

Deficiencia de proteínas de superficie en el diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna.

Cell surface proteins deficiency in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

Susana Mena-Zapata^{1,a}

1. Estudiante de Medicina.

a. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana (Colombia).

CORRESPONDENCIA

Susana Mena-Zapata

ORCID ID <https://orcid.org/0009-0006-9159-444X>

Universidad Pontificia Bolivariana (Colombia)

E-mail: susana.menaz.col@upb.edu.co

CONFLICTO DE INTERESES

La autora del artículo hace constar que no existe, de manera directa o indirecta, ningún tipo de conflicto de intereses que pueda poner en peligro la validez de lo comunicado.

RESUMEN

La hemoglobinuria paroxística nocturna es una enfermedad hematológica adquirida causada por una mutación en el gen PIG-A, que codifica la proteína fosfatidilinositol glicano clase A, conduciendo a la ausencia parcial o completa de las proteínas reguladoras del complemento que están presentes en la membrana del eritrocito, por lo que genera una desregulación del complemento contra la membrana eritrocítica. La hemoglobinuria paroxística nocturna se presenta en 15,9 pacientes por cada millón de personas, afecta de forma similar a ambos sexos, mostrando un leve predominio en las mujeres al estar ligado al cromosoma X, y se manifiesta con hemólisis intravascular, anemia hemolítica, hemoglobinuria, insuficiencia renal, trombosis y otros síntomas inespecíficos que dificultan su diagnóstico temprano. El diagnóstico definitivo se realiza mediante citometría de flujo y el tratamiento incluye inhibidores del complemento como Eculizumab y Ravulizumab. En conclusión, la hemoglobinuria paroxística nocturna resulta un desafío clínico significativo, y sus avances en la investigación sobre su fisiopatología, diagnóstico y tratamiento han mejorado considerablemente el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes a largo plazo. Esta revisión de tema tiene como objetivo hacer una búsqueda de la literatura actual disponible sobre la hemoglobinuria paroxística nocturna, haciendo especial énfasis en su diagnóstico mediante la detección de deficiencia en las proteínas de superficie encargadas de la regulación del complemento. Para ello, se realizó una búsqueda en las bases de datos MedLine (PubMed), Clinical Key y Science Direct, sin restricción en tiempo ni idioma.

Palabras clave: Hemoglobinuria paroxística, activación del complemento, proteínas de la membrana, anticuerpos monoclonales humanizados.

ABSTRACT

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria is a disorder that occurs when there is a mutation, in the PIG-A gene, which's responsible for encoding the glycosylphosphatidylinositol anchored protein class A. This gene mutation causes a decrease or complete absence of complement proteins on the surface of blood cells leading to an imbalance in complement activity against these cells. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria affects 15.9 individuals per million people. Has a similar impact on both males and females although it slightly favors females due to its X linked nature. The condition presents with hemolysis, anemia, hemoglobinuria (the presence of hemoglobin in urine) renal failure, thrombosis and other nonspecific symptoms that make early diagnosis challenging. Flow cytometry is the method for diagnosing Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and treatment involves using complement inhibitors like Eculizumab and Ravulizumab. In summary, managing Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria poses difficulties; however, our understanding of its underlying mechanisms as well as advancements in diagnosis and treatment have greatly improved long term prognosis and quality of life for patients. This review aims to explore literature available on PNH with a focus on detecting deficiencies in surface proteins responsible for regulating complement activity as a means of diagnosing the condition. The search was conducted across databases including MedLine (PubMed) Clinical Key and Science Direct without any restrictions, on time or language.

Key words: Hemoglobinuria, paroxysmal, complement activation. Membrane proteins, antibodies, monoclonal, humanized.

RECIBIDO: 17 de enero de 2024.

ACEPTADO: 28 de marzo de 2024.

Mena-Zapata S. Deficiencia de proteínas de superficie en el diagnóstico de hemoglobinuria paroxística nocturna. Revisión de la literatura. *Salutem Scientia Spiritus* 2024; 10(1):82-87.



La Revista *Salutem Scientia Spiritus* usa la licencia Creative Commons de Atribución - No comercial - Sin derivar:

Los textos de la revista son posibles de ser descargados en versión PDF siempre que sea reconocida la autoría y el texto no tenga modificaciones de ningún tipo.

