

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO DE MEDICINA



Hemoglobinúria Paroxística Noturna

Revisão de literatura

**Carlos Diogo Ferreira Lucas de Freitas
2015/2016**

Carlos Diogo Ferreira Lucas de Freitas
Mestrado Integrado em Medicina
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Hemoglobinúria Paroxística Noturna: Revisão de literatura

Dissertação para obtenção do grau de Mestre,
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Margarida Lima
Assistente hospitalar graduada, consultora de
Imunohemoterapia do Serviço de Hematologia Clínica
do Centro Hospitalar do Porto, professora auxiliar
convidada do Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do Porto.

Porto, 2016

Dedicatória

A quem tornou o mundo num sítio mais bonito, bastando para isso existir.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Professora Doutora Margarida Lima, orientadora do presente trabalho, por toda a disponibilidade demonstrada desde o primeiro momento. Reconheço uma postura extraordinária, orientando-me em momentos nos quais eu não sabia sequer estar em dificuldades e ajudando-me mesmo nos mais pequenos detalhes. Se este trabalho está concluído, devo-o de facto à Professora. Sinceramente, obrigado.

Agradeço ainda à Doutora Maria Luís Queirós, pela disponibilização do trabalho "*Hemoglobinúria Paroxística Nocturna: várias faces da mesma doença, do diagnóstico ao tratamento*" como guia para o meu, consistindo numa base forte para a sua realização.

Abreviaturas

CAM – Complexo de ataque à membrana

DHL – Desidrogenase do lactato

GlcNAc-PI – *N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol transferase*

GPI – *Glycosylphosphatidylinositol*

HPN – Hemoglobinúria paroxística noturna

HSC – *Hematopoietic stem cells*

HTP – Hipertensão Pulmonar

INR – *International normalized ratio*

LMA – Leucemia mieloblástica aguda

MBL - *Manose Binding Lectin*

NT-ProBNP – *N-terminal pro-brain natriuretic peptide*

PIGA – *Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A*

PIGM – *Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class M*

PIGT – *Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T*

RMN – Ressonância magnética nuclear

SMD – Síndrome mielodisplásica

TF – *Tissue factor*

TFPI – *Tissue factor pathway inhibitor*

tPA – *tissue plasminogen activator*

u-PA – *urokinase-type Plasminogen Activator*

u-PAR – *urokinase-type plasminogen activator receptor*

VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule 1*

VWF – *von Willebrand factor*

Resumo

Introdução e objetivos: A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença rara, clonal, causada por um defeito adquirido de membrana em diferentes linhas celulares do sangue. É causada por mutações somáticas adquiridas do gene *PIGA*, de que resultam defeitos de síntese do glicosil-fosfatidil-inositol, que serve de âncora para a ligação de numerosas proteínas à superfície das células. Associa-se a manifestações clínicas como hemólise intravascular, trombose de vasos de grande calibre e anemia aplásica, com grande impacto na morbimortalidade. Nos últimos anos, o eculizumab, um anticorpo monoclonal humanizado cujo mecanismo de ação consiste na ligação a C5, impedindo a acção da C5 convertase e a ativação do complemento, tem revelado resultados promissores na abordagem à doença. Este trabalho teve como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre a HPN, focando a epidemiologia, a fisiopatologia, a genética, as manifestações clínicas, o diagnóstico e o tratamento.

Metodologia: Pesquisa bibliográfica realizada na MedLine®, via Pubmed®, orientada pelo livro publicado por Queirós & Lima, em 2011, seguida de leitura de artigos selecionados.

Resultados e Conclusões: A HPN é uma doença adquirida rara, com apresentações de hemólise intravascular (clássica) e de aplasia medular. Frequentemente verificam-se afetação renal ou pulmonar e a morbimortalidade associa-se predominantemente a fenómenos trombóticos. O estudo da HPN com recurso a novas técnicas de diagnóstico permite uma caracterização detalhada da doença com base em populações de clones mutados, com relevância na decisão terapêutica. O eculizumab teve profundo impacto na progressão clínica e bem-estar dos doentes, com resultados promissores na gravidez, e abriu caminho a outras estratégias terapêuticas. A melhor abordagem da falência medular requer futura investigação.

Palavras-chave: Hemoglobinúria Paroxística Noturna; *PIGA*; GPI; anemia hemolítica; trombozes; anemia aplásica; eculizumab.

Abstract

Introduction and objectives: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria is a rare, clonal disease resulting from an acquired membrane defect spanning distinct hematopoietic cell lineages. It originates on *PIGA* gene mutations leading up to glycosylphosphatidylinositol synthesis defects, a molecule acting as an anchor for different cell-surface proteins. It associates thusly with clinical manifestations such as intravascular hemolysis, large caliber vessels' thrombosis and aplastic anemia, impacting both morbidity and mortality. Recent studies involving eculizumab, a monoclonal humanized antibody binding C5 and preventing C5 convertase action and complement activation, have showed promise. The purpose of this work is to review literature concerning PNH, focusing on epidemiology, pathophysiology, genetics, clinical manifestations, diagnostic and treatment.

Methods: Literature review over MedLine®, via Pubmed®, using the publication of Queirós & Lima, in 2011, as guidance, ensued with detailed reading of selected articles.

Results and Conclusions: PNH is a rare acquired disease, presenting as hemolysis (classic PNH) or aplastic anemia. Often, there's renal or lung involvement, with morbi-mortality predominantly linked to thromboembolic events. Studying PNH with new diagnostic techniques has wielded a detailed disease characterization, based on mutated clone populations, with relevance over therapeutic approaches. Eculizumab has had profound impact in both disease progression and quality of life, with promising data concerning pregnancy, paving the way for further therapies. Approaches concerning bone marrow failure warrant further investigation.

Keywords: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria; *PIGA*; GPI; hemolytic anemia; thrombosis; aplastic anemia; eculizumab.

Índice

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Abreviaturas	iv
Resumo.....	v
Abstract	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. EPIDEMIOLOGIA	2
3. ETIOPATOGENIA	3
3.1. Genética	3
3.1.1 PIGA.....	3
3.1.2 PIGM.....	3
3.1.3 PIGT	3
3.1.4 Outras alterações genéticas.....	3
3.2. Sistema do Complemento	4
3.2.1.Vias de ativação do complemento.....	4
3.2.2. Ação da trombina e da plasmina.....	4
3.2.3. Regulação do complemento	5
3.3. Mecanismos de expansão clonal.....	5
3.3.1. Deriva genética.....	5
3.3.2. Vantagem proliferativa intrínseca.....	5
3.3.3. Pressão de seleção externa	6
3.4.Tipos de HPN e expressão de CD59 nos eritrócitos	6
4. FISIOPATOLOGIA	7
4.1. Hemólise.....	7
4.1.1 Hemólise intravascular	7
4.1.2. Hemólise extravascular	7
4.3. Distúrbios da coagulação	7
4.3.1. Ação sobre o endotélio	7
4.3.2 Deficiência de proteínas ancoradas a GPI com papel na hemostase.....	8
4.3.3 Depleção de óxido nítrico	8
4.3.4 Disfunção plaquetária	8
4.3.5 Papel das microvesículas.....	8

