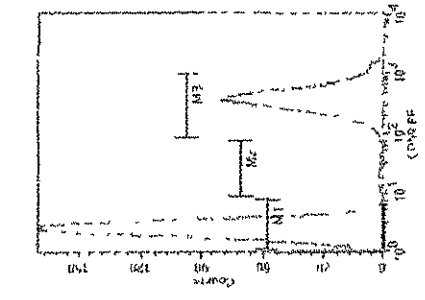
**Paciente 28:** Citometria de flujo para glóbulos rojos



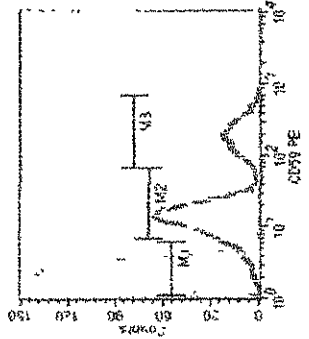
File: FLOWCITATION\CD44.FITC  
 Gate: G2  
 > Parameter: FITC-CD44-FITC  
 Marker Events %Gated  
 M1 7531 05.00  
 M2 385 4.85  
 M3 7121 94.85



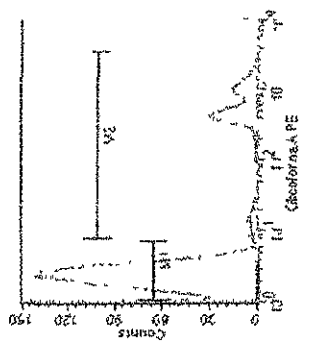
File: FLOWCITATION\CD44.FITC  
 Gate: G2  
 > Parameter: FITC-CD44-FITC  
 Marker Events %Gated  
 M1 1160 100.00  
 M2 276 24.24  
 M3 7148 632.72



File: FLOWCITATION\CD44.FITC  
 Gate: G2  
 > Parameter: FITC-CD44-FITC  
 Marker Events %Gated  
 M1 8276 100.00  
 M2 69 1.07  
 M3 8263 99.93



File: FLOWCITATION\CD44.FITC  
 Gate: G2  
 > Parameter: FITC-CD44-FITC  
 Marker Events %Gated  
 M1 1482 100.00  
 M2 5207 35.13  
 M3 2916 20.32



File: FLOWCITATION\CD44.FITC  
 Gate: G2  
 > Parameter: FITC-CD44-FITC  
 Marker Events %Gated  
 M1 3122 100.00  
 M2 194 6.21  
 M3 3734 119.59

**TESIS CON  
 TALLA DE ORIGEN**

31-03-2006 09:10:20

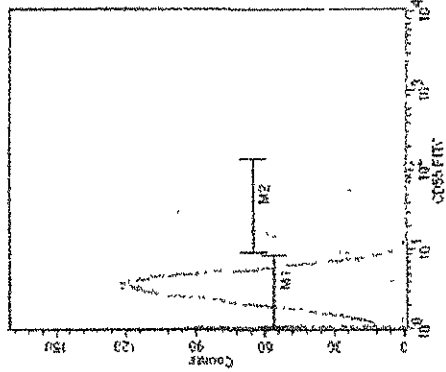
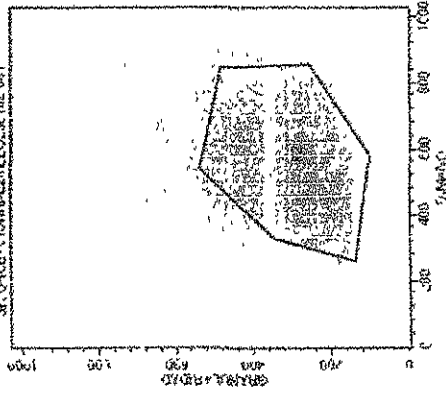


Fig. 29 ZONE EFICIENCIA DE ZUMEL0230102 002  
 Gate %  
 Parameter FLA-APC vs CD34-FITC

Number	Events	% of Total
M1	1337	100.00
M2	1780	9.04
M3	12417	69.38

Paciente 29: Citometria de flujo para glóbulos rojos

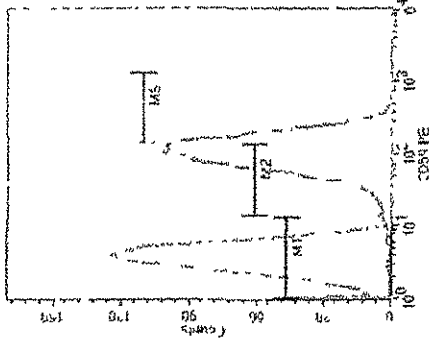


Fig. 29 ZONE EFICIENCIA DE ZUMEL0230102 003  
 Gate %  
 Parameter FLA-APC vs CD34-FITC

Number	Events	% of Total
M1	1437	100.00
M2	143	9.96
M3	1032	71.99
M4	3542	24.64

TESTIS CON  
 MALLA DE ORIGEN