INTRODUCCIÓN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), también conocida como síndrome de Marchiafava-Micheli, es un trastorno hematológico adquirido de células madre hematopoyéticas, producido a partir de una desregulación del complemento contra la membrana eritrocítica, manifestándose como una hemólisis intravascular.¹ Clínicamente se presenta con hemoglobinuria, insuficiencia renal, episodios de trombosis, trombofilia adquirida, fallas de médula ósea y, fundamentalmente, con la anemia hemolítica, que se relaciona con síntomas como la fatiga siendo el más reportado, seguido de disnea, astenia, adinamia y dolor abdominal.² Esta condición es genética, y está asociada con la mutación somática del gen de biosíntesis de anclaje de glicano de fosfatidilinositol clase A (PIG-A) presente en el cromosoma X, conduciendo a la ausencia parcial o completa de las proteínas reguladoras del complemento presentes en la membrana del eritrocito.³ Por lo tanto, su diagnóstico se hace con la detección de la deficiencia o ausencia en la expresión de estas proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la citometría de flujo, especialmente CD55 y CD59.⁴

La HPN es poco común, con una prevalencia global estimada de 15,9 pacientes por cada millón de personas.⁵ A nivel de Colombia, es catalogada como una enfermedad “ultra-huérfana”, con menos de cinco casos por cada 10.000 individuos.⁶ No se encuentra directamente relacionada con un grupo etario específico, pero es habitual ubicarla entre los 30 y 40 años, y pese a ser una condición ligada al cromosoma X, resulta levemente predominante en mujeres.⁷ De igual forma, no parece tener una distribución étnica o geográfica en particular, cerca al 30% a 40% de los casos se encuentran reportados en Estados Unidos y Europa, mientras que menos del 10% en Asia.⁷ A pesar de ser una patología poco frecuente, presenta un gran impacto sobre la calidad de vida los pacientes, donde la tasa de supervivencia a una década hace 40 años era del 50%.⁸ Actualmente, con los avances en la investigación sobre la HPN y el desarrollo de medicamentos para su tratamiento como el Eculizumab, la tasa de supervivencia puede ser de hasta un 75%.⁷

FISIOPATOLOGÍA

En la HPN, la mayoría de los síntomas presentes en los pacientes se deben a la hemólisis intravascular, dada por una sensibilidad anormal de la membrana eritrocítica a su lisis mediada por el complemento.¹ Esta es consecuencia de una mutación somática del gen PIG-A del cromosoma X, que codifica para una glucosiltransferasa que se requiere para la síntesis de GPI, el cual, a su vez, tiene como función el anclaje de dos proteínas de membrana reguladoras del complemento: CD55 y CD59.⁹ Más específicamente, CD59 se une a la subunidad C8 para bloquear el reclutamiento y polimerización de C9, y, por ende, impedir el

ensamblaje del complejo de ataque a membrana (MAC), mientras que CD55 al ser el factor acelerador de la descomposición del complemento, controla su formación al inhibir enzimas como la C3 y la C5 convertasas, encargadas de escindir estas subunidades en múltiples moléculas que hacen parte de las vías de su activación. Por ende, la deficiencia de estas proteínas en los eritrocitos producidos a partir de la célula madre hematopoyética mutada permite la formación no regulada del MAC contra las membranas del glóbulo rojo, lisando y liberando hemoglobina y LDH al plasma, y puede ser exacerbada si el complemento es activado al mismo tiempo por estrés asociado a cirugías, traumas u otros desencadenantes inflamatorios.^{1,10}

Por otro lado, la mutación del gen PIG-A también puede ocurrir en células germinales, resultando generalmente en muerte embrionaria, y otra variante hipomórfica de esta que afecta granulocitos en lugar de eritrocitos, es la responsable del síndrome de anomalías congénitas múltiples-hipotonía-epilepsia, en el cual los niños presentan, entre muchas otras manifestaciones, discapacidad intelectual, rasgos faciales anormales, convulsiones y muerte a temprana edad.¹¹