4.3.6 Desregulação dos mecanismos endógenos de fibrinólise	9
4.4. Mecanismos de lesão renal	9
4.5. Disfunção da vasculatura e tecido muscular liso	9
5. CLÍNICA	10
5.1. Sintomatologia	10
5.2. Formas de apresentação clínica	10
5.2.1 HPN hemolítica	10
5.2.2 HPN hipoplásica	10
5.3. Manifestações e complicações frequentes	11
5.3.1. Anemia hemolítica	11
5.3.2 Tromboembolismo	11
5.3.3. Anemia aplásica	12
5.3.4. Insuficiência renal	13
5.3.5. Hipertensão Pulmonar	14
5.4. Qualidade de vida	14
6. CASOS PARTICULARES	15
6.1 Crianças e adolescentes	15
6.2 Gravidez	15
7. DIAGNÓSTICO	17
7.1. Testes convencionais	17
7.1.1 Teste de Ham	17
7.1.2 Teste da sacarose	17
7.2. Citometria de fluxo	17
7.2.1 Quantificação de proteínas ligadas ao GPI	17
7.2.2 FLAER	18
7.3. Estudo da medula óssea	18
7.4. Estudo genético	18
8. TRATAMENTO	19
8.1. Opções terapêuticas frequentes	19
8.1.1. Eculizumab	19
8.1.2 Terapêutica anticoagulante	21
8.1.3 Suplementação de ácido fólico	21
8.1.4 Suplementação de ferro	21
8.1.5 Suporte transfusional	21

8.1.6	Imunomoduladores.....	22
8.1.7	Corticoterapia.....	22
8.1.8	Quelantes de ferro	22
8.2	Tratamento curativo	22
8.2.1	Transplante alogénico de medula óssea	22
8.3	Terapêuticas adicionais	23
8.3.1	Transplante hepático.....	23
8.3.2	Embolização de artérias esplénicas.....	23
8.3.3	Terapêutica trombolítica.....	23
8.3.4	Shunt transjugular intrahepático porto-sistémico	23
8.4	Terapêuticas em investigação.....	23
9	CONCLUSÕES.....	25
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN), doença adquirida muito rara, caracteriza-se por uma expressão deficiente de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI, *Glycosylphosphatidylinositol*), molécula que serve de âncora para a ligação de proteínas à membrana das células hematopoiéticas (Brodsky, 2014). Entre estas, contam-se proteínas reguladoras do sistema de complemento, como o CD55 e CD59.

Na génese da HPN estão mutações do gene *PIGA* (*phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A*), codificando para a enzima fosfatidil-inositol-N-acetil-glucosamina-transferase (GlcNAc-PI, *N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol*), intervindo na síntese do GPI.

A deficiência de GPI, e conseqüentemente da expressão de proteínas aí ancoradas à membrana celular, condiciona fenómenos fisiopatológicos responsáveis por manifestações clínicas da HPN e pela associação com outras doenças das células progenitoras hematopoiéticas, como anemia aplásica.

A clínica da HPN é vasta, com diferentes apresentações, dependendo do tipo de clone ou clones de HPN e da sua proporção face às células normais, mas também de outros mecanismos que não estão ainda esclarecidos. Contudo, são fenómenos característicos a hemólise intravascular, com hemoglobinúria, a trombose de vasos de grande calibre, e, em alguns doentes, a anemia aplásica. Menos específicos, mas potencialmente observáveis em doentes com HPN, são sinais e sintomas como fadiga, dispneia, disfagia, dor abdominal, dor torácica, disfunção erétil e insuficiência renal.

Há um impacto significativo na qualidade de vida e na mortalidade, com taxas de sobrevivência aos 10 anos evoluindo dos 50%, em meados do século XX, até aos 75%, à altura da introdução do anticorpo monoclonal eculizumab como opção terapêutica. Erro! A origem da referência não foi encontrada.

Adicionalmente, são adotadas outras medidas na abordagem da doença, como administração de anticoagulantes. O transplante alogénico de medula óssea, apesar dos riscos associados, continua a ser a única via para obtenção de uma cura (excluindo casos de remissão espontânea).

Este trabalho visa rever o tema da HPN, englobando epidemiologia, fisiopatologia, genética, manifestações clínicas e formas de apresentação, diagnóstico e tratamento.

2. EPIDEMIOLOGIA

A HPN é uma doença rara, cuja prevalência na Europa foi estimada em 1 a 9 casos por milhão de habitantes (<http://www.orpha.net/>). O único estudo epidemiológico europeu publicado foi realizado em Inglaterra e aponta para uma incidência de 1.3/milhão habitantes/ ano e para uma prevalência de 15.9/milhão de habitantes (Hill, 2007).

A doença pode surgir em qualquer idade e em ambos os sexos, havendo uma maior concentração de diagnósticos durante a terceira década de vida. A distribuição entre géneros aparenta ser também equitativa, refletindo a localização do gene *PIGA* no cromossoma X (um dos alelos é silenciado por inativação do cromossoma X em mulheres). Todavia, Muñoz-Linares e colaboradores encontraram uma tendência para apresentação mais precoce em doentes do sexo masculino, particularmente de ascendência asiática (Muñoz-Linares, 2014).

O diagnóstico de HPN pode surgir em doentes com síndromes de falência medular como anemia aplásica ou síndrome mielodisplásica (SMD) podendo por vezes evoluir para leucemia mieloblástica aguda (LMA) (Hillman, 1995; Socie, 1996). O aumento doutras neoplasias não está documentado pela maioria dos estudos, verificando-se estas ocasionalmente em doentes transplantados devido à imunossupressão, sendo as mais frequentemente observadas linfomas.

A mortalidade na HPN tem vindo a decrescer, mas mantendo-se em valores significativamente elevados. Enquanto em 1940 a mortalidade aos 10 anos após o diagnóstico chegava aos 50%, após 2008, diferentes estudos revelam taxas de sobrevida aos 10 a 15 anos na ordem dos 65% a 75% (de Latour, 2011). Das causas de morte mais frequentes constam as trombozes (arteriais ou venosas) em 40% a 67% dos casos e insuficiência renal em 8% a 18%, surgindo o cancro, na maioria dos estudos publicados, como causa em apenas 1% a 4% dos casos.

O eculizumab, disponível como terapêutica após os primeiros ensaios clínicos realizados entre 2004 e 2007, tem revelado resultados animadores relativamente a morbilidade, qualidade de vida e mortalidade, apresentando uma taxa de sobrevida aos 5 anos de cerca de 95% nos doentes tratados, não diferindo da observada na população em geral (Kelly, 2011).

3. ETIOPATOGENIA

3.1. Genética

3.1.1 *PIGA*

A HPN caracteriza-se pela expressão deficiente de GPI na membrana de células hematopoiéticas de diferentes linhagens, na sequência de mutações somáticas adquiridas nas células progenitoras hematopoiéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*), ao nível do gene *PIGA*, localizado no braço curto do cromossoma X (Xp22.1) (Takeda, 1993; Miyata, 1993; Miyata, 1994; Bessler, 1994).

A enzima GlcNAc-PI, codificada pelo gene *PIGA*, intervém na biossíntese da âncora de GPI, que serve como ponto de ligação de numerosas proteínas à superfície das células; nos doentes com deficiência em GPI ocorre deficiência destas proteínas na membrana externa das células afetadas, com consequências funcionais (Queirós, 2011).

As mutações do gene *PIGA* diferem entre doentes, não conduzindo aos mesmos resultados. As células podem classificar-se com base no tipo de expressão de âncoras de GPI, relacionando-se com o tipo de mutação. Células com uma expressão normal de proteínas ligadas ao GPI são classificadas de células tipo I. Células com mutações no gene *PIGA* do tipo *missense*, apresentam expressão diminuída de proteínas habitualmente ligadas ao GPI e são designadas células do tipo II. Aquelas onde ocorreram mutações do tipo *frameshift* constituem as células tipo III, sem âncoras de GPI. No mesmo doente podem coexistir estas diferentes populações. As proporções presentes variam de doente para doente, e conforme a linha celular analisada (Pakdeesuwana, 2000). Desempenham também um papel na forma de apresentação da doença, já que as células tipo III são mais sensíveis à lise por complemento (Packman, 1979), e as trombozes são mais comuns em doentes com clones do tipo II.

