

HPN Hemoglobinuria Paroxística Nocturna

Estudio de la enfermedad y sus tratamientos.

Paula I. Aparicio Morales



Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia Universidad de Sevilla

Grado en Farmacia

Trabajo de Fin de Grado

**Hemoglobinuria Paroxística Nocturna:
Estudio de la enfermedad y sus tratamientos**

Revisión bibliográfica

Paula Isabel Aparicio Morales

Departamento: Prácticas tuteladas

Tutora del trabajo: Doctora María del Mar Orta

Co-tutora Erasmus prácticas: Doctora Tiziana Falai

Sevilla, Julio de 2018

ACKNOWLEDGMENTS

I should like to express my appreciation to Dr. Rosario Notaro, Dr. Tiziana Falai and Dr. Michele Cecchi for proposing me such an interesting study topic, their kind help in the course of this work and for the hospitality shown to me during my stay at the Careggi Hospital in Florence (Italy), as well as the staff of the Pharmacy of the Hospital.

To my parents, my grandfather and my aunt Miriam for their unswerving support.

ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), term established by Enneking in 1925, is a rare, clonal, and acquired disease of the hematopoietic stem cells. Generally, it starts with a mutation in the PIG-A gene, causing a deficiency of membrane proteins, such as CD55 and CD59. However, recent studies reveal that the clonal architecture of the disease is far more complex.

Due to the deficiency of these proteins, there is an uncontrolled activation of the complement, which is associated with hemolysis and other clinical manifestations very variable among patients. PNH is also associated with aplastic anemia, in fact, it has been observed that both diseases are closely related, being able to derive one from the other over time. Because of the great variability of symptoms, the diagnosis of the disease has always been an arduous task. But this paper study a recent technique that has facilitated this work: flow cytometry.

Until recently, there were only two main therapies for patients with PNH; allogeneic bone marrow transplantation and supportive treatment against symptoms. But at the beginning of the millennium, Eculizumab, marketed as Soliris®, a humanized anti-C5 monoclonal antibody, protein of the complement system, was introduced, which has been a major advance in the treatment of the disease. As a result of its discovery, new strategies of complement inhibition have been investigated.

Due to the high morbimortality and the great impact on patients with PNH, the latest advances in research during the last decade could not be more encouraging.

Keywords: PIG-A gene, complement, hemolysis, bone marrow aplasia, Eculizumab

RESUMEN

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), término establecido en 1925 por Enneking, es una enfermedad rara, clonal y adquirida de las células madre hematopoyéticas. Generalmente se inicia con una mutación en el gen PIG-A, causando una deficiencia de proteínas membranales, como CD55 y CD59. Sin embargo, estudios más recientes ponen de manifiesto que la arquitectura clonal de la enfermedad es bastante más compleja.

Debido a la deficiencia de dichas proteínas, se produce una activación descontrolada del complemento, que se asocia a hemólisis y a otras manifestaciones clínicas muy variables entre pacientes. La HPN también se asocia a la anemia aplásica, de hecho, se ha observado que ambas enfermedades están estrechamente relacionadas, pudiendo derivar una en la otra con el tiempo.

A causa de la gran variabilidad de síntomas, el diagnóstico de la enfermedad ha sido siempre una ardua tarea. En este ensayo se estudia una técnica reciente que ha facilitado esta labor, la citometría de flujo.

Hasta hace poco, solo existían dos terapias principales para los pacientes con HPN; el trasplante alogénico de médula ósea y el tratamiento de apoyo contra los síntomas. Pero a principios del milenio, se introdujo en el esquema terapéutico el Eculizumab, comercializado como Soliris®, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-C5, proteína del sistema del complemento. Ha constituido un avance primordial para el tratamiento de la enfermedad, a raíz de su descubrimiento, se ha comenzado a investigar nuevas estrategias de inhibición del complemento.

Debido a la alta morbimortalidad y el gran impacto que supone la HPN en quien la padece, que se esté avanzando tanto en la última década resulta alentador.

Palabras clave: gen PIG-A, complemento, hemólisis, aplasia medular, Eculizumab

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- AA: Anemia Aplásica
- CAM: Complejo de Ataque de Membrana
- DAF: Factor Acelerador de la Degradación del Complemento
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol
- HPN: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna
- IRLM: Inhibidor de la Lisis Reactiva de la Membrana
- NGS: Next Generation Sequencing/ Secuenciación de Segunda Generación

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	4
3. METODOLOGÍA	4
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4.1. Etiología	5
4.1.1. Mutación genética.....	6
4.1.2. Vías de activación del sistema del complemento	7
4.1.3. Expansión del clon.....	8
4.1.4 Mosaicismo fenotípico HPN.....	11
4.2. Anemia Aplásica y HPN.....	12
4.3. Epidemiología.....	13
4.4. Manifestaciones clínicas.....	14
4.4.1. Anemia hemolítica.....	14
4.4.2. Hemoglobinuria	15
4.4.3. Tromboembolismo.....	16
4.4.4 Otros síntomas	17
4.4.5. Posibles complicaciones	18
4.5. Diagnóstico.....	18
4.6. Tratamiento.....	22
4.6.1. Eculizumab	22
4.6.2. Nuevas terapias	26
4.7. La HPN y el embarazo.....	29
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. INTRODUCCIÓN

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), también conocida como síndrome de Marchiafava-Michelli, es considerada una enfermedad rara y como tal, afecta únicamente a un número limitado de personas. En Europa, concretamente, se considera enfermedad rara cuando ésta afecta a una persona por cada dos mil habitantes.

Suelen ser crónicas y degenerativas, un 65% son graves e invalidantes, y aunque pueden aparecer en el momento del nacimiento, el 50% aparece durante la edad adulta. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen cerca de 7.000 enfermedades raras que afectan al 7% de la población mundial. En España hay aproximadamente 3 millones de personas afectadas. A pesar del gran número de enfermedades raras conocidas y de su incidencia en la población, a día de hoy se desconoce la causa de muchas de ellas debido a su complejidad (Federación Española de Enfermedades Raras, 2018 y Orphanet, 2012).

Los medicamentos utilizados para tratar este tipo de enfermedades reciben el nombre de medicamentos huérfanos, y no son desarrollados por las grandes industrias farmacéuticas bajo las condiciones habituales de comercialización debido a su alto coste y su bajo beneficio. Esto produjo la necesidad de proteger el derecho de los pacientes afectados por estas enfermedades a recibir tratamientos seguros y de calidad, por lo que el Parlamento Europeo y el Consejo de Europa aprobaron el Reglamento (CE) n° 141/2000, de 16 de diciembre de 1999, sobre medicamentos huérfanos en el que se establecieron una serie de incentivos para la industria a fin de estimular la investigación y desarrollo de dichos medicamentos.

A día de hoy, muchas de las enfermedades raras que existen no tienen una cura definitiva, por lo que sólo se pueden aplicar terapias paliativas y cuidados médicos para mejorar la calidad de vida y aumentar la esperanza de vida de los afectados. Adicionalmente, en numerosas ocasiones éstos se enfrentan a la dificultad del diagnóstico y a una carencia de información adecuada y actualizada. Es por ello, que estos pacientes son muy vulnerables en el terreno psicológico, social y económico, y no solo debe invertirse en investigación para ampliar los conocimientos sobre la enfermedad en cuestión, sino apostar por la integración social, profesional, y la independencia de los que la sufren (Orphanet, 2012).

Este es el caso de la HPN, cuyos síntomas asociados a la hemólisis y a la anemia tienen un gran impacto sobre el bienestar del paciente, ya que suelen necesitar frecuentes transfusiones para controlar los niveles de hemoglobina y de células sanguíneas (Hillmen *et al.*, 2004).

Además, el único fármaco (Eculizumab -Soliris®-) que existe actualmente para tratar la enfermedad tiene un coste tan elevado que fue catalogado por la revista Forbes en 2010 como el medicamento más caro del mundo, con un coste de 409.500 dólares al año (Herper, 2010). Pero afortunadamente, a día de hoy, se están realizando numerosas investigaciones, para encontrar un tratamiento aún más específico, eficaz y económico para la enfermedad, como algunos fármacos, aun no comercializados, que se estudiarán en apartados posteriores de este ensayo.

El término “Hemoglobinuria Paroxística Nocturna” fue establecido en 1925 por Enneking (Brodsky, 2017). El enfermo suele presentar *hemoglobinuria*, ya que la hemoglobina aparece en la orina tiñéndola de color oscuro, de forma repentina e irregular, es decir *paroxística*, y dado que el fenómeno ocurre de noche o a primera hora de la mañana se dice que es *nocturna* (The Aplastic Anemia and MDS International Foundation, 2017 y Orphanet, 2008).

Las primeras descripciones clínicas fueron las de William Gull en 1866 y Paul Strübing en 1882. Ambos observaron en diversos pacientes la presencia inusual y periódica, de un color rojo-marrón oscuro, en la orina. Gull, atribuyó dicha coloración a la presencia de la hematina, que había sido recientemente descubierta (Wendell, 2017). Sin embargo, años más tarde, Strübing, gracias a la descripción del caso de un joven carretero con crisis de hemoglobinurias matutinas (Ojeda, 2009), estableció que el pigmento causante era la hemoglobina, y que ésta era liberada por una destrucción intravascular de los eritrocitos. Incluso propuso que la causa de la enfermedad era que los eritrocitos al circular por los riñones sufrían hemólisis, debido a la acidosis sistémica producida por la acumulación de CO₂ durante la noche (Veerreddy, 2013 y Risco *et al.*, 2008), estableciendo así la HPN como una entidad clínica bien definida (Ojeda, 2009).

En 1911, Hijmans van den Bergh, demostró que los eritrocitos se lisaban tanto en la acidificación *in vitro* del suero de pacientes con HPN como de pacientes normales. Esto probó que la enfermedad se debía a que los eritrocitos eran anormales, y no al

suero. Además, pensó que quizás el sistema del complemento era el responsable de la lisis aunque no pudo comprobarlo (Wendell, 2017 y Risco *et al.*, 2008).

En ese mismo año, Ettore Marchiafava, Alessio Nazari, y posteriormente Micheli, estudiaron otros casos de HPN, “redescubriendo” así la enfermedad, a la que denominaron “Enfermedad de Marchiafava-Micheli”. Finalmente, años más tarde, J. Enneking, redefinió la enfermedad como *Haemoglobinuria Paroxysmalis Nocturna* (Ojeda, 2009 y Crosby, 1951).

No fue hasta finales de 1930, cuando casi de forma simultánea Thomas Hale Ham (en América), Dacie (en Inglaterra) y Jordon (en Holanda), confirmando la teoría de van-den Bergh, determinaron que los eritrocitos eran defectuosos presentando una mayor susceptibilidad a la lisis por el complemento, y confirmaron que la hemólisis era potenciada por la acidificación del medio (Ojeda, 2009 y Risco *et al.*, 2008). Además, Ham estableció el *test de hemólisis ácida*, prueba de diagnóstico que ha sido utilizada, al igual que la prueba de la sacarosa, antes de ser sustituida por la técnica actual, la citometría de flujo (Brodsky, 2017).