Ahora bien, en condiciones normales, la hemoglobina liberada producto de la hemólisis eritrocítica es metabolizada como haptoglobina, y por medio de otros mecanismos depurativos. Sin embargo, en la HPN, estos mecanismos se encuentran saturados y la hemoglobina queda libre a lo largo de todo el sistema intravascular. El organismo, en un intento de compensar, une irreversiblemente la hemoglobina libre a óxido nítrico para formar metahemoglobina y nitrato, terminando con el suministro de óxido nítrico.¹² Éste último cumple múltiples funciones vasodilatadoras y de relajación del músculo liso, es por esta razón que es frecuente que en pacientes masculinos la incapacidad para vasodilatar se manifieste como disfunción eréctil, y, a su vez, genere disfagia, espasmo esofágico, dolor abdominal y distonía del tracto gastrointestinal, producto de la alteración en la relajación del músculo liso.¹³⁻¹⁴ Asimismo, estudios han indicado que los pacientes con HPN también pueden desarrollar alteraciones a nivel cardiovascular debido a la falta de óxido nítrico y a niveles elevados de péptido natriurético, promoviendo la hipertensión pulmonar (y consigo la aparición de disnea) y favoreciendo la disfunción ventricular derecha, respectivamente.¹⁵

Además de la hemólisis de los eritrocitos, el defecto creado en las proteínas de membrana por la mutación del gen PIG-A, la activación del complemento, y la pérdida de óxido nítrico, también aumentan la activación y agregación plaquetaria y la secreción de citoquinas proinflamatorias, favoreciendo la aparición de trombosis en aproximadamente un 40% de los pacientes con HPN durante el curso de su enfermedad.¹⁶⁻¹⁷ Esta trombosis es generalmente venosa, y se presenta con frecuencia a nivel cerebral, intraabdominal y en la vena hepática, siendo la causa

más significativa de morbilidad y mortalidad relacionada con esta condición.¹⁷ Adicionalmente, los pacientes con HPN son seis veces más propensos a desarrollar enfermedad renal crónica, debido a que la hemoglobina libre ejerce un efecto tóxico sobre el riñón, lo que puede llevar a lesión renal aguda, mientras que los depósitos de hierro, a su vez, conducen a infarto renal, cicatrización y disfunción tubular proximal; debido a lo cual los pacientes suelen presentar hemosiderosis.¹⁸⁻¹⁹

Si bien la investigación acerca de las características clínicas asociadas a la HPN es extensa, es de conocimiento que la mayor parte de los pacientes se presentan con un conjunto de signos y síntomas variables que no corresponden a un síndrome en específico, tales como malestar general, fatiga, disnea, coluria debido a la marcada hemoglobinuria, insuficiencia renal, disfagia o espasmos gastroesofágicos, dolor abdominal y lumbar, y disfunción eréctil. Puesto que los signos y síntomas son tan variables y poco específicos, a menudo resulta difícil diagnosticar esta condición, y, por consiguiente, su detección se retrasa.²⁰

BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO

La citometría de flujo es considerada el *Gold Standard* para el diagnóstico de la HPN, usando múltiples anticuerpos monoclonales y un reactivo específico llamado FLAER. Este reactivo es producido mediante el marcado con fluorescencia de una variante inactiva de la proteína proaerolisina, la cual se une selectivamente a las proteínas de membrana ancladas por el GPI, y de forma específica y sensible al CD55 y CD59, permitiendo determinar si existe una deficiencia o no de estas.²¹

Para dicho estudio, está descrito que deben ser evaluadas al menos dos proteínas ancladas por el GPI, con el fin de confirmar que no es una deficiencia congénita de un solo antígeno, ya sea de CD55 o CD59, o un polimorfismo con antígenos individuales como CD16, responsable de que las proteínas sean indetectables por anticuerpos monoclonales, los causantes de un falso negativo.²² Entonces, todos los eritrocitos, monocitos y granulocitos negativos para GPI son identificados, y posteriormente, los eritrocitos son clasificados en tipo 1, 2 o 3, según si presentan una expresión normal de las proteínas, si presentan una deficiencia parcial, o una ausencia completa, respectivamente.²³