3.1.2 *PIGM*

Foi descrita uma mutação autossómica recessiva no gene *PIGM* (cromossoma 1), codificando para a enzima manosil-transferase que, nos casos de homozigotia, origina deficiência de GPI. Manifesta-se por uma síndrome hereditária com trombozes na infância e alterações neurológicas, sem hemólise significativa (Almeida, 2006; Costa, 2014).

3.1.3 *PIGT*

Foram identificadas mutações no gene *PIGT* (cromossoma 20), condicionando deficiências de proteínas ligadas ao GPI. As manifestações variam, conforme o tipo de mutação e as células afetadas, podendo incluir hemólise intravascular e síndromes autossómicas recessivas complexas, com atraso intelectual, alterações neurológicas, distonia muscular, alterações esqueléticas, endócrinas e oftalmológicas (Krawitz, 2013; Kvarnung, 2013; Lam, 2016).

3.1.4 Outras alterações genéticas

Na HPN estão presentes outras alterações genéticas, para além de mutações somáticas do gene *PIGA*, podendo preceder ou suceder estas últimas (Lee, 2014; Shen, 2014). Um trabalho

publicado por Shen e colaboradores mostrou que, nas células HPN, para além das mutações somáticas do gene PIGA, são frequentes mutações somáticas em outros genes implicados na patogénia de neoplasias mielóides, como *TET2*, *SUZ12*, *U2AF1*, e *JAK2* (Shen, 2014).

3.2. Sistema do Complemento

O sistema do complemento desempenha um papel central na fisiopatologia da HPN (Risitano, 2013), participando nele mais de 30 proteínas solúveis e/ou de membrana, o que ajuda a compreender alguns das manifestações da doença. Salienta-se o papel de C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e dos reguladores do complemento CD55 e CD59, podendo a ativação e a regulação deste sistema ocorrer por diferentes mecanismos (Noris, 2013; Varela, 2015).

3.2.1. Vias de ativação do complemento

Via clássica

O complemento activa-se pela formação de complexos antigénio-anticorpo, com participação de IgG ou IgM. Despoleta-se a associação de C2a e C4b à membrana das células, provenientes respetivamente de C2 e C4, formando-se C3 convertases. Estas ligam-se a fragmentos C3b (provenientes de C3), originando C5 convertases, as quais clivam C5 em C5a (atividade pró-inflamatória e pró-coagulante) e C5b. C5b forma com C6 e C7 o complexo C5b67, ao qual se liga C8, penetrando na membrana e recrutando moléculas de C9 para formar poros de C5b6789_n (complexo de ataque à membrana, CAM), responsáveis pela lise celular.

Via da lectina

A ativação decorre pela ligação da manose ligada à lectina (MBL, *Manose Binding Complex*) a hidratos de carbono, despoletando a ação de proteases de serina, com um efeito idêntico ao dos imunocomplexos e promovendo a clivagem de C3.

Via alternativa

Aqui a ativação resulta de hidrólise espontânea de C3 em C3a e C3b, ocorrendo no plasma. A C3b liga-se o Fator B, o qual é clivado pelo Fator D, formando-se C3bBb, o qual se estabiliza por ligação ao Fator P, formando o complexo C3bBbP, com atividade enzimática. Este, por sua vez, pode clivar mais C3, amplificando o efeito. O C3b formado pode associar-se à membrana, ligar-se novamente a Fator B e por ação de fator D formar novo C3Bb, associado à membrana. Este C3Bb funciona como C3 convertase, que associada a novo C3 origina C3₂Bb, uma C5 convertase com ações semelhantes às das vias anteriormente referidas. A via alternativa será responsável por mais de 75% dos produtos de ativação do complemento. Refira-se ainda que o C3b formado e acumulado à superfície das células contribui para a sua opsonização e posterior fagocitose pelas células do sistema reticulo-endotelial.

3.2.2. Ação da trombina e da plasmina

A trombina, como a plasmina (após ativação do plasminogénio pela calicreína), pode clivar C3, e no caso da primeira, actuar como uma C5 convertase.

3.2.3. Regulação do complemento

A regulação do complemento, levada a cabo por proteínas plasmáticas ou membranares, tem como propósito a prevenção de danos às células do próprio indivíduo. Na HPN, a ausência ou diminuição de proteínas ancoradas ao GPI, nomeadamente o CD55 e o CD59, vai ter impacto deletério na regulação do complemento. A CD55 é um fator acelerador da degradação das C3 convertases membranares e um inibidor da sua formação, limitando a formação de C5 convertase. A CD59 ancora-se a GPI, sendo o inibidor *major* da via terminal do complemento. Liga-se ao C8 no processo de formação do CAM, prevenindo a adição de moléculas de C9 e formação de poros. A ausência de CD59 da superfície dos eritrócitos será aliás o fator responsável por muitas das manifestações de HPN. Mutações no gene que codifica para o CD59 e resultando na sua perda originam fenótipos mimetizando HPN, nomeadamente hemólise intravascular paroxística e fenómenos trombóticos. Nesses casos, como há ausência de CD59 ao nível de todas as células, ocorrem outras manifestações, como neuropatia periférica na sequência de desmielinização por ativação do complemento.

Além das moléculas associadas ao GPI, existem outras proteínas com função de regulação do complemento, como o CD46, o Fator B, a trombomodulina e o Fator H.

3.3. Mecanismos de expansão clonal

Para a ocorrência de HPN é necessária a presença de pelo menos uma população proveniente de um clone mutado, mas a existência de células com mutação do gene *PIGA* não é sinónimo de doença. Não há uma teoria conclusiva quanto ao processo que leva à expansão das células mutadas, considerando-se inclusivamente a possibilidade de concorrência de diferentes mecanismos.

3.3.1. Deriva genética

A ocorrência de mutações em indivíduos saudáveis, aliada ao facto de na hematopoiese normal só uma proporção relativamente pequena de HSC estar ativa em dado momento, poderia justificar, pelo acaso, a obtenção de uma população de células com mutação no gene *PIGA*. Não se explicam todavia a ocorrência simultânea de clones com diferentes mutações no gene *PIGA* no mesmo indivíduo (altamente improvável dependendo apenas do acaso), nem a associação de HPN a outras condições como anemia aplásica.

3.3.2. Vantagem proliferativa intrínseca

Mutações no gene *PIGA* (ou mecanismos subjacentes) confeririam às HSC mutadas maior capacidade proliferativa, independentemente das pressões exercidas pelo meio envolvente. Ainda que numerosos estudos confirmem que mutações com inativação do *PIGA* não conferem, por si só, maior capacidade replicativa, estudos recentes, com sequenciação do exoma de doentes com HPN a partir de HSC CD59- e CD59+, revelaram a ocorrência concomitante de outras mutações (Luzzatto, 2016). Estas frequentemente surgem previamente às do *PIGA*, podendo também ocorrer na sequência das mesmas, estando muitas delas presentes em outras neoplasias mielóides. Consistente com esta teoria está o facto de

poderem existir HSC com mutações no gene *PIGA* em indivíduos saudáveis. Das mutações associadas podemos referir as dos genes *HMG2A*, *NRAS*, *JAK2*, *TET2*, *SUZ12*, *ASXL1*, *BCOR*.