Otro de los componentes clínicos importantes de la HPN, las trombosis, fueron establecidas como parte constitutiva esencial de la HPN en 1953 por Crosby. Y en 1978 Kruatrachue en Tailandia estableció la relación de la HPN con la aplasia medular, completando la característica triada clínica de la enfermedad: hemólisis, aplasia medular y trombosis (Ojeda, 2009).

Sin embargo, se desconocía la base molecular y fisiopatológica de la enfermedad, hasta que en la década de los 80s, se descubrió que las células afectadas por HPN tenían una deficiencia de determinadas proteínas superficiales unidas a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Dos de ellas eran CD55 y CD59, reguladoras del complemento (Brodsky, 2014).

Años más tarde, estudios realizados por Takeda (Japón), permitieron clonar el gen *PIG-A*, que codificaba una de las proteínas involucradas en la síntesis de GPI. Descubriendo así la mutación somática que producía la pérdida de función y por tanto, la falta de expresión del GPI (Brodsky, 2017 y Risco *et al.*, 2008)

Finalmente en 1996, Scott A. Rollins, Leonard Bell y Russell P. Rother, describen la fabricación de un anticuerpo humanizado anti-C5. Ya en 2004, Peter Hillmen *et al.*, publican en el *New England Journal of Medicine* el primer ensayo clínico de

Eculizumab, el único tratamiento eficaz específico para la enfermedad, además del trasplante medular (Risco *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

El objetivo general de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica lo más extensa y actualizada posible de la HPN, a fin de aunar la información procedente de distintos estudios científicos. Para lograr cumplir tal objetivo, debemos abordar unos objetivos más específicos:

1. Estudiar la historia de la enfermedad, a fin de observar los avances científicos que se han realizado en el último siglo.
2. Describir la etiología de la enfermedad, hasta donde se conoce actualmente.
3. Estudiar la epidemiología para tener una noción aproximada de la población mundial afectada.
4. Conocer los progresos realizados en el diagnóstico de la enfermedad.
5. Revisar el tratamiento actual con el anticuerpo monoclonal Eculizumab, sus ventajas e inconvenientes.
6. Evaluar las nuevas estrategias, aún no comercializadas, que se están investigando para el tratamiento.

3. METODOLOGÍA

El tema del proyecto fue propuesto por el sector de Farmacia del Hospital Universitario Careggi (Florencia, Italia), en el cual estoy realizando las prácticas tuteladas desde el mes de febrero de 2018. Al inicio realicé una lectura comprensiva de algunas páginas oficiales de organizaciones de apoyo a pacientes de HPN, únicamente con el fin de comprender y contextualizar la enfermedad.

Posteriormente, para llevar a cabo la investigación, utilicé bases de datos como Pubmed, Scopus y Science Direct, así como Google Scholar, seleccionando siempre unos criterios de búsqueda. Comencé buscando artículos que contuvieran el nombre de la enfermedad “Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria”, ordenando los resultados para que aparecieran los más recientes, ya que se han hecho muchos avances en la última

década, y algunos de los artículos más antiguos estaban prácticamente obsoletos. También se filtró por mejor coincidencia, debido a que muchos artículos no trataban directamente sobre la enfermedad, obteniendo así algunos bastantes completos como el de “Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria” (Brodsky, 2014). Después, realicé búsquedas más específicas, de revisiones sobre la historia, etiología, diagnósticos, tratamientos, casos clínicos, etc. Para ello, hice uso de operadores booleanos como “PNH and Eculizumab” o “PNH and Flow Citometry” También consulté el libro titulado “*Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: from bench to bedside*” recopilación de distintos artículos, en los cuales se estudiaba la enfermedad en profundidad, y además, conté con el apoyo del Doctor Rosario Notaro, quien ha participado en importantes estudios de la enfermedad publicando varios artículos en revistas científicas de prestigio que también he consultado.

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. Etiología

4.1.1. Mutación genética

La HPN es una enfermedad clonal, crónica, adquirida y no maligna, de las células madres hematopoyéticas que se asocia a hemólisis crónica intravascular, por tanto a anemia hemolítica, episodios tromboembólicos y aplasia medular, debido a una activación descontrolada del sistema de complemento (Hillmen *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2017; Orphanet, 2008).

Se produce debido a unas mutaciones somáticas en dichas células madres, concretamente en el gen *PIG-A* ubicado en el brazo corto del cromosoma X, concretamente en la posición Xp22.2, como puede observarse en la Figura 1.

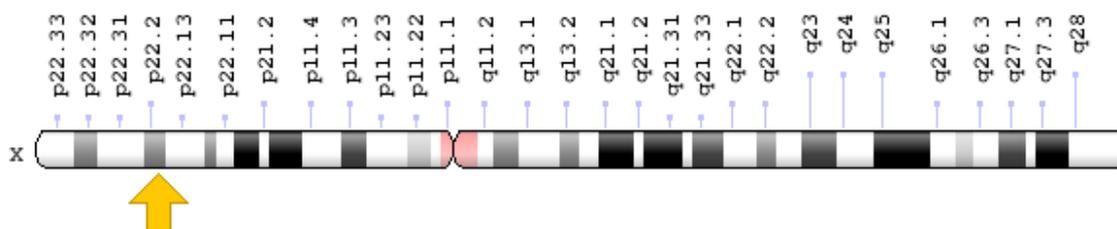


Figura 1: Localización del gen PIG-A (U.S National Library of Medicine, 2007)

Dicho gen es el encargado de codificar la proteína responsable de la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI) (U.S National Library of Medicine, 2007).

Esta proteína es la enzima α 1-6-N-acetil-glucosaminil transferasa, que interviene en el primer paso de la síntesis, en el cual incorpora N-acetilglucosamina al fosfatidilinositol en el retículo endoplasmático (Istituto Toscano Tumori, 2018 y Milanés *et al.*, 2003).

El GPI es una estructura glicolípídica compleja, que se adiciona al carbonilo terminal de muchas proteínas eucarióticas (Luzzatto, 2017), y que funciona a modo de anclaje entre la proteína en cuestión y el lado extracelular de la membrana (Pacheco *et al.*, 2014). En concreto son 150 proteínas humanas las que necesitan del GPI para anclarse a la membrana celular (Maeda *et al.*, 2017) Las proteínas una vez ancladas, desempeñan distintas funciones y participan en procesos de transducción de señales (Paulick y Bertozzi, 2008).

Como se aprecia en la Figura 2, la célula HPN (en la derecha) tiene la mutación en el gen *PIG-A*, por lo que la actividad de la enzima acetilglucosaminil transferasa está alterada, causando un bloqueo total o parcial en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol. Por lo cual, las proteínas que requieren de dicha molécula para anclarse en la membrana, no podrán unirse a ésta (Istituto Toscano Tumori, 2018).

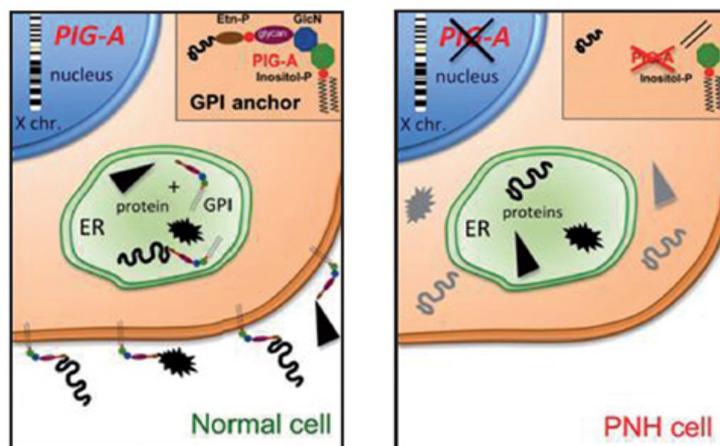


Figura 2: Diferencias en las proteínas membranales en una célula normal y una célula HPN (Istituto Toscano Tumori, 2018).

4.1.2 Vías de activación del sistema del complemento

Son muchas las proteínas que se ven afectadas por la ausencia del anclaje GPI, pero las principales causantes de la hemólisis típica de la enfermedad, son las proteínas reguladoras del complemento, que es un sistema innato de defensa, cuya misión principal es eliminar patógenos de la circulación.

Como observamos en la Figura 3, existen tres vías accionadas independientemente, por las que el sistema del complemento puede activarse, pero todas ellas desembocan en la producción de la convertasa de C3. Además, muchas de las proteínas por las que están constituidas dichas vías, son zimógenos, es decir, necesitan de una escisión proteolítica para poder desarrollar la actividad enzimática (Horiuchi y Tsukamoto, 2016):

a) Vía clásica: Se forma el complejo antígeno-anticuerpo, y estos activan a C1, C4 y C2 para formar la convertasa de C3.

b) Vía de lectinas: Los sacáridos procedentes de la superficie de patógenos, son reconocidos por las lectinas. Estas activan serinoproteínas que a su vez activarán a C4-C2, generando, de nuevo, la convertasa de C3.

c) Vía alternativa: Esta última vía se activa espontáneamente, aún en ausencia de células dañadas o de patógenos, se produce una activación constitutiva de C3 por hidrólisis. C3 una vez activada se unirá al factor B, factor D y a la properdina, para formar la convertasa de C3 (que es distinta a la de las dos rutas anteriores) (Brodsky, 2013).

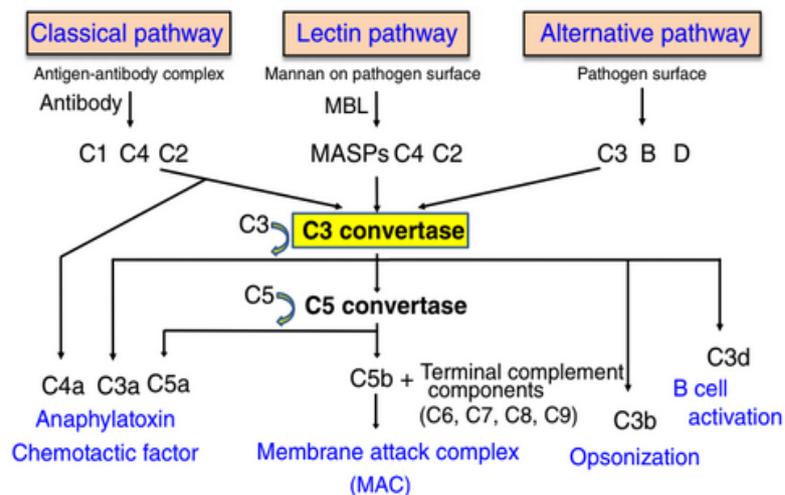


Figura 3: Vías de activación del sistema de complemento (Horiuchi y Tsukamoto, 2016).

Una vez activada, la convertasa de C3 escinde C3 en los fragmentos C3a (anafilotoxinas) y C3b, (que se unirá a la superficie de las células dañadas o células patógenas). Posteriormente, se produce un circuito de amplificación que multiplica la formación de C3b por las convertasas de C3. La fase final y efectora de la cascada del complemento, es la formación de las convertasas de C5 (que en función de la ruta, esta será de un tipo u otro). Éstas producirán la escisión de C5 a C5a (anafilotoxinas) y C5b. Una vez unido C5b a la superficie del patógeno, o célula dañada, de forma secuencial, se unen C6, C7, C8 y múltiples unidades de C9, formando así el complejo de ataque de membrana (C.A.M.), que será el responsable de la formación de poros en la membrana y por ende de la lisis (Brodsky, 2013 y Chapin *et al.*, 2016).