Existen dos tipos de citometría de flujo disponibles: una de baja sensibilidad y otra de alta sensibilidad. A pesar de que la de baja sensibilidad es más que suficiente para diagnosticar la HPN, una de alta sensibilidad permite además identificar si está acompañada de algún otro trastorno de médula ósea, y a partir de este hallazgo, catalogar la enfermedad en tres tipos: HPN clásica, HPN con otro trastorno de médula ósea, y HPN subclínica, siendo que en esta última no existe evidencia clínica de hemólisis. Algunos de los trastornos de médula ósea más comunes que se presentan

acompañando a la enfermedad son la anemia aplásica, el síndrome mielodisplásico y la mielofibrosis primaria.²⁴

A pesar de no ser criterios de diagnóstico propiamente dichos, un hemograma completo con diferencial, un uroanálisis y un perfil metabólico básico pueden aportar información valiosa para el manejo del paciente, y ser la indicación inicial para ordenar pruebas más específicas como la citometría de flujo, pudiendo observarse en estas evidencia de anemia, citopenias, hemoglobinuria, hemosiderosis, incremento marcado de la LDH, baja haptoglobina e hiperbilirrubinemia no conjugada, a expensas de los recurrentes episodios de hemólisis intravascular.²⁴ Asimismo, el conteo de reticulocitos estará incrementado como una respuesta compensatoria, y la presencia de falla renal aguda se manifestará con una creatinina, electrolitos y nitrógeno ureico en sangre alterados.²⁵

Otras pruebas adicionales que pueden favorecer el diagnóstico incluyen al dímero D, péptido natriurético, un panel de función hepática, hierro sérico, aspirado de médula ósea o biopsia, y estudios citogenéticos.²⁶ Por otra parte, pruebas imagenológicas como la ecocardiografía evalúan la presencia de hipertensión pulmonar, la ecografía Doppler analiza el flujo hepático, y junto a la imagen por resonancia magnética pueden identificar la existencia de procesos trombóticos.²⁵

En cuanto a los diagnósticos diferenciales, se incluyen otras anemias hemolíticas, distintas causas de trombosis atípicas y condiciones que ocasionen fallas de médula ósea, como la hemoglobinuria paroxística por frío, la anemia hemolítica autoinmune, y desórdenes primarios de médula ósea como la anemia aplásica, el síndrome mielodisplásico, la mielofibrosis primaria, la anemia hemolítica microangiopática, la coagulación intravascular diseminada, y otras anemias hereditarias.²⁷

TRATAMIENTO

Anteriormente, el tratamiento de la HPN era fundamentalmente sintomático.²⁸ A los pacientes les realizaban transfusiones sanguíneas y suplementación férrica para intervenir la anemia producto de la hemólisis continua, y les administraban terapias trombo-profilácticas para prevenir los episodios trombóticos, acompañadas de trasplantes en respuesta a las complicaciones de médula ósea.²⁹

Debido a que la pérdida de las reservas de óxido nítrico del organismo secundaria a la hemólisis intravascular mediada por el complemento ha sido establecida como la manifestación principal de la HPN, su objetivo terapéutico se encuentra en la prevención de esta, por lo que, recientemente, se ha propuesto el uso de anticuerpos monoclonales humanizados contra la proteína C5 del complemento, reduciendo a su vez las complicaciones trombóticas y la mortalidad asociada.³⁰⁻³²

El Eculizumab, es un medicamento biológico que está disponible en Estados Unidos y Europa desde el 2007, y ha sido el primer tratamiento basado en anticuerpos anti-C5 que demostró una inhibición efectiva de la hemólisis intravascular mediada por el complemento.³³ Todas las vías del complemento finalizan en la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), el cual está formado por C3b, C5b y otras proteínas. Eculizumab, al prevenir que la proteína C5 se convierta en C5a y C5b, impide la formación del MAC, y por ende la hemólisis, sin embargo, se ha visto relacionado a un incremento del riesgo de infección por bacterias encapsuladas, como es el caso de la meningitis meningocócica, por lo que los pacientes antes de realizar la terapia con el medicamento deben recibir profilaxis antibiótica oral y ser vacunados contra *Neisseria*.³⁴⁻³⁵