3.3.3. Pressão de seleção externa

É bastante consensual o papel exercido pela pressão de seleção externa do meio extracelular, através do sistema imune, na seleção de clones de HSC com mutação do gene *PIGA*, evidenciado pela associação entre anemia aplásica e HPN, considerando-se que a deficiente expressão de GPI confere aos clones mutantes capacidade de evasão ao processo responsável pela hipoplasia/aplasia medular. Várias teorias procuram explicar este processo de seleção, com a do reconhecimento, nas células alvo da ação do sistema imunitário, de proteínas ligadas ao GPI, por meio da apresentação por moléculas do Sistema Maior de Histocompatibilidade (MHC), como o HLA-DR, ou de moléculas semelhantes às do MHC, como o CD1d (Shichishima & Noji, 2002; Gargiulo, 2013). Os casos de diagnóstico de HPN em anemia aplásica só raramente apresentam hemólise.

3.4. Tipos de HPN e expressão de CD59 nos eritrócitos

É possível classificar a HPN consoante o tipo de expressão de CD59 nos eritrócitos. Uma distribuição bimodal com predomínio populacional de eritrócitos tipo III (deficiência completa de CD59) sobre tipo I vestigiais (normais, sem deficiência de CD59) é classificada como HPN tipo III, com comportamento hemolítico. Quando esta distribuição bimodal ocorre entre populações de eritrócitos tipo II (deficiência parcial de CD59) e tipo I, com predomínio dos primeiros, temos HPN tipo II. Numa distribuição trimodal atribui-se a designação de HPN II+III. Define-se ainda uma HPN hipoplásica, na presença de uma população de eritrócitos predominantemente normal, com frações baixas de eritrócitos do tipo II e/ou do tipo III. As populações de clones não são estáticas ao longo da vida, podendo haver conversão de determinados tipos de HPN noutros, ou mesmo cura espontânea (mais provável com clones HPN de cerca de 1%).

4. FISIOPATOLOGIA

A forma clássica de HPN caracteriza-se por um permanente estado de hemólise, resultando de falência na inativação do sistema do complemento, com períodos de exacerbação paroxísticos, podendo suceder episódios de inflamação, trauma ou cirurgia. Outros mecanismos estão também implicados na sua fisiopatologia, com implicações clínicas. Ainda que a hemólise seja responsável por muita da sintomatologia, fenómenos como trombose e insuficiência renal estão associados a mortalidade.

4.1. Hemólise

4.1.1 Hemólise intravascular

A hemólise intravascular pode ocorrer em qualquer tipo de HPN, estando mais associada à HPN hemolítica. Ocorre pela geração de CAM na superfície dos eritrócitos CD59-, formando-se poros estabelecendo uma solução de continuidade entre o meio intracelular e extracelular, permitindo um influxo de água para o interior das células, com turgescência e posterior lise. Liberta-se conteúdo eritrocitário para o plasma, com implicações fisiológicas, salientando-se hemoglobina, desidrogenase do lactato (DHL) e arginase, sendo as duas últimas utilizadas como indicadores de hemólise.

4.1.2. Hemólise extravascular

Nos doentes com HPN a hemólise é predominantemente intravascular, ocorrendo todavia um certo grau de hemólise extravascular, resultante da acumulação de fragmentos de C3 na superfície dos eritrócitos na sequência da ativação do complemento, contribuindo para a opsonização dessas células e fagocitose pelo sistema reticulo-endotelial. Nos doentes tratados com eculizumab, o qual trunca a ativação de C5 convertase, aumenta a fração de eritócitos opsonizados e a sua fagocitose pelo sistema reticuloendotelial, potenciando-se o papel da hemólise extravascular. Embora comumente se associe a opsonização pelo fragmento C3b, reconhecido pelo recetor de complemento CR3, alguns estudos sugerem que o fragmento C3dg possa contribuir para a *clearance* extravascular (Roumenina, 2015).

4.3. Distúrbios da coagulação

A HPN é caracterizada por um estado pró-coagulante, com múltiplos mecanismos explicativos que não justificam, isoladamente, o risco trombótico nestes doentes (van Bijnen, 2012; Hill, 2013).

4.3.1. Ação sobre o endotélio

A lesão endotelial é relevante para os fenómenos de trombóticos, podendo ocorrer por ação da hemoglobina livre ou de micropartículas libertadas durante a lise de células HPN. As micropartículas contêm Fator Tecidual (TF, *Tissue Factor*), despoletando um aumento da expressão deste ao nível do endotélio, havendo um aumento da atividade pró-inflamatória e pró-trombótica endotelial, com produção das suas próprias micropartículas. Tal pode monitorizar-se pelo aumento dos níveis plasmáticos de moléculas como o Fator de von

Willebrand (VWF, *von Willebrand Factor*) e de VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*). A lesão endotelial directa pelo complemento é outra possibilidade, com dados de estudos preliminares sendo contraditórios.

4.3.2 Deficiência de proteínas ancoradas a GPI com papel na hemostase

O fator inibidor do TF (TFPI, *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) inibe a formação de TF, formando uma estrutura quaternária com esta molécula, FVIIa e FXa (ativadores da cascata da coagulação). Liga-se ao GPI através de um cofator, sendo expresso à superfície das plaquetas após a ativação destas. Plaquetas e monócitos produzem TFPI, mas provém principalmente do endotélio dos pequenos vasos sanguíneos. O papel da sua expressão deficiente na HPN na gênese da trombose requer mais estudos, mas nos casos com mutações no gene *PIGM* (onde a expressão endotelial é também deficiente) considera-se o mecanismo predominante (Almeida, 2006).

A proteinase 3, proteína ancorada a GPI expressa nos neutrófilos, reduz a ativação plaquetária induzida pela trombina, degrada o recetor da proteína C e o TFPI, estimula a produção de TF e a degradação de VWF. Portanto, foi levantada a hipótese da expressão deficiente de proteinase 3 contribuir para o risco trombótico (Jankowska, 2011).

4.3.3 Depleção de óxido nítrico

A hemólise intravascular na HPN aumenta os níveis de hemoglobina livre, que diminui os de óxido nítrico, com aumento do tónus das fibras musculares lisas e consequentemente do tónus da vasculatura. Sendo tal negligenciável no sistema venoso, pode ser relevante na trombose arterial, sendo mais estudos necessários para avalia-lo.

4.3.4 Disfunção plaquetária

A ativação das plaquetas pode desempenhar um papel importante na trombose da HPN, pois não são destruídas pelo CAM, conseguindo separar-se dele mesmo com CD55 e CD59 ausentes. A deficiência destes reguladores do complemento traduz-se todavia em ativação plaquetária, com atividade aumentada de protrombinase e libertação de microvesículas. Na perda da ação de CD59, aumenta a actividade pró-coagulante, com plaquetas HPN exibindo mais locais de ligação ao Fator Va. No entanto, em situações de hiperativação, pode haver uma inibição compensatória dos mecanismos de adesão e agregação, agravando-se a disfunção plaquetária.

4.3.5 Papel das microvesículas

A ativação, inflamação ou dano celular podem romper a integridade da membrana celular, expondo fosfolípidos aniónicos com a fosfatidilserina, ou formando-se microvesículas/micropartículas a partir da membrana, expondo à superfície fosfatidilserina e contendo moléculas como TF. A fosfatidilserina recruta complexos enzimáticos pró-coagulantes como a protrombinase e a tenase. Alguns estudos revelam, em doentes com HPN, níveis de microvesículas aumentados, particularmente as com origem em plaquetas (Hugel, 1999), eritrócitos (Ninomiya, 1999; Kosuma, 2011) e células endoteliais (Simak, 2004),

resultando da ativação do complemento sem regulação do CD59 nas células sanguíneas com fenótipo HPN. C5a induz a produção de TF pelos monócitos e a libertação de micropartículas ricas neste pró-coagulante. Sugere-se portanto uma correlação entre HPN, maior libertação de micropartículas e aumento do risco trombótico.