Las células sanguíneas presentan proteínas reguladoras de este sistema, como la proteína **CD55** o IRLM (Inhibidor de la Lisis Reactiva de la Membrana) la cual degrada las convertasas de C3 y C5, y **CD59** o DAF (Factor Acelerador de la Degradación del Complemento) que previene la polimerización terminal del complejo de ataque a la membrana; C.A.M (Milanés *et al.*, 2003 y Ruiz-Delgado *et al.*, 2009). Al haber un déficit de dichas proteínas, la acción del complemento está descontrolada y como resultado, las células sanguíneas como eritrocitos, leucocitos o plaquetas se descomponen antes de lo previsto dando lugar a la hemólisis típica de la enfermedad. Esto a su vez, causa la liberación de hemoglobina a la sangre, la cual pasa a la orina, usualmente durante la noche o por la mañana (Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU, 2018)

4.1.3 Expansión del clon

Hasta este punto, sabemos que el clon HPN surge debido a una mutación somática del gen PIG-A. Pero en algunos estudios, también se han encontrado dichas mutaciones en personas sanas. Se planteó entonces que tendría que haber alguna forma de expansión del clon mutante, para que la HPN se desarrollase y los pacientes manifestasen los síntomas (Milanés *et al.*, 2003 y Shen *et al.*, 2014).

Tras varios estudios, se concluyó que una mutación de PIG-A no era suficiente para inducir la expansión clonal de células madres hematopoyéticas defectuosas (Maeda *et al.*, 2017 y Hill *et al.*, 2017). Actualmente se ha comprobado que ésta tiene lugar debido a factores adicionales, que pueden ser extrínsecos, como una selección positiva del clon HPN, que puede ocurrir con el desarrollo de una Anemia Aplásica (AA) o

intrínsecos, como mutaciones adicionales que proporcionan una supervivencia intrínseca y una ventaja en el crecimiento.

Ambos mecanismos de expansión clonal pueden darse contemporáneamente, ya que no son excluyentes mutuamente (Hill *et al.*, 2017).

A continuación, veremos dichos factores con más detenimiento:

a) Factores extrínsecos: La AA puede contribuir a la selección positiva del clon, aunque este fenómeno aún no se conoce completamente. Recientemente, en algunos estudios como el de Young y Maciejewski, o el de Karadimitris y Luzzatto, se propuso la hipótesis de que en la médula se produce un ataque de linfocitos citotóxicos autorreactivos, que reconocen las proteínas unidas al GPI (Kinoshita y Inoue, 2001). Por tanto, las células HPN, deficientes en GPI, son inmunes a este ataque, favoreciendo así la expansión. Sin embargo, es necesario seguir investigando para corroborar dicha hipótesis (Hill *et al.*, 2017, Kawaguchi y Nakakuma, 2017).

b) Factores intrínsecos: En este caso, la expansión clonal se debe a una evolución del clon, causada por la aparición de mutaciones somáticas adicionales en la célula hematopoyética HPN, que le otorgan una ventaja de crecimiento (Hill *et al.*, 2017 y Shen *et al.*, 2014).

Recientemente, la aplicación de la técnica de secuenciación de segunda generación (NGS) para estudiar enfermedades clonales malignas ha revelado que la arquitectura clonal de la enfermedad tiene un nivel de complejidad mucho mayor que el que se postulaba (Shen *et al.*, 2014). La HPN entonces quedaría definida no como una única mutación, si no, como un trastorno genético complejo orquestado por muchas alteraciones genéticas además de las mutaciones PIG-A. La naturaleza y la composición de dichas mutaciones adicionales pueden modificar el comportamiento del clon PIG-A explicando así los distintos cursos clínicos observados en los pacientes. Además, Shen *et al.*, (2014), demostraron que los eventos mutacionales descubiertos no son exclusivos de la HPN, sino que se superponen significativamente con el espectro de mutaciones que se observan en los síndrome mielodisplásicos típicos, demostrando una evidente analogía (Lee y Abdel-wahab, 2014).

Como se puede observar en la Figura 4, las distintas mutaciones pueden surgir como un subclon dentro de la población de células PIG-A-mutantes o bien, como un evento genético inicial previo a la adquisición de la mutación PIG-A (Lee y Abdel-wahab, 2014). Aun así, en el futuro se deberán realizar estudios adicionales de secuenciación del genoma completo y análisis epigenómicos para aclarar los mecanismos de la evolución clonal intrínseca (Hill *et al.*, 2017).

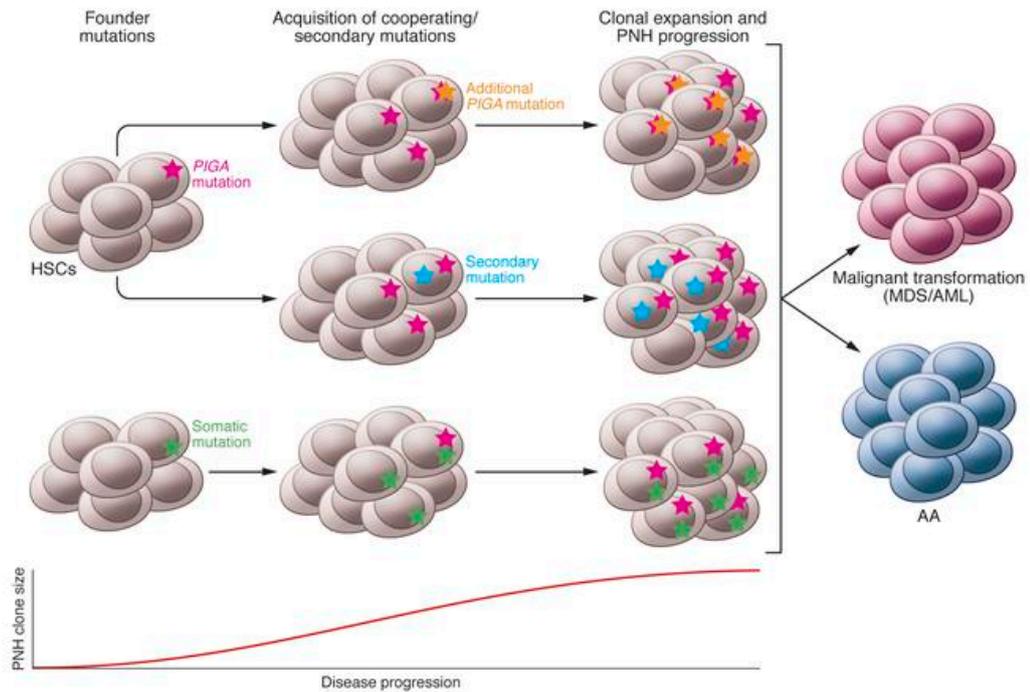


Figura 4: Posibles mutaciones en la HPN. (Lee y Abdel-wahab, 2014).

La HPN comienza con una mutación inicial en el gen PIG-A (se observa en rosa) o en otro gen (en color verde) de las células madre hematopoyéticas. A medida que la enfermedad progresa, aparecen nuevas mutaciones secundarias, en PIG-A (en amarillo) o en otros genes (azul) en adicción a la mutación inicial.

En raras ocasiones, los clones de HPN pueden incluso transformarse en malignidades mieloides tales como el síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda (Lee y Abdel-wahab, 2014).

4.1.4. Mosaicismo fenotípico

Gracias a pruebas especiales *in vitro* (Ham y Sacarosa), se identificaron 3 fenotipos diferentes de eritrocitos afectados por la mutación (Milanés *et al.*, 2003). Estos tienen sensibilidades distintas hacia el complemento según la ausencia de proteínas membranales, como se observa en la Figura 5.

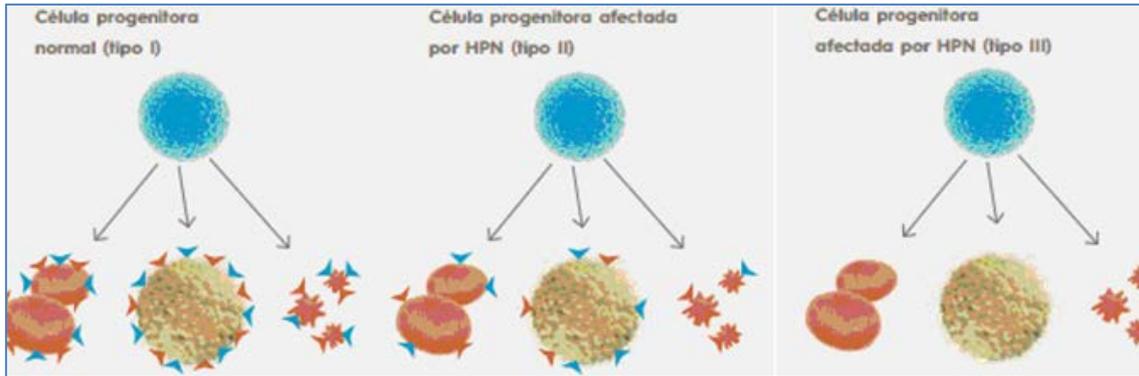


Figura 5: Fenotipos de eritrocitos afectados por la mutación del gen PIG-A (EBMT, 2015).

- HPN I: Eritrocitos con sensibilidad normal, o casi, ya que no han perdido ninguna de las proteínas ancladas a la membrana.
- HPN II: Eritrocitos con sensibilidad intermedia (de 3 a 5 veces mayor que en las células normales). Ya que han perdido algunas de las proteínas superficiales. Ausencia parcial de CD59 y CD55.
- HPN III: Eritrocitos muy sensibles (de 15 a 20 veces más que los normales) con ausencia total de las proteínas superficiales. Ausencia completa de CD 59 y CD55. Este grupo a su vez puede subdividirse en otros dos grupos distintos; IIIa, el más susceptible, y IIIb (Risco *et al.*, 2008; Packman *et al.*, 1979; Milanés *et al.*, 2003).

En 1966, Rosse y Dacie demostraron que en la mayoría de los casos de HPN, no todos los eritrocitos eran anormales, sino una porción. De hecho, el 78% de los pacientes con HPN exhiben una mezcla de células HPN I y III. Esto constituye el mosaicismo fenotípico (Risco *et al.*, 2008 y Wendell, 2017). En el transcurso normal de la enfermedad, se suelen mantener unas proporciones estables de los tres fenotipos citados con anterioridad. Exceptuando en el comienzo y la remisión espontánea donde se observan desplazamientos poblacionales (Risco *et al.*, 2008).

Se han dado pocos casos de remisión espontánea. Un caso de una paciente japonesa reveló que no era esencial la eliminación de los clones anormales para alcanzar la recuperación clínica y la normalización del recuento de células sanguíneas. Sin embargo, lo que puede parecer una remisión, a veces es en realidad una evolución de la enfermedad (Hill *et al.*, 2017 y Sahin *et al.*, 2014).

Un término bastante útil para determinar la gravedad de la enfermedad en los pacientes, es el llamado tamaño del clon HPN, que se refiere al porcentaje de células afectadas por HPN sin expresión normal de proteínas de anclaje al GPI (células II de HPN y células III de HPN) frente a células normales (células I de HPN). Por ejemplo, una persona con un 60 % de células sanguíneas sin proteínas de anclaje al GPI y un 40 % de células normales tiene un tamaño del clon HPN del 60 % (EBMT, 2015).