Este medicamento se ha asociado con una reducción de más del 50% de los requerimientos transfusionales en los pacientes con HPN, y con una disminución de hasta un 70% del riesgo de complicaciones vasculares como los eventos trombóticos.³⁶⁻³⁷ No obstante, presenta limitaciones relacionadas con su corta vida media, requiriendo ser administrado con frecuencia cada dos semanas, a la vez de ser altamente costoso, por lo que una nueva terapia fue desarrollada en 2018; el Ravulizumab.³⁸ Este último medicamento es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-C5 de segunda generación, con una vida media hasta cuatro veces mayor que el anterior sin afectar su eficacia ni efectividad, requiriendo dosificación cada ocho semanas, y mostrando evidencia de ser mucho más costo-efectivo, por lo que se estima que, en el futuro, reemplace al Eculizumab como medicamento de primera línea para el tratamiento de la HPN.³⁹⁻⁴¹ Adicionalmente se encuentran en desarrollo otras alternativas de anticuerpos monoclonales anti-C5, siendo una de ellas el medicamento Crovalimab, que se une a la cadena beta de la proteína C5 y es efectivo en pacientes con ciertos polimorfismos de esta proteína para los que Eculizumab y Ravulizumab carecen de eficacia.⁴²⁻⁴³

A pesar de todo, los pacientes tratados con inhibidores de C5 pueden seguir presentándose anémicos y fatigados, y aún requerir de transfusiones, debido a que experimentan efectos adversos como la hemólisis intravascular farmacocinética o la hemólisis extravascular mediada por C3, cuyos mecanismos están asociados con estos medicamentos, y es por esta razón que también se han implementado terapias enfocadas en la inhibición de proteínas de fase más inicial en la formación del MAC, tales como C1, C3 y el factor D.⁴⁴⁻⁴⁷ Es el caso de Pegcetacoplan, un inhibidor de la proteína C3 que ha sido aprobado en 2021 por la Administración de Alimentos y Medicamentos, y ha demostrado controlar tanto la hemólisis intravascular como la extravascular, estar relacionado con reducciones clínicamente significativas de las transfusiones y el conteo total de reticulocitos, y presenta una superioridad frente al Eculizumab en el mejoramiento de los niveles de hemoglobina en los pacientes.⁴⁸⁻⁴⁹

Otras opciones terapéuticas están relacionadas con el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, siendo esta la única alternativa curativa disponible para este trastorno hematológico, sin embargo, no es ofrecida como terapia inicial y se realiza con baja frecuencia debido a su morbilidad asociada.⁵⁰⁻⁵¹ Las intervenciones restantes se basan en el desarrollo potencial de complicaciones asociadas a la HPN, tales como la terapia de reemplazo renal ante la falla renal aguda.²⁹

CONCLUSIONES

La hemoglobinuria paroxística nocturna es un trastorno hematológico que, aunque poco común, impacta ampliamente sobre la calidad de vida de los pacientes, implicando una secuencia de eventos que van desde la hemólisis intravascular mediada por el complemento hasta la activación plaquetaria y la generación de trombosis, así como múltiples complicaciones en diferentes órganos, incluyendo los riñones y el sistema cardiovascular.

En términos de tratamiento, los inhibidores de la cascada del complemento como el Eculizumab y el Ravulizumab, han revolucionado el manejo de la HPN al reducir la hemólisis y prevenir complicaciones trombóticas, mejorando significativamente las tasas de supervivencia de los pacientes, no obstante, nuevas opciones terapéuticas como el Pegcetacoplan han surgido para abordar sus limitaciones y muestran resultados prometedores en el control de la hemólisis tanto intravascular como extravascular.

En definitiva, la citometría de flujo ha demostrado ser crucial para el diagnóstico de la HPN, y acompañada de biomarcadores como la presencia de hemoglobinuria, anemia, y otras alteraciones en los resultados de diferentes pruebas de laboratorio contribuyen a la detección temprana de una enfermedad cuyo diagnóstico suele ser tardío.

En resumen, la HPN representa un desafío clínico importante, la comprensión de su fisiopatología, los avances en su diagnóstico y tratamiento, así como el desarrollo continuo de nuevas terapias, están mejorando satisfactoriamente el pronóstico y las perspectivas de los pacientes afectados por esta compleja condición hematológica, ofreciéndoles nuevas esperanzas y mejorando su calidad de vida a largo plazo.