4.3.6 Desregulação dos mecanismos endógenos de fibrinólise

O ativador da uroquinase do plasminogénio (u-PA, *urokinase-type plasminogen activator*) converte plasminogénio em plasmina, participando em mecanismos de fibrinólise, ação potenciada pela ligação ao recetor da u-PA (u-PAR, *urokinase-type plasminogen activator receptor*), ancorado a GPI. O u-PAR liga-se a GPI e nas plaquetas e leucócitos com fenótipo HPN tem de facto uma expressão diminuída (Ploug, 1992), podendo a fibrinólise estar afetada na HPN. Aliás, há um aumento do u-PAR dissolvido no plasma (Ninomiya, 1997), estando estes níveis plasmáticos aumentados associados à ocorrência de trombozes e à inibição da geração de plasmina em doentes com HPN (Sloand, 2008). Ainda assim, os estudos sobre fibrinólise em doentes com HPN são pouco esclarecedores.

4.4. Mecanismos de lesão renal

O rim é um órgão atingido na HPN (Hussain, 2013). A deposição de hemoglobina nos glomérulos, particularmente durante exacerbações de hemólise intravascular, pode levar a necrose tubular aguda, com instalação de falência renal aguda (Wijewickrama, 2013). A deposição de ferro nos rins pode despoletar disfunção dos túbulos proximais. A trombose da microvasculatura, irrigação renal diminuída e fibrose intersticial são mecanismos associados a lesão renal crónica na HPN (Sahin, 2015). A insuficiência renal crónica pode ainda despoletar ou agravar uma falência medular, sendo isto raro e geralmente abordado com administração de eritropoietina.

4.5. Disfunção da vasculatura e tecido muscular liso

A hemoglobina livre não removida pela haptoglobina sequestra, pela formação de nitrato e metahemoglobina, o óxido nítrico produzido pelo endotélio e com atividade de relaxante da fibra muscular lisa. Esta depleção de óxido nítrico agrava-se pela degradação de L-arginina (utilizada para a formação de óxido nítrico) por meio da arginase, formando-se ornitina (Rother, 2005). Consequentemente, ocorre espasmo generalizado do músculo liso, nomeadamente das túnicas vasculares, com hipertensão, nomeadamente pulmonar, e outras alterações, como disfunção erétil e disfagia, complicações comuns a outras anemias hemolíticas intravasculares (Rother, 2005).

A expressão de níveis normalmente mais elevados de TFPI pela vasculatura pulmonar potencialmente explica fenómenos como hipertensão pulmonar (HTP), aquando uma expressão deficiente, como na HPN

5. CLÍNICA

Clinicamente, na HPN, traduzem-se processos fisiopatológicos caracteristicamente associados à doença (como hemólise intravascular) e potencialmente danos a outros órgãos não diretamente envolvidos na sua etiologia, podendo estes ser altamente debilitantes e implicar risco de vida. Aquando a elaboração de um plano de investigação, há menor sensibilidade dos clínicos para a HPN, pela raridade desta, reflectindo-se num atraso do diagnóstico e início de terapêutica dirigida (Sahin, 2015). A HPN deve portanto considerar-se sempre como diagnóstico diferencial em situações sem uma razão identificável para anemia hemolítica não imune, trombose, dor abdominal, dispneia e falência renal.

5.1. Sintomatologia

A sintomatologia na HPN frequentemente cursa com significativo impacto na qualidade de vida dos doentes, ainda que haja casos de apresentações frustradas. Schrezenmeier e colaboradores observaram que em 93% dos casos há presença de um ou mais sinais ou sintomas, sendo os mais frequentes fadiga (80%), dispneia (64%), cefaleias (63%) e hemoglobinúria (62%), com 38% dos doentes do género masculino reportando disfunção erétil (Schrezenmeier, 2014). Em regra, verifica-se a presença de mais do que um sintoma por doente. O tamanho do clone HPN não determina a sintomatologia, mas doentes com clones superiores a 50% têm mais frequentemente hemoglobinúria, dispneia, dor abdominal, conjuntivas itéricas, disfunção erétil e disfagia. A sintomatologia pode ainda alertar para situações com risco de vida, estando queixas de dor abdominal associadas a um risco 3.6 vezes superior de trombose.

5.2. Formas de apresentação clínica

5.2.1 HPN hemolítica

Forma clássica de apresentação de HPN, com clones HPN frequentemente de grandes proporções e períodos de exacerbação de hemólise intravascular com hemoglobinúria. A medula óssea tem frequentemente capacidade para repor a perda de leucócitos, ainda que à custa de células deficientes, verificando-se geralmente citopenias ligeiras, com reticulocitose na sequência de hemólise. Pode associar-se ainda trombose, uma causa de morte frequente nestes doentes.

5.2.2 HPN hipoplásica

Os doentes apresentam-se comumente com citopenias, em detrimento de hemoglobinúria ou hemólise vascular franca. Verifica-se uma concomitância de aplasia medular, podendo estar na origem do quadro de HPN, por vezes associada a terapêutica imunossupressora. Podem ocorrer anemia, neutropenia e trombocitopenia e a doença manifestar-se por astenia, infeções ou hemorragias, sendo ainda possíveis fenómenos trombóticos.

5.3. Manifestações e complicações frequentes

Comorbidades em doentes com HPN são frequentes e em quase metade dos casos ocorre uma sobreposição de uma síndrome *major* ao quadro de HPN, sendo as situações mais frequentes anemia aplásica, tromboembolismo e insuficiência renal, expondo-se seguidamente alguns dos quadros mais frequentes.

5.3.1. Anemia hemolítica

Na HPN pode verificar-se a ocorrência de hemólise intravascular crónica, por vezes subclínica e difícil de quantificar, podendo ser exacerbada em episódios paroxísticos, mais frequentes na apresentação HPN hemolítica. Nesta ocorre hemoglobinúria que, podendo ocasionalmente não ser percebida macroscopicamente pelo doente, se recolhida a urina para diferentes tubos ao longo de um período de 48 horas, se torna evidente para qualquer clínico. A DHL e a arginase 1 são bons indicadores de hemólise intravascular. O teste de Coombs (direto e indireto) é geralmente negativo, com o direto positivando nalguns casos de doentes medicados com eculizumab. O valor da bilirrubina indireta está frequentemente aumentado. Pode ocorrer ferropenia, com deposição de ferro nos túbulos renais e lesão renal aguda. Sintomatologia associada a espasmo do tecido muscular liso, como disfagia, dor abdominal, disfunção erétil e crise hipertensiva são mais frequentes na HPN hemolítica. Secundariamente à anemia pode verificar-se dispneia, astenia, taquicardia e dor torácica. Há também um risco acrescido de litíase biliar.

O valor basal da hemoglobina é variável, podendo até ser normal nalguns casos, traduzindo uma boa resposta medular (contrariamente aos casos de aplasia medular). Contudo, a maioria dos doentes apresenta anemia no mínimo moderada. Geralmente, durante os paroxismos de hemólise intravascular, há uma descida abrupta da hemoglobina, mas flutuações menos violentas dos valores de leucócitos e plaquetas, podendo baixar moderadamente. A hemoglobina livre aumenta, acontecendo o inverso com as haptoglobinas. Durante a fase regenerativa verifica-se um aumento da reticulocitose, pela capacidade de resposta medular.

Os valores basais de ácido fólico estão frequentemente diminuídos pela estimulação da eritropoiese, podendo ocorrer anemia macrocítica. Os valores de ferro são mais estáveis, podendo todavia diminuir e traduzir-se em anemia microcítica (frequentemente normocrómica, mas podendo ser hipocrómica). Há ainda casos de anemia normocrómica normocítica.