4.2. Anemia Aplásica y HPN

Como comentamos anteriormente, uno de los factores extrínsecos que podrían favorecer la expansión del clon HPN, es la Anemia Aplásica (AA). Ambas enfermedades son síndromes de insuficiencia medular y a pesar de ser fisiopatológica y clínicamente diferentes, tienen una dinámica similar, pudiendo transformarse una en la otra o solaparse en distintos estadios evolutivos de la enfermedad (Salido *et al.*, 2016). De hecho, las manifestaciones clínicas de la enfermedad se dan cuando coexisten el fallo de la médula ósea y la mutación somática.

Años después de la introducción de la terapia inmunosupresora para tratar la AA, se descubrió que algunos pacientes tratados sufrían complicaciones de HPN (Kinoshita y Inoue, 2001). La relación entre ambas enfermedades fue establecida por primera vez por Lewis y Dacie en 1961. Posteriormente en varios estudios se observó que el cultivo de células de la médula de pacientes de HPN, incluso de aquellos con una médula aparentemente normal y activa, producía pocas colonias, al igual que ocurría con el cultivo de médula de pacientes con AA (Wendell, 2017).

También se descubrió la presencia de pequeños clones HPN en pacientes con AA, Síndromes Mielodisplásicos (SMD) y otros síndromes de fallo medular.

Detectar estos clones es de gran importancia clínica ya que un 10-25% pueden sufrir una expansión clonal y progresar a HPN (Rodríguez *et al.*, 2013). Realmente

dichos clones están presentes en cantidades muy pequeñas en la médula de muchos individuos normales, lo que no significa que padezcan la HPN, ya que como hemos comentado, esta solo surge cuando el clon se expande (Wendell, 2017).

Como veremos más adelante, hay mucha variabilidad en la manifestación de la HPN en cada paciente, en función del grado de aplasia medular que sufra. Si en el paciente predomina la hemólisis principalmente, se habla del “patrón clásico” de la enfermedad. En cambio, si la aplasia medular es grave y predomina la insuficiencia hematopoyética, con pancitopenia moderada o severa, estamos ante el “patrón hipoplásico” o síndrome HPN/AA como describieron Lewis y Dacie en 1967 (Milanés *et al.*, 2003 y Luzzatto *et al.*, 2011). También se puede hablar de HPN subclínica, cuyos pacientes son, por definición, asintomáticos con recuentos sanguíneos normales o casi normales. A menudo, estos pacientes tienen un diagnóstico de AA leve o han recuperado la hematopoyesis después del tratamiento. En este caso, la expansión del clon HPN y los síntomas asociados, pueden acompañar una recaída de AA (Brodsky, 2014).

Por lo tanto, se ha demostrado que la HPN no es una enfermedad estática, ésta puede evolucionar, y además los pacientes sufren realmente dos enfermedades estrechamente relacionadas, la AA causada por un ataque inmunológico a las células hematopoyéticas, y la HPN, causada por la mutación somática. Ambas deben ser consideradas y tratadas de manera individual, e incluso en ocasiones, contemporáneamente (Wendell, 2017).

4.3. Epidemiología

La HPN es una enfermedad rara y con difícil diagnóstico, por tanto su tasa anual de incidencia se desconoce. Se estima que ocurra aproximadamente de 1-9 / 100.000 de habitantes (Orphanet, 2008).

Afecta a ambos sexos, y puede aparecer a cualquier edad. Aunque el diagnóstico se realiza generalmente entre la tercera y quinta década de la vida, pero también se dan casos en niños adolescentes y ancianos (Milanés *et al.*, 2003).

No se ha registrado ninguna predisposición familiar ni racial, pero se ha observado una mayor prevalencia en algunas regiones, en su mayoría asiáticas, como

por ejemplo, en Tailandia, Japón y otros países del Lejano Oriente, posiblemente debido a una mayor incidencia de AA (Hill, 2012).

En Europa se da con mayor frecuencia en el sexo femenino, al contrario que en Asia, que se da en el sexo masculino. Además, la HPN ha sido asociada en ocasiones con agentes infecciosos y químicos (Risco *et al.*, 2008).

Desafortunadamente, tiene una elevada morbimortalidad, y las medianas de supervivencia oscilan entre los 10 y los 22 años. Como veremos más adelante, el fallecimiento se debe principalmente a trombosis, hemorragias o infecciones secundarias. Pero también se han descrito recuperaciones espontáneas hasta en un 3-4% de los pacientes. Esto debe tenerse en cuenta al considerar tratamientos potencialmente peligrosos, como el trasplante de médula ósea (AEMPS, 2018 y Hillmen *et al.*, 1995).

4.4 Manifestaciones clínicas

Existe una gran variedad de los síntomas específicos y de progresión de la enfermedad entre los pacientes, lo que dificulta el diagnóstico de esta patología. Aunque podríamos determinar una triada clínica característica, la anemia hemolítica, hemoglobinuria, aplasia medular y propensión a tromboembolismos (Risitano y Rotoli, 2008), lo que sí se puede afirmar es que, es la proporción de eritrocitos anormales en sangre la que determina la severidad de la enfermedad (Risco *et al.*, 2008).

Además de la severidad de la aplasia medular, que provocará pancitopenia (The Aplastic Anemia and MDS International Foundation, 2017). Ésta puede evidenciarse desde el principio, o bien, ser una complicación tardía (Orphanet, 2008).

4.4.1. Anemia hemolítica

La anemia hemolítica en HPN no presenta anticuerpos específicos contra los eritrocitos propios, por lo que se trata concretamente de una anemia hemolítica Coombs negativa (Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU, 2016).

Está determinada principalmente por la hemólisis y la aplasia medular. Debido a la acción del complemento, la HPN provoca una destrucción prematura de los eritrocitos, es decir, su hemólisis. Esta hemólisis a su vez, conduce a una anemia

hemolítica acompañada de ictericia y hemoglobinuria, pero con un patrón bastante variable entre pacientes (Nakakuma *et al.*, 2017 y Brodsky, 2014).

La intensidad con la que se da la anemia depende de tres factores principalmente:

- **La proporción de eritrocitos anormales en circulación;** ésta puede variar del 1 al 90%. Aquellos con un porcentaje menor al 20 % raramente presentan hemoglobinuria, pero casi siempre hemólisis y hemosiderinuria.

- **La anormalidad de las células (fenotipo);** la intensidad de la hemólisis se asocia al tamaño de la población de HPN III, ya que son las más susceptibles a la lisis por el complemento. Por ejemplo, si éstas constituyen menos del 20 %, la hemoglobinuria es indetectable o leve. Si alcanzan del 20 al 50 % la hemoglobinuria es episódica. Y si superan el 50 % es constante, por tanto estaríamos ante una anemia grave.

- **El grado de activación del complemento.** Por ejemplo, cuando éste es activado por infecciones, ya sean virales o bacterianas, la hemólisis suele ser más activa (Milanés *et al.*, 2003).

En algunos pacientes, la concentración estacionaria de hemoglobina es cercana al valor normal, pero ésta puede verse dramáticamente alterada por un paroxismo de la hemólisis (Luzzatto *et al.*, 2011). Ya que las crisis hemolíticas pueden desencadenarse o agravarse durante periodos de infección, trauma, estrés, vacunación, cirugía, etc. (NORD, 2018).

Además, a la anemia hemolítica se le añaden las manifestaciones típicas de ésta, como el cansancio, la falta de aliento, palidez, palpitaciones, mareo o desmayos (EBMT, 2015).

4.4.2. Hemoglobinuria

Entre otras cosas, la hemólisis puede conllevar a la producción de orina oscura debido a la presencia de la hemoglobina. Pero la mayoría de los individuos afectados no presentan exacerbaciones nocturnas, y cuando esto ocurre es debido al incremento de la hemólisis durante el sueño. En su momento se estableció que el modelo típico de la HPN eran episodios nocturnos e irregulares de hemólisis intravascular y hemoglobinuria (Risco *et al.*, 2008), pero dado a que solo se comprueba en la cuarta

parte de los enfermos, podemos establecer que el término hemoglobinuria paroxística nocturna no es del todo adecuado (Milanés *et al.*, 2003).

4.4.3. Tromboembolismo

El tromboembolismo venoso es una de las complicaciones más temidas en la HPN ya que se presenta entre el 12 % y el 40 % de los casos (Milanés *et al.*, 2003), y representa junto con los episodios hemorrágicos un 50 % de la mortalidad en la HPN. Además, puede tener forma subclínica, siendo detectable solo con ecografía, o aguda, cursando con dolor intenso, hepatomegalia, ascitis e ictericia (Risco *et al.*, 2008).

Los eventos tromboembólicos son altamente impredecibles y se desarrollan principalmente en las venas, dándose especialmente en venas no habituales, intrabdominales, como las hepáticas y mesentéricas, pulmonares y cerebrales. La trombosis hepática o síndrome de Budd-Chiari es la más frecuente, presentándose entre el 15 % y 30 % de los pacientes. (Milanés *et al.*, 2003; Notaro *et al.*, 2015 y NORD, 2018).

Aunque la razón exacta del desarrollo de trombos no se puede explicar totalmente en la actualidad, se puede afirmar que la trombofilia en HPN es multifactorial.

Las células madre hematopoyéticas defectuosas podrían producir también plaquetas que lo fueran, y la ausencia de las proteínas CD55 y CD59 en éstas conduciría a micropartículas protrombóticas (Brodsky, 2014).

Algunos estudios han sugerido que el riesgo de trombosis es mayor en pacientes con “HPN hemolítica o clásica”, y con un tamaño de clon mayor (Notaro *et al.*, 2015).

Por otro lado, dado la hemólisis intravascular que se produce en la enfermedad, la hemoglobina queda libre en el plasma, causando síntomas ya mencionados como la orina oscura y la anemia. Ésta es un potente eliminador de óxido nítrico (NO), ya que ambas moléculas reaccionan rápida e irreversiblemente, para producir nitrato y metahemoglobina. La función principal del NO es mantener la relajación del músculo liso e inhibir la agregación plaquetaria.

Por tanto, si la hemólisis es grave, al producirse una deficiencia de NO, el tono del músculo liso se desregula y se activa la agregación plaquetaria, aumentando el riesgo de trombosis. Adicionalmente, la activación del complemento también podría contribuir a

la tendencia protrombótica, ya que C5a puede dar como resultado procesos proinflamatorios y protrombóticos al generar citoquinas inflamatorias.

En resumen, aún no está claro cuáles de estos mecanismos contribuyen más a la trombosis en HPN; sin embargo, la inhibición del complemento es la estrategia más efectiva para detener la trombosis en la HPN. De hecho, la terapia con anticoagulantes y Eculizumab es la indicación actual para los eventos trombóticos agudos (Brodsky, 2014).