REFERENCIAS

1. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2021; 137(10):1304-9. DOI: 10.1182/blood.2019003812
2. Schrezenmeier H, Kulasekararaj A, Mitchell L, de Latour P, Devos T, Okamoto S, *et al*. Predictors for improvement in patient-reported outcomes: post hoc analysis of a phase 3 randomized, open-label study of eculizumab and ravulizumab in complement inhibitor-naive patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Annals*

- of hematology. 2024; 103(1):5-15. DOI: 10.1007/s00277-023-05483-0
3. Panse J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Where we stand. *Am J Hematol.* 2023; 98(S4):S20-32. DOI: 10.1002/ajh.26832.
 4. Dezern AE, Borowitz MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 - clinical utility. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018; 94:16-22. DOI: 10.1002/cyto.b.21608
 5. Röth A, Maciejewski J, Nishimura JI, Jain D, Weitz JI. Screening and diagnostic clinical algorithm for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Expert consensus. *Eur J Haematol.* 2018; 101(1):3-11. DOI: 10.1111/ejh.13059
 6. Borré DE, Reyes J, Ramírez R, Dueñas C. Hemoglobinuria paroxística nocturna causa inusual de accidente cerebrovascular. *AMC.* 2017; 42(2):68.
 7. Richards SJ, Painter D, Dickinson AJ, *et al.* The incidence and prevalence of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and aplastic anaemia PNH syndrome: a retrospective analysis of the UK's population-based haematological malignancy research network 2004-2018. *Eur J Haematol.* 2021; 107:211-8. DOI: 10.1111/ejh.13640
 8. Schrezenmeier H, Röth A, Araten DJ, *et al.* Baseline clinical characteristics and disease burden in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): updated analysis from the international PNH registry. *Ann Hematol.* 2020; 99(7):1505-14. DOI: 10.1007/s00277-020-04052-z
 9. Shah N, Bhatt H. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023.
 10. Kulasekararaj A, Kuter D, Griffin M, Weitz I, Röth A. Biomarkers and laboratory assessments for monitoring the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Differences between terminal and proximal complement inhibition. *Blood Reviews.* 2023; 59. DOI: 10.1016/j.blre.2023.101041.
 11. Van der Crabben SN, Harakalova M, Brilstra EH, van Berkestijn FM, Hofstede FC, van Vught AJ, *et al.* Expanding the spectrum of phenotypes associated with germline PIGA mutations: a child with developmental delay, accelerated linear growth, facial dysmorphisms, elevated alkaline phosphatase, and progressive CNS abnormalities. *Am J Med Genet A.* 2014; 164A(1):29-35. DOI: 10.1002/ajmg.a.36184
 12. Schröder-Braunstein J, Kirschfink M. Complement deficiencies and dysregulation: pathophysiological consequences, modern analysis, and clinical management. *Mol. Immunol.* 2019; 114:299-311.
 13. Kokoris SI, Gavriilaki E, Miari A, *et al.* Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an update on clinical features, pathophysiology and treatment. *Hematology.* 2018; 23(8):558-66. DOI: 10.1080/10245332.2018.1444563
 14. Weisshaar K, Ewald H, Halter J, Gerull S, Schönfeld S, Senft Y, *et al.* Development of a patient-reported outcome questionnaire for aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PRO-AA/PNH). *Orphanet J Rare Dis.* 2020; 15:249. DOI: 10.1186/s13023-020-01532-3.