5.3.2 Tromboembolismo

A HPN caracteriza-se por um estado pró-coagulante, com risco aumentado de eventos trombóticos (Weitz, 2011; van Bijnen, 2012; Hill, 2013). A trombose, uma das manifestações típicas da doença, ocorre em locais pouco comuns, na síndrome de Budd-Chiari (44% dos episódios de trombose) (Valla, 1987), ou seios venosos do sistema venoso central (Meppiel, 2015). Dor abdominal intensa e persistente e cefaleia inusual devem ser tomadas como sinais de alarme, principalmente na presença de D-dímeros elevados e trombocitopenia.

Os níveis mais elevados de TFPI no endotélio da microvasculatura cerebral, pulmonar e hepática de indivíduos normais, e a sua deficiência nos casos de HPN, podem explicar os locais atípicos da ocorrência de fenómenos tromboembólicos.

Na síndrome de Budd-Chiari ocorre trombose geralmente em várias veias hepáticas (no envolvimento de apenas um vaso, o curso é frequentemente indolente e subtil). As formas aguda e subaguda caracterizam-se por dor abdominal, ascite, hepatomegalia, icterícia e falência renal. Falência hepática fulminante pode ocorrer.

Enquanto alguns doentes sofrem trombozes multiorgânicas (cérebro, fígado e/ou intestino), há casos de trombose subclínica.

A incidência de trombose venosa profunda ou embolia pulmonar na HPN varia entre 16% a 39% (Lazo-Langner, 2015) e, para clones de maiores dimensões, o risco cumulativo de trombose venosa ou arterial aos 10 anos oscila entre os 30% a 40%. O risco relativo de ocorrência de fenómenos tromboembólicos em doentes com HPN aumenta 1.64 vezes por cada aumento de 10% na população de clones mutados, sendo o risco superior ao da população em geral mesmo em doentes com clones pequenos. A menor incidência de trombose venosa profunda em doentes provenientes da China e do Japão (clones de HPN geralmente de proporções menores) em comparação com doentes de regiões ocidentais (maiores clones) parece suportar tais dados.

Os fenómenos trombóticos podem ocorrer em qualquer idade, com alguns estudos identificando a 5ª década de vida como mais frequente. Há também uma associação com obesidade (a qual é um preditor independente do risco de tromboembolismo). Em doentes com tromboembolismo sem causa aparente foram identificados clones pequenos de HPN (inferiores a 0.2%) considerando que tal se possa dever à ação de micropartículas com importante atividade procoagulante provenientes dos eritrócitos lisados.

A ressonância magnética nuclear (RMN) parece ser a melhor técnica imagiológica para o diagnóstico de fenómenos trombóticos.

5.3.3. Anemia aplásica

A associação de HPN com anemia aplásica e outros quadros de falência medular como SMD, é hoje amplamente reconhecida. Um estudo retrospectivo multicêntrico com um grande número de doentes revelou a deteção de clones de granulócitos HPN $\geq 1\%$, em 18.5% dos doentes com anemia aplásica, em 1.1% dos doentes com SMD e em 2.3% dos doentes com outras síndromes de falência medular (Raza, 2014). Usando citometria de fluxo de alta sensibilidade (deteção de clones HPN $\geq 0.01\%$) estes valores aumentavam para 39.5%, 1.8% e 7.8%, respetivamente. Há maior percentagem de casos de clone HPN detetado na anemia aplásica do que nos SMD e noutras síndromes de falência medular, mas a mediana do tamanho do clone e os níveis séricos de DHL eram superiores nestes últimos casos (5.1%, 17.6% e 24.4%, respetivamente) e a percentagem de doentes com aumento da DHL ($\geq 1.5 \times$ o limite superior do normal) foi de 18.3% nos doentes com aplasia medular e de 42.0% nos doentes com SMD (Raza, 2014).

O diagnóstico de anemia aplásica pode preceder o diagnóstico de HPN em vários anos, havendo contudo doentes cujo diagnóstico de anemia aplásica surge com HPN previamente diagnosticada, sendo que na aplasia medular com clone de HPN o tamanho deste é preditor para desenvolvimento de hemólise (Pu, 2011). O desenvolvimento de um clone HPN permitirá um escape ao sistema imune no contexto de anemia aplásica, podendo chegar a ser responsável por 90% da hematopoiese ocorrida.

Na associação de anemia aplásica e HPN parece haver uma maior incidência de infeções e hemorragias, com a remissão da doença da medula óssea mais frequentemente associada a cura para HPN.

Os protocolos para tratamento da anemia aplásica sugerem a administração de metilprednisolona, globulina anti-timócito e ciclosporina A, ponderando-se a utilização de alemtuzumab nos doentes refratários (Guinan, 2011). O transplante alogénico de medula óssea é o único tratamento curativo, considerando-se como tratamento de primeira linha nos doentes elegíveis, com anemia aplásica severa e com dador compatível, assim como na eventual falência do tratamento com imunossuppressores.

5.3.4. Insuficiência renal

O envolvimento renal, não sendo geralmente clinicamente evidente na HPN, quando ocorre, varia entre disfunção aguda reversível e dano irreversível (Hussain, 2013; Wijewickrama, 2013).

A intervenção sobre dano renal deve ser precoce, para prevenir disfunção progressiva e/ou dano permanente, os quais podem surgir ou agravar-se durante episódios paroxísticos de hemoglobinúria, com tradução em oligúria, edemas e dor lombar.

Um doente com HPN com queixas súbitas e falência renal poderá apresentar não só lesão renal aguda (geralmente necrose tubular aguda), mas ainda sobreposição com doença renal crónica.

A prioridade, na lesão renal aguda, é estimular a clearance do grupo heme (toxicidade inerente) pela reposição de volume, não incorrendo em sobrecarga hídrica. Casos com perda de função renal significativa, poderão necessitar da realização de hemodiálise. A insuficiência observada é geralmente reversível, sem ocorrência de danos permanentes.

A instalação de danos permanentes é mais insidiosa, correlacionando-se com deposição de ferro nos rins e indução dum estado de nefrite intersticial permanente. Constata-se pois a importância da monitorização de marcadores de sobrecarga de ferro nos doentes com HPN, particularmente na disfunção renal.

Mesmo nos casos de doença renal crónica em HPN, a evolução para necessidade de diálise crónica não é frequente.

5.3.5. Hipertensão Pulmonar

A associação entre HTP nas anemias hemolíticas adquiridas e pior prognóstico é perceptível (Hill, 2012).

Estudos no âmbito de HPN com recurso à determinação do NT-ProBNP (*N-terminal Pro-brain natriuretic peptide*), um biomarcador de disfunção cardíaca, ao Eco-Doppler cardiográfico e à RMN revelam que a HTP afeta uma proporção significativa de doentes, em percentagem superior à estimada, pela existência de formas subclínicas, podendo mesmo culminar na disfunção do ventrículo direito, situação frequente nos casos estudados (Hill, 2012).

A ocorrência desta comorbilidade é mais frequente na HPN hemolítica, pelas consequências fisiopatológicas do sequestro de óxido nítrico, podendo a DHL ser utilizada para rapidamente estimar doentes em risco (valores ≥ 2 vezes superiores ao normal).

A qualidade de vida é significativamente afetada pela HPN, com a maioria dos doentes apresentando queixas de dispneia, mais frequentemente classificada como moderada a severa, e havendo um risco acrescido para morte súbita por falência ventricular direita.

5.4. Qualidade de vida

A aplicação dos questionários EORTC QLQ-C30 e FACIT-Fatigue revelam que a ocorrência de trombozes é um determinante para a perda de global de saúde, qualidade de vida, autonomia e bem-estar físico e social nos doentes afetados (Weitz, 2013). Infere-se ainda que basta a ocorrência de um sintoma associado à doença para haver perda significativa da qualidade de vida, coexistindo ou não outros eventos, como necessidade de transfusões (Hillmen, 2006-Verificar).