4.4.4. Otros síntomas

A continuación estudiaremos otros síntomas, menos característicos, pero que también aparecen en pacientes con HPN:

- Insuficiencia renal: se piensa que la hemólisis crónica es causa primordial de cicatrización renal, dando lugar al desarrollo de una insuficiencia renal, aunque esto no sucede frecuentemente. Esta insuficiencia puede ser aguda o bien crónica. La insuficiencia renal aguda, se asocia a las crisis hemolíticas, se presenta en el 3% aproximadamente de los pacientes y puede resolverse sin dejar secuelas. En cambio, el daño tubular renal causado por trombosis microvascular aumenta hasta 6 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad renal crónica. También se registra hematuria, proteinuria, hipertensión y/o deterioro de la capacidad de concentración de la orina. (Milanés *et al.*, 2003, Brodsky, 2014 y EBMT, 2015).

- Ictericia: En ocasiones, se presenta ictericia debido a la degradación de la bilirrubina liberada (Shichishima y Noji, 2017).

- Infecciones: Éstas se dan frecuentemente debido a la presencia de leucocitos defectuosos. La disminución de la expresión de proteínas de superficie da lugar a una actividad quimio-táctica y fagocítica pobre. Estos defectos funcionales, junto con la disminución cuantitativa de la producción causada por el fallo medular, son los responsables de la susceptibilidad de enfermos de HPN a las infecciones (Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU, 2018 y Milanés *et al.*, 2003)

- Distonía muscular lisa: El dolor abdominal, el espasmo esofágico, la disfagia y la disfunción eréctil también son síntomas característicos asociados a la HPN clásica. Esto se debe a la deficiencia de óxido nítrico (NO), que produce la

desregulación del músculo liso y en consecuencia, aparecen espasmos en ciertos músculos, como el abdomen y el esófago, que cursan con dolor, dificultad para deglutir, así como disfunción eréctil en hombres.

- Hipertensión pulmonar (HTP) y disnea: Debido a la presencia de microtrombos subclínicos así como la carencia de NO asociada a la hemólisis, contribuyen a elevar la presión pulmonar, causando falta de aliento y la dificultad respiratoria (disnea). Lo que a su vez puede añadir una carga adicional al corazón.

- Hipertensión arterial (HTA): También se da un aumento general de la presión arterial, con dolor de cabeza, mareo, vértigo, acúfenos y alteración de la visión. Si esta persistiese en el tiempo, puede dar lugar a una cardiopatía, arteriopatía coronaria, ictus, aneurisma aórtico, arteriopatía periférica y nefropatía crónica. (EBMT, 2015 y Brodsky, 2014).

4.4.5. Posibles complicaciones

La HPN no es una enfermedad estática, es decir, pueden darse mutaciones secundarias y agravarse la aplasia medular. Esto puede dar lugar a AA, pero también a síndrome mielodisplásico, o incluso a leucemia mieloide aguda, comprometiendo gravemente la vida del paciente (Höchstmann y Schrezenmeier, 2017 y Hillmen *et al.*, 1995). Las trombosis también pueden dar lugar al fallecimiento del paciente, así como una septicemia resultante de las infecciones que puedan llegar a darse (Brodsky, 2017).

4.5. Diagnóstico

Para el diagnóstico de HPN es necesaria la identificación de la “triada clínica”, hemólisis, trombosis y disfunción medular, así como la detección de una falta simultánea de múltiples proteínas de membrana en células sanguíneas, que reflejan el defecto de GPI, y por ende, las mutaciones de genes de biosíntesis de GPI, como el gen *PIG-A* (Nakakuma *et al.*, 2017).

Se sabe que es bastante complicado y que se necesitan meses o años para diagnosticar la HPN. Esto puede deberse a diversos motivos como:

- Gran variedad de signos y síntomas entre pacientes.
- Signos y síntomas comunes a muchas enfermedades.
- Baja prevalencia; se trata de una enfermedad rara.

Por ello se ha establecido que se deben realizar pruebas de diagnóstico de la enfermedad en personas con alguno de los siguientes signos:

- Trombosis inexplicables y en lugares no habituales, acompañada de hemólisis.
- Anemia Aplásica o pancitopenia inexplicada
- Anemia hemolítica-Coombs negativa
- Hemólisis asociada a anemia, cansancio, distonía del músculo liso, dolor visceral no explicado o hemoglobinuria (Hill *et al.*, 2017 y EBMT, 2015).

Por la naturaleza progresiva y potencialmente mortal de la HPN, es importante vigilar dichos pacientes ya que el tamaño del clon en algunas personas puede aumentar rápidamente durante un período de varios meses.

Si el paciente presenta alguno de los signos anteriormente mencionados, y existe una sospecha de la enfermedad, se deben realizar pruebas de laboratorio. A continuación se mencionan algunas de las pruebas que se suelen realizar para el diagnóstico:

a) Examen físico: Aunque no es un diagnóstico determinante, es posible observar palidez e ictericia en los pacientes. Además de esplenomegalia moderada y en ocasiones hepatomegalia de ligera a moderada.

b) Análisis de orina: Es frecuente encontrar hemoglobinuria y hemosiderinuria. Además es importante comprobar el funcionamiento de la función renal.

c) Análisis de sangre:

- Hemograma: Se debe realizar un recuento completo de células sanguíneas con el fin de observar el funcionamiento de la médula ósea. Por ejemplo, las cifras de reticulocitos se utilizan para mostrar si la médula ósea produce más glóbulos rojos de lo normal, ya que esto es indicativo de anemia hemolítica. El intervalo de referencia para pacientes adultos de ambos sexos es de 0.5 a 1.5% (Alonso, 2013).

- Nivel de lactato-deshidrogenasa (LDH): Esta es una enzima presente en los glóbulos rojos que en la HPN se libera debido a la hemólisis y, por tanto, su medición indica el nivel de destrucción de glóbulos rojos.

- Nivel de hemoglobina: Se puede utilizar para medir el nivel de hemólisis (Hemoglobina inferior a 50-60 g/L), aunque el nivel de LDH es más exacto.

- Nivel de bilirrubina: Esta está aumentada en la HPN, dado la destrucción de los glóbulos rojos.

- Nivel de ferritina sérica: La ferritina es una proteína intracelular que almacena hierro. El nivel en pacientes de HPN suele ser inferior dado a la pérdida de hierro en la orina a causa de la hemólisis. Es bastante significativo ya que es la única anemia hemolítica que cursa con hierro sérico disminuido y hierro en orina aumentado.

d) Examen de médula ósea (biopsia y aspiración)

Para poder examinar las células de la médula ósea y verificar su correcto funcionamiento. Este método también es capaz de comprobar si el paciente ha desarrollado AA, síndrome mielodisplásico o leucemia. En muchos casos la celularidad es normal, ya que dependerá del “tipo” de HPN que presente el paciente. Por tanto, esta prueba no es necesaria, a no ser que el paciente sufra una pancitopenia severa (Risco *et al.*, 2008, Hill *et al.*, 2017 y EBMT, 2015).

A pesar de la utilidad de todas las técnicas anteriores, es necesario confirmar el diagnóstico con técnicas más específicas. Antiguamente se realizaban distintas pruebas serológicas para la confirmación del diagnóstico que detectaban la sensibilidad de los eritrocitos a la lisis mediada por concentraciones mínimas de complemento.

Un ejemplo es la **prueba de Ham**, o prueba de hemólisis ácida ya que el complemento es activado por acidificación del suero del paciente, y mide la susceptibilidad de los eritrocitos HPN. Es bastante específica pero pueden aparecer falsos negativos por errores en la técnica o por el bajo porcentaje de eritrocitos defectuosos circulantes por la hemólisis o por las transfusiones. Otro ejemplo es la **prueba de la sacarosa**, en la cual el complemento se fija mediante la disminución de la potencia iónica del medio ambiente, provocando la hemólisis de los eritrocitos HPN. Esta prueba a pesar de ser sensible es poco específica (Risco *et al.*, 2008).

En la actualidad, **la citometría de flujo** es el método de elección para diagnosticar la HPN, así como para clasificarla y monitorizarla (Hill *et al.*, 2017). Se trata de un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz (Barrera *et al.*, 2004).

En pacientes con HPN, la citometría de flujo determina la ausencia o deficiencia de las proteínas superficiales dependientes de GPI. Es decir, se mide el tamaño del clon HPN, examinando las células sanguíneas para ver si presentan dichas proteínas superficiales (Hill *et al.*, 2017).

Para la prueba se extrae una muestra de aproximadamente 3-4 mL de sangre periférica del paciente y se le añade heparina, EDTA o ACD. Este test debe ser simple y reproducible, por lo que si la sangre procediese de la médula, la presencia de células inmaduras podría inducir a error. Antes de que pasen 24 horas desde la recogida de la muestra, (Cannizzo *et al.*, 2012), ésta se expone a anticuerpos específicos a las proteínas dependientes de GPI de la célula, por ejemplo, anti-CD59 en hematíes, anti-CD14 en monocitos, y anti-CD16 o anti-CD24 en neutrófilos (Kwong *et al.*, 1994).

En el caso de las células nucleadas, también es posible el uso de un marcador más preciso y sensible, conocido como proaerolisina marcada con fluoresceína (FLAER) (Correia *et al.*, 2016). Se trata de una proteína bacteriana que se une selectivamente a la porción de glicano del anclaje de GPI. Los leucocitos normales que expresan proteínas con anclaje GPI se unen al reactivo, al contrario que los afectados por HPN, ya que carecen de GPI. Por tanto, los leucocitos HPN se identifican en el histograma citométrico de flujo como una población de células con fluorescencia ausente o tenue (Parker *et al.*, 2005). Este reactivo no se recomienda en glóbulos rojos, ya que estos expresan altos niveles de glicoforina, una proteína que se une a la aerolisina y, por lo tanto, interfiere con el análisis (Rodríguez *et al.*, 2013 y Hill *et al.*, 2017).

En los estudios iniciales, se recomienda la cuantificación de al menos dos proteínas con anclaje GPI para excluir la posibilidad de que el proceso clínico sea consecuencia de una deficiencia hereditaria aislada de un solo GPI-AP y en al menos dos linajes distintos de células sanguíneas (Parker *et al.*, 2005 y Hill *et al.*, 2017).

En pacientes con la enfermedad previamente diagnosticada, pero estable, se recomiendan análisis anuales de la sangre periférica, al igual que si se produce un cambio en los parámetros clínicos (como un evento tromboembólico o empeoramiento de la hemólisis) se requiere una inmediata reevaluación (Parker *et al.*, 2005).

En general, la citometría de flujo es una técnica bastante sensible y específica, capaz de diagnosticar la enfermedad incluso en pacientes con un tamaño de clon pequeño. Además es rápida de realizar y proporciona un análisis cualitativo y

cuantitativo de proteínas ancladas a GPI (Correia *et al.*, 2016). Es decir, no proporciona un resultado únicamente binario (positivo o negativo para HPN) sino que además, puede determinar el porcentaje de células que son anormales e identificar los distintos grados de deficiencia de proteínas, especialmente en eritrocitos (Parker *et al.*, 2005). Lo que nos permite, junto con la evaluación de la hemólisis, la trombosis y el trastorno subyacente de la médula ósea, determinar la gravedad de la enfermedad y clasificarla en “clásica”, “síndrome AA/HPN” o “subclínica” (Shichishima y Noji, 2017).

Por último, es importante mencionar que el histograma se verá afectado, si se ha realizado una transfusión reciente de glóbulos rojos ya que se aumentará la proporción de células con expresión normal de CD55 y CD59. Por lo tanto, para obtener información precisa sobre el porcentaje de eritrocitos deficientes en proteínas, se debe realizar la citometría antes de la transfusión o durante un período de abstinencia transfusional de al menos un mes (Parker *et al.*, 2005).