 15. Cella D, Johansson P, Ueda Y, Tomazos I, Gustovic P, Wang A, *et al.* Clinically important difference for the facit-fatigue scale in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a derivation from international PNH registry patient data. *Blood.* 2021; 138:1952. DOI: 10.1182/blood-2021-153127.
 16. Dingli D, Matos JE, Lehrhaupt K, Krishnan S, Yeh M, Fishman J, *et al.* The burden of illness in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving treatment with the C5-inhibitors eculizumab or ravulizumab: results from a US patient survey. *Ann Hematol.* 2022; 101:251-63. DOI: 10.1007/s00277-021-04715-5.
 17. Huang Y, Liu X, Chen F, Zhou W, Li H, Long Z, *et al.* Prediction of thrombosis risk in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Annals of hematology.* 2019; 98(10):2283-91. DOI: 10.1007/s00277-019-03770-3
 18. Socie G, Caby-Tosi MP, Marantz JL, *et al.* Eculizumab in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and atypical haemolytic uraemic syndrome: 10-year pharmacovigilance analysis. *Br J Haematol.* 2019; 185: 297-310. DOI: 10.1111/bjh.15790
 19. Wong EKS, Kavanagh D. Diseases of complement dysregulation-an overview. *Semin Immunopathol.* 2018; 40(1):49-64. DOI: 10.1007/s00281-017-0663-8
 20. Brando B, Gatti A, Preijers F. Flow Cytometric Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pearls and Pitfalls - A Critical Review Article. *EJIFCC.* 2019; 30(4):355-70.
 21. Macedo ÊS, Parente Filho SLA, Pro JDZ, Rolim VM, Primo GAS, Brunetta DM, *et al.* Renal involvement in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a brief review of the literature. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2018; 64(12):1139-46. DOI: 10.1590/1806-9282.64.12.1139
 22. Cooper J, Farah R, Stevenson P, Gooley T, Storb R, Scott B. Hematopoietic Cell Transplantation for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in the Age of Eculizumab. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2019; 25(7):1331-9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.01.033
 23. Peacock-Young B, Macrae FL, Newton DJ, Hill A, Ariëns RAS. The prothrombotic state in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a multifaceted source. *Haematologica.* 2018; 103(1):9-17. DOI: 10.3324/haematol.2017.177618
 24. Lima M. Laboratory studies for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, with emphasis on flow cytometry. *Pract Lab Med.* 2020; 20. DOI: 10.1016/j.plabm.2020.e00158
 25. Dingli D, Maciejewski J. P, Larratt L, Go R. S, Höchsmann B, Zu K, *et al.* Relationship of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) granulocyte clone size to disease burden and risk of major vascular events in untreated patients: results from the International PNH Registry. *Annals of hematology.* 2023; 102(7):1637-44. DOI: 10.1007/s00277-023-05269-4
 26. Escalante CP, Chisolm S, Song J, Richardson M, Salkeld E, Aoki E, *et al.* Fatigue, symptom burden, and health-related quality of life in patients with myelodysplastic syndrome, aplastic anemia, and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cancer Med.* 2019;