As hospitalizações são comuns na HPN, mas mais frequentes quando há história de trombose ou a ocorrência de sinais ou sintomas como conjuntivas ictéricas, dor torácica, disfagia, dor abdominal, hemoglobinúria, dispneia ou fadiga nos 6 meses prévios ao internamento.

A HPN frequentemente condiciona absentismo laboral, referindo um número significativo de doentes não trabalhar ou trabalhar menos por sua causa.

6. CASOS PARTICULARES

6.1 Crianças e adolescentes

A HPN é uma condição particularmente rara em crianças, surgindo aí associada a outras doenças da medula óssea, com falência medular (Van Den Heuvel-Eibrink, 2005). Na sua etiologia evidencia-se assim um mecanismo de selecção externa, possivelmente imune.

As formas de apresentação de HPN mais típicas nesta idade coadunam-se com a HPN hipoplásica, em detrimento da clássica. Discrasias hemorrágicas e fadiga são frequentes na apresentação da doença, podendo ocorrer infeções. Contrariamente ao verificado em adultos, a hemólise intravascular com hemoglobinúria não é o quadro típico (cerca de 15% dos casos).

A correlação forte verificada, na idade pediátrica, entre HPN e doenças da medula óssea como SMD e anemia aplásica, justifica que no caso de diagnóstico de qualquer uma destas seja despistada a coexistência da primeira.

Fenómenos tromboembólicos são menos frequentes na HPN pediátrica, particularmente a nível do sistema venoso. Dada esta maior raridade, pode haver casos pediátricos de trombose sem um diagnóstico etiológico exato, evocando-se um cuidado redobrado nestas situações futuramente.

Face a causas de mortalidade há uma distinção clara entre as populações pediátrica e adulta, com fenómenos tromboembólicos surgindo à cabeça da última. Assim, temos uma maior variabilidade de causas, com maior correlação com doenças da medula óssea, referindo-se, entre outras, infeções e neoplasias (nomeadamente pós-transplante).

O tratamento na HPN pediátrica, pela maior frequência de aplasia medular dirige-se mais às causas da aplasia, privilegiando-se imunomoduladores – todavia, situações de HPN clássica parecem beneficiar do tratamento com eculizumab (Reiss, 2014). Há uma maior necessidade de transplante alogénico, pela coexistência de doenças da medula óssea, tendo como vantagem a possibilidade de cura, mas sendo um procedimento a ponderar caso a caso, pelos riscos associados.

Um estudo multicêntrico relativamente recente, com avaliação de 85 crianças com anemia aplásica adquirida mostrou detecção de clones HPN em 41% dos doentes ao diagnóstico, 48% dos doentes sob terapêutica imunossupressora e 45% dos doentes sem terapêutica (Timeus, 2014). Nesse estudo não foi encontrada relação entre a presença de clone HPN e a resposta ao tratamento com imunossupressores.

6.2 Gravidez

A abordagem à gravidez na HPN aparenta dividir-se em dois períodos, separados pelo início da terapia com eculizumab.

Previamente à introdução do eculizumab, as complicações da HPN eram exacerbadas durante a gravidez, com maiores taxas de mortalidade para a mãe e criança, prolongando-se o risco para a primeira no pós-parto. Era frequente a trombocitopenia, com tromboembolismo e

infecção como principais causas de morte. Como terapêutica poderiam ser utilizados anticoagulantes a partir do 6º mês da gravidez e até 6 semanas após o parto, não havendo contudo garantia de prevenção de complicações. Uma maior população de células HPN parecia associar-se a maior probabilidade de problemas durante a gravidez. No pós-parto surgiriam também problemas hemorrágicos, nomeadamente pela medicação anticoagulante. Apenas metade das gravidezes seria de termo. Assim, a HPN podia mesmo ser considerada como uma contra-indicação relativa para engravidar.

A terapêutica com eculizumab aparenta vir a revolucionar este paradigma e a informação já obtida de seguimento de gravidezes sob terapêutica com eculizumab são muito animadoras.

Kelly e colaboradores publicaram, em 2010, um estudo sobre 7 mulheres que durante pelo menos uma fase da gravidez fizeram terapêutica com eculizumab (Kelly, 2010), o qual indicava para a eficácia da medicação e segurança na gravidez. Um estudo mais recente, em que foram avaliadas retrospectivamente 75 gravidezes de 61 mulheres com HPN tratadas com eculizumab confirmou o benefício desta terapêutica durante a gravidez, para a mãe e o feto (Kelly, 2015). Foi ainda demonstrado que, havendo alguma passagem de eculizumab através da barreira placentária, a concentração é insuficiente para causar bloqueio do complemento no feto (Kelly, 2010; Hallstensen, 2015).

A terapêutica com eculizumab na gravidez parece prevenir algumas das complicações associadas, não significando que não possa haver necessidade de transfusões ou complicações como pré-eclampsia. Pode ser necessário um reajuste da terapêutica no final da gravidez, pela aparente tendência para ocorrência de hemólise nos dias prévios a uma nova administração de fármaco. Tal poderá dever-se a uma maior ativação do complemento e à expansão do volume plasmático. A utilização de eculizumab não exclui terapêutica anticoagulante, devendo ser instaurada heparina de baixo peso molecular durante a gravidez.

7. DIAGNÓSTICO

A HPN clássica cursa com hemoglobinúria, mais evidente de manhã, considerando-se inicialmente tal dever-se a acidose respiratória ocorrida durante o sono. Isso levou o Dr. Thomas Ham a desenvolver um método diagnóstico para HPN baseado na provocação de hemólise em meio ácido. Até cerca da década de 90 do século XX, os testes de Ham e da sacarose eram os mais utilizados no diagnóstico de HPN; doravante a citometria de fluxo veio a tornar-se preponderante, sendo atualmente o método diagnóstico de eleição (Preis, 2014).

7.1. Testes convencionais

7.1.1 *Teste de Ham*

Teste com incubação dos eritrócitos em meio de soro acidificado, com aqueles apresentando fenótipo HPN tendo maior probabilidade de sofrer lise, sendo esta determinada pela quantificação de hemoglobina livre por espectrofotometria

7.1.2 *Teste da sacarose*

Consiste na incubação de amostras de sangue em solução hipotónica de sacarose para activar o sistema do complemento, com ocorrência de hemólise.

7.2. Citometria de fluxo

Os testes descritos anteriormente só estabelecem um diagnóstico para hemólises superiores a 10%, não detetando populações relativamente pequenas de células mutadas. Adicionalmente, não são específicos, positivando noutras situações de maior fragilidade eritrocitária, nomeadamente na anemia megaloblástica, anemia diseritropoiética congénita e esferocitose hereditária.

A citometria permite a imunofenotipagem de diferentes linhas celulares recorrendo a anticorpos monoclonais específicos para proteínas expressas nas células, conjugados com diferentes fluorocromos. A identificação da deficiência de CD55 e CD59 à superfície dos eritrócitos de HPN, o estabelecimento de uma conexão com alteração da expressão da GPI e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para outras moléculas ligadas ao GPI expressas nos leucócitos permitiram a introdução da citometria de fluxo no diagnóstico desta doença. Esta metodologia diagnóstica é actualmente a mais utilizada, detectando frequências de clones mutantes até 0.01%.

7.2.1 *Quantificação de proteínas ligadas ao GPI*

A utilização da expressão deficiente de CD55 e CD59 nos eritrócitos pode ser útil para avaliar a manifestação da doença e para detetar casos com clones eritrocitários tipo II, mas, dada a ocorrência de hemólise e de transfusões, não é uma boa opção para avaliar o tamanho basal da população de eritrócitos HPN. Para melhor detecção e avaliação da população clonal alterada pode analisar-se outras células no sangue periférico de doentes com HPN, como neutrófilos e monócitos. Os marcadores utilizados são diferentes dos previamente aplicados para os eritrócitos.