4.6. Tratamiento

Durante muchos años, el único tratamiento disponible para la HPN, eran paliativos, es decir, no estaban dirigidos hacia la enfermedad en cuestión si no a tratar los síntomas. Se realizaban transfusiones de sangre, aporte de hierro o anticoagulantes. No fue hasta principios de este siglo cuando se comenzaron a realizar avances en una terapia alternativa, específica y eficaz: el uso de un anticuerpo monoclonal que bloquearía la cascada del sistema del complemento, en concreto C5 (Luzzatto *et al.*, 2011).

4.6.1. Eculizumab

Peter Hillmen *et al.* en 2004 publicaron un artículo, en el *New England Journal of Medicine*, en el cual se observaban, por primera vez, los efectos del Eculizumab en enfermos de HPN con hemólisis y necesidad de transfusiones. Se estudiaron los indicadores clínicos y bioquímicos de hemólisis de 11 pacientes, los cuales recibieron perfusiones de 600 mg, semanalmente durante un mes, y posteriormente, perfusiones de 900 mg semanalmente hasta la semana 12. Y se concluyó, que el Eculizumab era seguro y bien tolerado en dichos enfermos, además de que reducía la hemólisis intravascular, la hemoglobinuria y la necesidad de transfusiones (Hillmen *et al.* 2004).

Finalmente, el 16 de marzo de 2007, fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA, 2018), y el 20 de junio de 2007, por la Agencia Europea del Medicamento comercializándose así bajo el nombre comercial de Soliris® (EMA, 2018) y con la designación de fármaco huérfano (Orphanet, 2012).

Se estableció una pauta posológica inicial en la HPN para pacientes adultos, de 4 semanas con 600 mg semanales de Eculizumab administrados mediante una perfusión intravenosa semanal de 25-45 minutos de duración. Y en la quinta semana, una dosis de mantenimiento de 900 mg, también a través de una perfusión intravenosa de 25-45 minutos, repitiéndola cada 14 ± 2 días (EMA, 2018).

Esto supuso una auténtica revolución en el tratamiento de la HPN, que mejoró considerablemente la calidad y la esperanza de vida de los pacientes. Su uso supone una reducción prácticamente total de la hemólisis intravascular, la necesidad de transfusiones, el cansancio, inhibe notablemente la aparición de trombos y disminuye el riesgo de insuficiencia renal (Orphanet, 2008 y Wendell, 2017).

Como ya se ha mencionado, el Eculizumab se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-c5 (IgG2/4 κ), producido con tecnología de ADN recombinante (EMA, 2018) es decir, se trata de la combinación de la región constante de un anticuerpo humano con el paratopo específico de origen murino.

Observamos la estructura en la Figura 6:

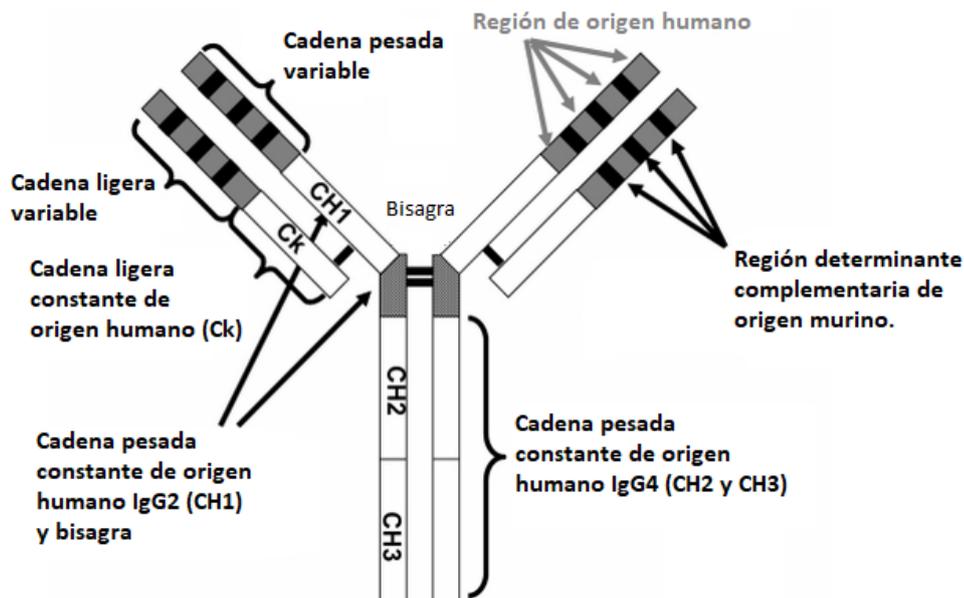


Figura 6: Estructura del Eculizumab. (Modificado a partir de Risitano y Rotoli, 2008).

Concretamente la región variable es específica anti-C5. Esta unión impide que la enzima C5 convertasa escinda esta unidad en las subunidades C5a y C5b, bloqueando la formación del complejo terminal del complemento o complejo de ataque de membrana (C.A.M) responsable de la formación de canales transmembrana que provocan la lisis del eritrocito por tanto, inhibiendo la acción hemolítica del complemento. Además, de inhibir la acción anafilotóxica de la subunidad C5a (Horiuchi y Tsukamoto, 2016).

En cambio, a pesar de ser un gran avance para el tratamiento de la enfermedad, es necesario monitorizar a los pacientes en terapia con Eculizumab, debido a varias razones. En primer lugar, no tiene efecto sobre el fallo medular que afecta a todos los pacientes, y que requiere tratamiento. También es necesario confirmar que la hemólisis intravascular está controlada, y monitorizar el tamaño del clon. Además, como ya comentamos hay una proporción de pacientes en los cuales se da una remisión espontánea de la HPN, y por tanto, podría aplicarse una terapia discontinua. Por otro lado, se han dado casos de pacientes, la mayor parte japoneses, que han manifestado una resistencia hacia el Eculizumab, debido a un polimorfismo heredado de C5 (Hill *et al.*, 2017; Risitano y Marotta, 2018). El C5 mutante escapa de la unión y del bloqueo por parte del Eculizumab, siendo capaz de seguir produciendo hemólisis. Un estudio realizado por Nishimura *et al.* (2014), puso de manifiesto que 11 de los 345 japoneses bajo el tratamiento, presentaban una respuesta pobre al Eculizumab, y además, todos ellos tenían en común la misma mutación sin sentido en C5.

Así mismo, la inhibición de la formación de C.A.M, incrementa la susceptibilidad del paciente hacia una infección meningocócica, por lo tanto es recomendable una vacunación antes de comenzar el tratamiento (Horiuchi y Tsukamoto, 2016). Es importante que los pacientes reciban información sobre cómo identificar los síntomas como fiebre, escalofríos, mialgia y dolor de cabeza, para en ese caso buscar atención médica (Hill *et al.*, 2017).

Por último, otra de las desventajas del tratamiento con Eculizumab, es que el beneficio hematológico es bastante heterogéneo, en la mayoría de los pacientes se mantiene una anemia residual debida principalmente a una leve hemólisis extravascular mediada por C3, provocando que un tercio de los pacientes aun requiera transfusiones. Existen divergencias en cuanto a la intervención que debería realizarse en estos casos. En un artículo, Hill *et al.* (2017) afirman que no serían necesarias intervenciones como

la terapia con corticosteroides o la esplenectomía, ya que hay evidencias que indican que la anemia residual no afecta a la supervivencia del paciente (Hill *et al.*, 2017). Risitano y Marotta (2018) también desaconsejan el uso de esteroides, pero afirman que la esplenectomía sí es efectiva para tratar la hemólisis extravascular mediada por C3.

Este fenómeno es común en todos los pacientes dado a que el bloqueo que ejerce el anticuerpo es sobre C5, el complemento se sigue activando en niveles anteriores de la cascada, y por ende los eritrocitos HPN siguen siendo susceptibles a la activación del complemento debido a la falta de CD55 y CD59. Como resultado, fragmentos de C3 se depositan en eritrocitos anormales, que eventualmente funcionan como opsoninas, que son reconocidas por los receptores de macrófagos del hígado y del bazo, resultando en una destrucción selectiva de los eritrocitos HPN (Risitano, 2017 y Risitano y Marotta, 2018).

La anemia residual, también se debe a la hemólisis intravascular. Este fenómeno solo se ha descrito en aproximadamente 15-20% de los pacientes con HPN. También se denomina “*pharmacokinetic breakthrough*” y suele darse uno o dos días antes de la administración de la siguiente dosis de Eculizumab. A dichos pacientes se les aumenta la dosis o se reduce el intervalo de dosis (Risitano, 2017 y Risitano y Marotta, 2018). En la Figura 7, se describen los dos tipos de hemólisis causantes de la anemia residual.

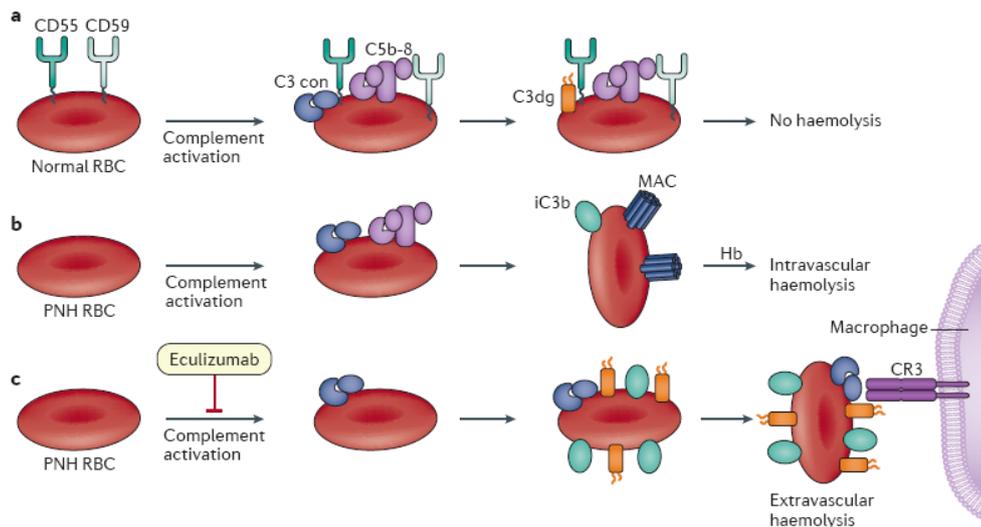


Figura 7: Tipos de hemólisis en eritrocitos HPN (Hill *et al.*, 2017).

4.6.2. Nuevas terapias

Es necesario seguir investigando nuevas terapias, dado a que el Eculizumab, a pesar de tener un papel muy importante en el tratamiento de la HPN, tiene ciertos inconvenientes.

Observando la cascada del complemento, se pensó en el desarrollo de nuevos inhibidores que actuaran en distintos niveles como, a nivel de la vía efectora (C5; mismo objetivo que Eculizumab), a nivel de la clave de activación y amplificación (C3) o distintos componentes implicados en el inicio de la vía alternativa. De esta manera se intentaría conseguir tratamientos que solucionasen los inconvenientes del Eculizumab, y que fueran más convenientes para el paciente, con un mayor intervalo de administración, menor coste y/o la posibilidad de una auto-administración subcutánea (Risitano y Marotta, 2018). En la Figura 8, se observan los nuevos fármacos en investigación, que se estudiarán en este apartado, y su lugar de acción en la cascada del complemento.