- 8:543-53. DOI: 10.1002/cam4.1953.
27. Kalam S, Beale R, Hughes D, Kulasekararaj A, Srirangalingam U. Coombs-positive Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. *Oxf Med Case Reports*. 2020; 2020(3):125. DOI: 10.1093/omcr/omz125
 28. Kaiser K, Yount SE, Martens CE, Webster KA, Shaunfield S, Sparling A, *et al.* Assessing Preferences for Rare Disease Treatment: Qualitative Development of the Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Patient Preference Questionnaire (PNH-PPQ®). *Patient Prefer Adherence*. 2020; 14:705-15. DOI: 10.2147/PPA.S233830
 29. Gembillo G, Siligato R, Cernaro V, Santoro D. Complement Inhibition Therapy and Dialytic Strategies in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: The Nephrologist's Opinion. *J Clin Med*. 2020; 9(5). DOI: 10.3390/jcm9051261
 30. Bektas M, Copley-Merriman C, Khan S, Sarda SP, Shammo JM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: current treatments and unmet needs. *J Manage Care Spec Pharm*. 2020; 26:14-20. DOI: 10.18553/jmcp.2020.26.12-b.s14
 31. Hillmen P, Szer J, Weitz I, *et al.* Pegcetacoplan versus eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2021; 384(11):1028-37
 32. Li J, Lin Y, Chen L, Qin L, Tan H, Zou J, *et al.* Identification of acquired PIGA mutations and additional variants by next-generation sequencing in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *International journal of laboratory hematology*. 2020; 42(4):473-81. DOI: 10.1111/ijlh.13228
 33. Kulasekararaj AG, Hill A, Rottinghaus ST, *et al.* Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. *Blood*. 2019; 133(6):540-9. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-876805>
 34. Tamura S, Furuya Y, Hori Y, Hiroi T, Yamashita Y, Oiwa T, *et al.* [Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab in Wakayama, Japan: a retrospective analysis]. *Rinsho Ketsueki*. 2020; 61(6):605-11. DOI: 10.11406/rinketsu.61.605
 35. Yu ZY, Tsai MJ, Lin YJ, Liu WD, Chou SC, Hung CC. Disseminated gonococcal infection in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria having received ravulizumab and meningococcal vaccine. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020; 53(4):660-2. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.06.013
 36. Röth A, Araten DJ, Larratt L, Kulasekararaj AG, Maciejewski JP, Wilson A, *et al.* Beneficial effects of eculizumab regardless of prior transfusions or bone marrow disease: Results of the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Eur J Haematol*. 2020; 105(5):561-70. DOI: 10.1111/ejh.13485
 37. Kang KW, Moon H, Lee BH, Jeon MJ, Yu ES, Kim DS, *et al.* Nationwide study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in South Korea: paradox of eculizumab. *Ann Hematol*. 2020; 99(7):1493-1503. DOI: 10.1007/s00277-020-04133-z
 38. Stern RM, Connell NT. Ravulizumab: a novel C5 inhibitor for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ther Adv Hematol*. 2019; 10. DOI: 10.1177/2040620719874728
 39. Alashkar F, Rottinghaus S, Vance C, Herich-Terhürne D, Dührsen U, Assert R, *et al.* No evidence for hypogammaglobulinemia in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) chronically treated with ravulizumab. *PLoS One*. 2020; 15(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0230869
 40. O'Connell T, Buessing M, Johnson S, Tu L, Thomas SK, Tomazos I. Cost-Utility Analysis of Ravulizumab Compared with Eculizumab in Adult Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Pharmacoeconomics*. 2020; 38(9):981-94. DOI: 10.1007/s40273-020-00929-z
 41. Lee JW, Kulasekararaj AG. Ravulizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Expert Opin Biol Ther*. 2020; 20(3):227-37. DOI: 10.1080/14712598.2020.1725468
 42. Röth A, Nishimura JI, Nagy Z, Gaál-Weisinger J, Panse J, Yoon SS, *et al.* The complement C5 inhibitor crovalimab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2020; 135(12):912-20. DOI: 10.1182/sangre.2019003399
 43. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, *et al.* Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med*. 2014; 370: 632-39. DOI: 10.1056/NEJMoa1311084
 44. Schwartz CE, Stark RB, Borowiec K, Nolte S, Myren K-J. Norm-based comparison of the quality-of-life impact of ravulizumab and eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Orphanet J Rare Dis*. 2021; 16(1):389. DOI: 10.1186/s13023-021-02016-8
 45. Brodsky RA, Peffault de Latour R, Rottinghaus ST, *et al.* Characterization of breakthrough hemolysis events observed in the phase 3 randomized studies of ravulizumab versus eculizumab in adults with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2021; 106(1):230-7. DOI: 10.3324/haematol.2019.236877
 46. Lee JW, Sicre de Fontbrune F, Wong Lee Lee L, *et al.* Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in adult patients with PNH naive to complement inhibitors: the 301 study. *Blood*. 2019; 133(6): 530-9.
 47. Fattizzo B, Kulasekararaj AG. Second-Generation C5 Inhibitors for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *BioDrugs*. 2020; 34(2):149-58. DOI: 10.1007/s40259-019-00401-1
 48. Wong RSM, Navarro-Cabrera JR, Comia NS, *et al.* Pegcetacoplan controls hemolysis in complement inhibitor-naïve patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Adv*. 2023; 7: 2468-78. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022009129
 49. Hillmen P, Szer J, Weitz I, *et al.* Pegcetacoplan versus Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2021; 384(11):1028-37. DOI: 10.1056/NEJMoa2029073
 50. Markiewicz M, Drozd-Sokolowska J, Biecek P, Dzierzak-Mietla M, Boguradzki P, Staniak M, *et al.* Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Multicenter Analysis by the Polish Adult Leukemia Group. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020; 26(10):1833-39. DOI: 10.1016/j.bbmt.2020.05.024
 51. Du Y, Yang Y, Yang C, Chen M, Han B. Clinical characteristics of 512 eculizumab-naïve paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients in China: a single-center observational study. *Hematology*. 2022; 27:113-21. DOI: 10.1080/16078454.2021.2022849