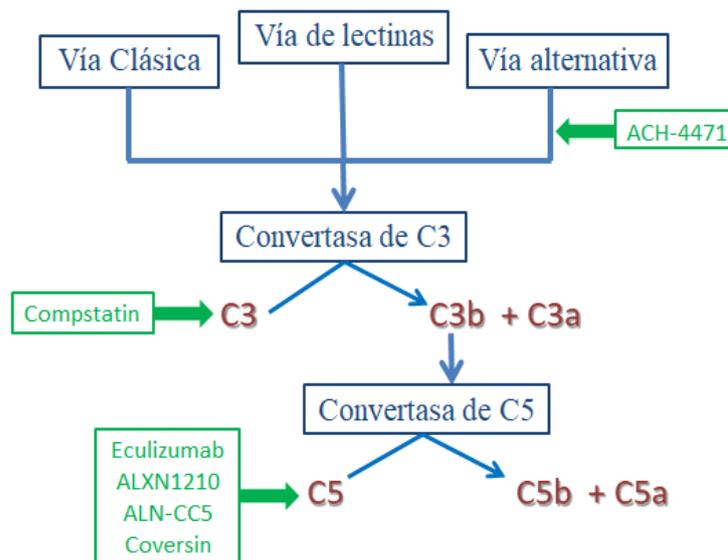


Figura 8: Lugar de acción de las nuevas terapias en la cascada del complemento. (Elaboración propia a partir de Horiuchi y Tsukamoto, 2016).

Tanto los inhibidores específicos de la vía alternativa, como los que actúan sobre C3, previenen la hemólisis extravascular mediada por C3, además de la vía efectora del complemento terminal. Se previene también la hemólisis intravascular.

Por otro lado, los nuevos inhibidores de C5 desactivarían la vía efectora del complemento terminal, al igual que el Eculizumab, que generalmente provoca hemólisis intravascular (Risitano y Marotta, 2018).

A continuación, comentaremos algunos de estos nuevos inhibidores, agrupados según su mecanismo de acción:

a) **Inhibidores de C5**

Este grupo de inhibidores, como bien indica el nombre, tienen como objetivo la molécula C5, debido a que el bloqueo terminal del complemento es más seguro. En este caso, se aprovechó la misma molécula objetivo del Eculizumab, pero las investigaciones a mano de distintas industrias, se dirige a mejorar y corregir los inconvenientes que ya comentamos.

Una de las compañías es Alexion Pharmaceuticals, que ha desarrollado un nuevo anticuerpo monoclonal específico contra C5, ALXN1210, que es virtualmente idéntico a Eculizumab pero con una vida media mayor, por tanto, solo se tendría que administrar por vía endovenosa cada 4 ó 6 semanas (Hill *et al.*, 2017 y Sheridan *et al.*, 2018). Un estudio de fase I, en voluntarios sanos corroboró la inhibición sostenida de C5, con una vida media 4 veces mayor a la de Eculizumab. Actualmente, se están realizando ensayos de fase III (Risitano y Marotta, 2018).

Otra estrategia para bloquear la escisión de C5, fue usada por la compañía Alnylam Pharmaceutical. Usaron un dúplex de ARN pequeño de interferencia (ARNip) específico para C5, denominado ALN-CC5, actualmente en fase I/II. Éste se administra de manera subcutánea y silencia la producción de C5 del hígado completamente. Resultando en una reducción de más del 99% del nivel de C5 en el plasma (Hill *et al.*, 2017, Risitano y Marotta, 2018).

Coversin, desarrollado por Akari Therapeutics deriva de una pequeña proteína (16 kDa) aislada de la garrapata *Ornithodoros moubata*. Dicha proteína se une a C5 y también bloquea la escisión por las convertasas de C5. *In vitro*, esta droga es efectiva previniendo la hemólisis, aun en pacientes con polimorfismo de C5, para los cuales el Eculizumab es inefectivo (Hill *et al.*, 2017). Además, en estudios de fase I en pacientes sanos, aparece biodisponible tras inyecciones subcutáneas (Risitano y Marotta, 2018).

Aun así, estos fármacos no resuelven la hemólisis extravascular, ya que no se bloquea la escisión de C3.

b) Inhibidores de C3

Estos constituyen un grupo de inhibidores que bloquean el complemento en un nivel anterior de la cascada de activación; los inhibidores de C3 (Risitano y Marotta, 2018).

Se supone que bloqueando a nivel de C3 teóricamente prevendríamos tanto la hemólisis extra como intravascular, ya que C3 tiene un papel de pivote en las tres rutas de activación del complemento, lo que lo convierte en el objetivo más racional. Sin embargo, también es el factor de complemento más abundante en el suero (1.2 mg/mL), por tanto, es también un objetivo desafiante (Hill *et al.*, 2017).

Compstatin es un péptido con puente disulfuro de 13 residuos, que se une al C3 humano, y su fragmento activo, C3b. Por tanto, impide la escisión de C3, así como la incorporación C3b en la C3 y C5 convertasas. Un derivado del Compstatin, de Apellis Pharmaceuticals, está en ensayo clínico para tratar HPN. Como bloquean las tres rutas, su seguridad en lo referente a infecciones y acumulación de complejos inmunitarios tiene que ser testado con atención (Hill *et al.*, 2017).

c) Inhibidores de la vía alternativa

El factor D del complemento, es una proteasa sérica con un único sustrato conocido; el factor del complemento B. Cuando el factor D forma un complejo con C3b y Mg²⁺, es capaz de lisar el enlace Arg-Lys del factor B. Es la única enzima en la sangre que puede activar al factor B, por lo que es necesaria para la activación de la ruta alternativa. La concentración plasmática del factor D (1.8 ± 0.4 µg/mL) es la menor en comparación con cualquier proteína del complemento, lo que hace que el factor D sea el factor limitante en la cascada de activación, y por tanto una posible terapia bastante prometedora.

Achillion Pharmaceuticals ha sintetizado una pequeña molécula, ACH-4471, que inhibe el factor D. Ésta debería prevenir tanto la hemólisis intravascular como la extravascular. Achillion ha anunciado un próximo estudio de fase II para pacientes con HPN con respuesta inadecuada a Eculizumab, ya que algunos datos

in vitro demuestran una posible sinergia entre ACH-4471 y Eculizumab. (Risitano y Marotta, 2018).

Otras proteínas de la ruta alternativa, como por ejemplo factor B, factor H o la properdina, son otros objetivos razonables para tratar la HPN, y su versatilidad está siendo investigada (Hill *et al.*, 2017).

d) **Trasplante de médula**

El tratamiento con inhibidores del complemento a pesar de haber supuesto una notoria mejora de la calidad de vida de los pacientes, únicamente trata la HPN hemolítica, es decir, no tiene efecto sobre el fallo medular. Por tanto, el trasplante de médula y la terapia inmunosupresora serán la base del tratamiento para pacientes con HPN que también presenten un fallo grave de la médula ósea (Hill *et al.*, 2017 y Risitano, 2017).

Actualmente, se realizan trasplantes haploidénticos (de compatibilidad media) no mieloablativos (que no elimina todas las células madre) con dosis altas de ciclofosfamida posteriores para mitigar la enfermedad de injerto contra huésped. Aumentando el rango de posibles donantes y convirtiéndose en una terapia bastante segura y efectiva en pacientes con enfermedades no malignas como la AA y la HPN (Hill *et al.*, 2017 y Gómez-Almaguer *et al.*, 2005).

4.7 La HPN y el embarazo

Antes del descubrimiento del Eculizumab como terapia de la HPN, existía un desánimo general por parte de las pacientes a tener hijos, debido al riesgo mortal que suponía el embarazo con la enfermedad (Miyasaka y Miura, 2017).

La HPN en el embarazo incrementa el riesgo de mortalidad tanto de la madre como del feto. De hecho, la mortalidad de la madre se estima en un 6-20%, un 12% aproximadamente de las pacientes desarrollan complicaciones, y más del 45% de los embarazos terminan en aborto espontáneo. Se estima un peso medio de los neonatos de 2.800g y una mortalidad perinatal de un 8,8% (Hill *et al.*, 2017).

Esto se debe a que en el embarazo, la hemólisis intravascular se precipita, ya que los niveles de factores del complemento están aumentados, dando lugar a una anemia hemolítica acelerada. También cabe añadir, que el embarazo es en sí un estado

protrombótico fisiológico, y el exceso de plaquetas aumenta el riesgo de complicaciones tromboembólicas durante la gestación y el posparto (Miyasaka y Miura, 2017).

El Eculizumab entra en la categoría de riesgo C para el embarazo, es decir, el riesgo no está descartado (Hill *et al.*, 2017). Pero a pesar de esto, se demostró en distintos ensayos que el tratamiento con el anticuerpo en mujeres embarazadas, prevenía las complicaciones de la enfermedad y reducía los síntomas. Y es por ello, que hoy en día, las mujeres con HPN están más dispuestas a la maternidad (Hallstensen *et al.*, 2015).

El principal inconveniente que se ha observado hasta ahora, es que el intervalo entre las dosis de Eculizumab se ha tenido que disminuir en algunos casos (“pharmacokinetic breakthrough”). Esto puede deberse al incremento de los factores del complemento y de la dilución del fármaco, debido al mayor volumen de plasma que tienen las embarazadas. Por ello, es necesario monitorizar la enfermedad a fin de ajustar la dosis y/o los intervalos entre las perfusiones (Notaro y Risitano, 2017 y Hill *et al.*, 2017).

En cuanto al riesgo de los neonatos, un estudio de Hallstensen *et al.* (2015), demostró que el tratamiento durante la gestación con Eculizumab no comprometía el sistema del complemento de los neonatos, ya que este era funcional.

Otro estudio de Miyasaka y Miura (2017) determinó que no se podía descartar completamente la contaminación de la sangre materna, a pesar de ser poco probable ya que la concentración era bastante menor a la del nivel terapéutico. Hasta ahora, tampoco se ha detectado el anticuerpo en muestras de leche materna. Es importante destacar que no se han obtenido anomalías o eventos adversos en neonatos cuyas madres han recibido el tratamiento con el anticuerpo, incluso en el primer trimestre. Y sobre la base de estos datos, la mayoría de los hematólogos concuerdan en que el beneficio del Eculizumab en las mujeres embarazadas supera los riesgos potenciales del medicamento, pero es necesaria una discusión exhaustiva con el paciente y el obstetra (Miyasaka y Miura, 2017 y Hill *et al.*, 2017).

No obstante, aún hay muy pocos datos clínicos disponibles, por lo que se aconseja un seguimiento a largo plazo tanto del feto como de la madre, y sería recomendable seguir estudiando casos de pacientes.

5. CONCLUSIONES

Finalmente, tras la realización de la revisión bibliográfica, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Es importante promover la investigación de enfermedades raras, a pesar de su baja incidencia, muchas conllevan un gran riesgo de mortalidad y suponen un gran impacto en la vida del paciente, como es el caso de la HPN.

2. Debe continuar la investigación de los mecanismos de expansión del clon HPN, para poder establecer cuál/es de todos ellos son los correctos, y poder reducir la probabilidad de la expansión, limitando así el desarrollo de la enfermedad.

3. Es de vital importancia el conocimiento de la gran variabilidad de manifestaciones clínicas, para poder detectar la enfermedad. Por lo que sería recomendable transmitir toda la información disponible a la población, así como a los profesionales de la salud, con el fin de diagnosticarla a tiempo. Debido al difícil diagnóstico es probable que haya muchos casos aun sin diagnosticar, lo que supone un aumento en el riesgo de complicaciones y en la mortalidad de los pacientes.

4. Aunque hasta ahora los hematólogos hayan recomendado el uso del Eculizumab en el embarazo con HPN, se debe seguir realizando investigaciones y registrar casos para intentar reducir el riesgo del tratamiento en el futuro.

5. Y por último, es necesario seguir investigando nuevas terapias, que puedan suponer una mejora de la calidad de vida y una disminución del riesgo mortal, con un menor coste, y un menor riesgo para el paciente.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Informe de Posicionamiento Terapéutico de Eculizumab (Soliris ®) en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-Eculizumab-soliris-HPN.pdf>

Alonso M. Índices Reticulocitarios: Fracción inmadura de reticulocitos (FIR), Contenido de Hemoglobina de Reticulocitos (CHR). *Hematología*. 2013;17(1):67-9.

Barrera Ramirez LM, Drago Serrano ME, Pérez Ramos J, Sainz Espuñes T del R, Zamora AC, Gómez Arroyo F, *et al.* Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2004;17(1): 42-55.

Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. Hemoglobinuria paroxística nocturna : MedlinePlus enciclopedia médica [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000534.htm>

Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. Prueba de Coombs: MedlinePlus enciclopedia médica. 2016 [en línea]. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003344.htm>

Brodsky AL. Eculizumab. *Hematología*. 2013; 17(3): 276-84.

Brodsky RA. Epidemiology in PNH: The PNH Global Registry. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side*. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 107-99

Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014; 124(18): 2804-12.

Cannizzo E, Del Vecchio L, Geuna M. *Raccomandazioni per la caratterizzazione citometrica dell'Emoglobinuria Parossistica Notturna*. 1ª ed. Milano: Emmedi s.r.l; 2012.

Chapin J, Terry HS, Kleinert D, Laurence J. The role of complement activation in thrombosis and hemolytic anemias. *Transfus Apher Sci*. 2016; 54(2): 191-8.

Correia RP, Bento LC, Bortolucci ACA, Alexandre AM, Vaz A da C, Schimidell

D, *et al.* Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Einstein (São Paulo)*. 2016; 14(3): 366–73.

Crosby WH. Historical review: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. 1951;69(2):381-7.

European Medicines Agency (EMA). Ficha técnica o resumen de las características del producto: Soliris [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000791/WC500054208.pdf

European society for blood and marrow transplantation (EBMT). Guía práctica para el personal de enfermería y profesionales sanitarios afines. 2015 [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: http://www.ebmt.org/sites/default/files/migration_legacy_files/document/EBMT_Practical_Guides_for_Nurses_Paroxysmal_Nocturnal_Haemaglobinuria%28PNH%29_ES.pdf

Federación Española de Enfermedades Raras. [En línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: <https://www.enfermedades-raras.org/index.php/enfermedades-raras/>

Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Gutiérrez-Aguirre CH, Jaime-Pérez JC. Trasplante no mieloablativo de células progenitoras hematopoyéticas. Mitos y realidades. *Rev Investig clínica*. 2005; 57(2): 291-7.

Hallstensen RF, Bergseth G, Foss S, Jæger S, Gedde-Dahl T, Holt J, *et al.* Eculizumab treatment during pregnancy does not affect the complement system activity of the newborn. *Immunobiology*. 2015; 220(4): 452-9.

Herper M. The World's Most Expensive Drugs. 2010 [en línea]. [Consultado en Abril 2018]. Disponible en: <https://www.forbes.com/2010/02/19/expensive-drugs-cost-business-healthcare-rare-diseases.html#7c8414d15e10>

Hill A. La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna y su epidemiología. *Rev Inf dedicada a la Enferm Hemoglobinuria Paroxística Noct y su Asoc pacientes*. 2012; 3: 4-5.

Hill A, Dezern AE, Kinoshita T, Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Prim*. 2017; 3: 1-14.

Hillmen P, Bessler M, Luzzato L, Dacie J V. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 1995; 333(19): 1253-8.

Hillmen P, Hall C, Marsh JCW, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, *et al.* Effect of Eculizumab on Hemolysis and Transfusion Requirements in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 2004; 350(6): 552-9.

Höchsmann B, Schrezenmeier H. Bone Marrow Failure in PNH. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side.* 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 151-137.

Horiuchi T, Tsukamoto H. Complement-targeted therapy: development of C5- and C5a-targeted inhibition. *Inflamm Regen.* 2016; 36(1): 11.

Istituto Toscano Tumori. ITT - Dipartimento oncologico AOU Careggi - Firenze - Unità di ricerca Genetics and gene transfer in oncology [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.ittumori.it/ENG/ricerca/ricerca-genetics-gene-transfer.shtml#publications>

Kawaguchi T, Nakakuma H. Pathogenesis of Clonal Dominance in PNH:

Selection Mechanisms in PNH. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side.* 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 227-215.

Kim H, Kim IS, Cho SH, Lee HJ, Chang CL, Yoon KT. The first case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and Budd-Chiari syndrome treated with complement inhibitor Eculizumab in Korea. *Blood Res.* 2017; 52(2): 145-8.

Kinoshita T, Inoue N. Relationship between Aplastic Anemia and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Int J Hematol.* 2001; 75: 117-22.

Kwong YL, Lee CP, Chan TK, Chan LC. Flow cytometric measurement of glycosylphosphatidyl-inositol-linked surface proteins on blood cells of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Clin Pathol.* 1994; 102(1): 30-5.

Lee SC, Abdel-wahab O. The mutational landscape of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria revealed: new insights into clonal dominance. *J Clin Invest.* 2014; 124(10): 4227-30.

Luzzatto, L. Clonal Origin and Clonal Selection in PNH. En: Y. Kanakura *et al.*,

editores. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 213-197.

Luzzatto L, Gianfaldoni G, Notaro R. Management of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: A personal view. *Br J Haematol.* 2011; 153(6): 709-20.

Maeda Y, Murakami Y, Kinoshita T. Synthesis, Genetics, and Congenital Diseases of GPI-Anchored Proteins. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 54-11.

Milanés Roldán MT, Fernández Delgado N, Fundora Sarraff T, Jaime Facundo JC, Hernández Ramírez P. Hemoglobinuria paroxística nocturna. Actualización. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter.* 2003; 19(1). p. 0-0.

Miyasaka N, Miura O. Pregnancy in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 358-347.

Nakakuma H, Shichishima T, Nishimura J. Diagnosis and Classification of PNH. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 183-173.

National Organization for Rare Disorders (NORD). Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria [en línea]. [Consultado en Mayo 2018]. Disponible en: <https://rarediseases.org/rare-diseases/paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria/>

Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, et al. Genetic Variants in C5 and Poor Response to Eculizumab. *N Engl J Med.* 2014;370(7):632-9.

Notaro R, Gargiulo L, Angioletti M De, Rondelli T, Sica M. Recent advances in pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *DCTH.* 2015;2:53-64.

Notaro R, Risitano AM. Clinical Effects of Eculizumab in PNH: Extravascular Hemolysis After Eculizumab Treatment. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 296-283.

Ojeda Gutierrez E. Apuntes históricos sobre la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. *Rev Inf sobre la Enferm Hemoglobinuria Paroxística Noct y su Asoc*

pacientes. 2009; 1: 5-6.

Orphanet. Orphanet: Emoglobinuria parossistica notturna 2008 [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=IT&Expert=447

Orphanet. Orphanet: Sobre las enfermedades raras 2012 [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?lng=ES

Pacheco Martínez MM, Cervantes Ríos E, García Rodríguez M del C, Ortiz Muñiz AR. El gen PIG-A como indicador de mutaciones somáticas In vivo. Rev Int Contam Ambient. 2014; 30: 53-65.

Packman CH, Rosenfeld SI, Jenkins DE, Thiem PA, Leddy JP. Complement lysis of human erythrocytes. Differing susceptibility of two types of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to C5b-9. J Clin Invest. 1979; 64(2): 428-33.

Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, *et al.* Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2005; 106(12): 3699–709.

Paulick MG, Bertozzi CR. The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. Biochemistry. 2008; 47(27): 6991-7000.

Reglamento (CE) N° 141/2000 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 1999 sobre medicamentos huérfanos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 22 de enero de 2000, p. L 18/1-L 18/5.

Risco Almenares GM, Alarcón Martínez Y, Álvaro Hidalgo R, Larquín Comet JI. Hemoglobinuria paroxística nocturna. 2008; 1-13.

Risitano, AM. Future Strategies of Complement Inhibition in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 346-319.

Risitano AM, Marotta S. Toward complement inhibition 2.0: Next generation anticomplement agents for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Am J Hematol. 2018; 93(4): 564-77.

Risitano AM, Rotoli B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pathophysiology,

natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics*. 2008; 2(2): 205-22.

Rodríguez CM, Burruenco XS, Sastre DA, Cloquell M del V., Rossi B de los M, Campregher DN, *et al.* Detección y monitoreo de clones con hemoglobinuria paroxística nocturna por citometría de flujo. *Bitácora Digit Fac Ciencias Químicas*. 2013; 1(3): 1-7.

Ruiz-Delgado GJ, Vázquez-Garza E, Méndez-Ramírez N, Gómez-Almaguer D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology*. 2009; 14(1): 33-7.

Sahin F, Yilmaz AF, Comert M, Ozdemirkiran F, Gokmen NM, Saydam G. Spontaneous Remission of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria During Eculizumab Treatment. *J of Hematology*. 2014; 3(2): 53-50.

Salido Fierrez E, Cabañas Perianes V, Moraleta Jiménez JM. Anemia aplásica. Hemoglobinuria paroxística nocturna. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2016; 12(20): 1159-69.

Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, *et al.* Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014; 124(10): 4529-38.

Sheridan D, Yu Z, Zhang Y, Patel R, Sun F, Lasaro A, *et al.* Design and preclinical characterization of ALXN1210: A novel anti-C5 antibody with extended duration of action. *PLoS One*. 2018;5:1-15.

Shichishima T, Noji H. Clinical Management in PNH. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side*. 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p.269-253.

The Aplastic Anemia and MDS International Foundation. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) | Aplastic Anemia and MDS International Foundation. 2017 [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.aamds.org/diseases/pnh>

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Drug Approval Package [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/125166s0000TOC.cfm

U.S National Library of Medicine. PIG-A gene - Genetics Home Reference. 2007 [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIGA#>

Veerreddy P. Hemoglobinuria misidentified as hematuria: Review of discolored urine and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Med Insights Blood Disord.* 2013; 6: 7-17.

Wendell R. A History of Research of PNH: Defining a Disease. En: Y. Kanakura *et al.*, editores. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: From bench to side.* 1ª ed. Japón: Springer; 2017. p. 8-1.