No diagnóstico de HPN são usados anticorpos monoclonais dirigidos contra proteínas não ancoradas ao GPI para selecionar os diferentes tipos de células (por exemplo, CD33 e CD15 nos neutrófilos e CD33 e CD64 nos monócitos), e anticorpos monoclonais específicos para proteínas ligadas a GPI (por exemplo, CD16 e CD24 nos neutrófilos e CD14 nos monócitos) para identificar e quantificar as células deficientes nestas proteínas, isto é, os clones HPN (Richards, 2007).

7.2.2 FLAER

A aerolisina (toxina bacteriana) liga-se especificamente às âncoras GPI, provocando hemólise. O FLAER (*fluorescein-labeled proaerolysin*) é uma aerolisina mutante (pró-aerolisina), ligando-se às âncoras GPI sem provocar hemólise, conjugada com um fluorocromo (Alexa 488), e podendo utilizar-se para detetar clones HPN, por citometria de fluxo (Brodsky, 2000). Em condições otimizadas, tem grande sensibilidade e especificidade na deteção de clones HPN de granulócitos e monócitos (mesmo na ordem dos 0.01%) (Dahmani, 2016). Contudo, não permite detetar o clone HPN nos eritrócitos, visto estes expressarem glicoforina, que estabelece ligações fracas com a toxina (Sutherland, 2007).

7.3. Estudo da medula óssea

A análise do sangue periférico permite uma determinação mais exacta da proporção do clone mutado face ao aspirado medular, habitualmente não utilizado para este fim, devido aos diferentes graus de diferenciação das células medulares e expressão mais heterogénea dos diferentes marcadores. Contudo, o estudo medular é útil nos casos de suspeita de associação de HPN a doença da medula óssea, sendo aí o mielograma e a biópsia de medula óssea essenciais para avaliar a coexistência de mielodisplasia e/ou aplasia medular.

7.4. Estudo genético

A determinação da mutação do gene *PIGA* pode utilizar-se na confirmação de um diagnóstico de HPN, mas o facto de continuar a ser necessário traduzir-se no desenvolvimento de uma população clonal mutada para a ocorrência de doença, a variabilidade das mutações e a presença ocasional das mesmas em indivíduos saudáveis levam a que este método não seja utilizado como técnica habitual no diagnóstico de HPN.

8. TRATAMENTO

Historicamente o tratamento da HPN era predominantemente de suporte e sintomático, com suplementação com ácido fólico e ferro e realizando-se transfusões quando necessário (Parker, 2005). A morbidade e mortalidade eram elevadas, não havendo, à exceção do transplante alogénico de medula, nenhuma medida eficaz para travar a progressão da doença. O eculizumab alterou este paradigma (Devalet, 2015).

8.1. Opções terapêuticas frequentes

8.1.1. Eculizumab

O eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado, cujo mecanismo de ação consiste na ligação a C5, impedindo a ativação de C5 convertase e inibindo o CAM.

Após o primeiro estudo piloto realizado em 11 doentes com HPN, cujos resultados foram publicados em 2004 (Hillmen, 2004), estudos subsequentes demonstraram que o eculizumab é um medicamento eficaz e bem tolerado, diminuindo de forma significativa a hemólise e as necessidades transfusionais dos doentes com HPN, com impacto significativo na melhoria da sintomatologia e qualidade de vida. Salientam-se os estudos TRIUMPH (Hillmen, 2006)^{Erro! A origem da referência não foi encontrada.} e SHEPERD (Brodsky, 2008), ambos de fase 3, duplamente cegos e controlados contra placebo, que incluíram 87 e 97 doentes com HPN, respetivamente. Mencione-se ainda outro estudo publicado em 2007, incluindo 195 doentes dos estudos anteriormente referidos, e que documentou a segurança a longo prazo e a eficácia do eculizumab, assim como a redução dos eventos tromboembólicos (Hillmen, 2007).

A ação desta medicação na cascata da coagulação pode ter impacto em casos de doentes com HPN com história de trombose, preconizando-se nestes a sua administração. Além da prevenção da hemólise, parece haver outras vias contribuindo para uma diminuição do risco trombótico, com estudos prévios evidenciando uma redução significativa de marcadores de ativação endotelial e da coagulação nos doentes tratados com eculizumab. (Helley, 2010) (Weitz, 2016).

Outros estudos documentaram a ação deste fármaco na diminuição da hipertensão pulmonar (Hill, 2010), na recuperação da função renal (Hillmen, 2010) e na melhoria dos sintomas resultantes de distonia do músculo liso (Hill, 2005). Finalmente, foi demonstrada a sua tolerância e eficácia a longo prazo, com diminuição da morbidade e mortalidade (Kelly, 2011) (Hillmen, 2013).

Refira-se que o eculizumab atua na porção terminal da via do complemento, compensando a deficiência de CD59 na superfície dos eritrócitos de HPN, mas nada fazendo relativamente à falta de CD55. Continua, portanto, a ocorrer uma opsonização por fragmentos de C3, com fagocitose dos eritrócitos por macrófagos (Risitano, 2011), ocorrendo uma hemólise extravascular iatrogénica, com positividade do teste de Coombs em mais de 50% dos doentes (Höchsmann, 2012). Isto potencia-se ainda pela seleção de clones mutados que frequentemente ocorre na sequência da terapêutica com eculizumab. Pode limitar-se a recuperação da anemia, frequente em doentes com HPN, mas que nem sempre é superada

com recurso a este fármaco. Há portanto doentes atingindo uma independência de transfusões, enquanto outros poderão continuar a necessitar delas, ainda que em menor frequência (Luzatto, 2011). Paradoxalmente, 10% dos doentes com HPN, após início da terapia com eculizumab, experimentam uma diminuição da população de eritrócitos CD59-.

No sudeste asiático há subpopulação de doentes de HPN com falência de resposta ao tratamento com eculizumab. Tal foi atribuído a uma mutação no gene *C5* (c. 2654G), com uma alteração da estrutura de *C5* impedindo a ligação do fármaco; na população japonesa, a prevalência deste polimorfismo é de 3.5% (Nishimura, 2014).

Esta medicação parece ter um bom nível de segurança, justificando-se todavia alguns cuidados. Um dos maiores riscos é o aumento à suscetibilidade a infeções por *Neisseria meningitides*, preconizando-se, nos doentes que fazem tratamento com eculizumab, a administração da vacina anti-meningocócica tetravalente (A/C/Y/W-135), que cobre todos os meningococos exceto os da estirpe **BErro! A origem da referência não foi encontrada.** (Dmytrijuk, 2008). A vacina conjugada 4CMenB protege contra uma percentagem significativa de estirpes do serogrupo B, mas factores como a variabilidade das estirpes, o efeito e a duração da imunidade podem desafiar a fundamentação da instituição desta vacina (Simões, 2014). Contudo, ela parece ter utilidade noutros grupos de risco (como crianças com idade inferior a 12 meses), podendo ser razoável considerar a sua aplicação em doentes sob terapêutica com eculizumab. Existe ainda um risco de septicemia estimado em 0.5 casos por cada 100 doentes / ano, havendo quem recomende também a antibioterapia profilática com penicilina V, 500 mg duas vezes dia por via oral, ou eritromicina, 500 mg duas vezes por dia por via oral, nos doentes alérgicos à penicilina (Kelly, 2011).

O eculizumab é uma medicação crónica onerosa, introduzida recentemente e ainda sem critérios universais definidos para a sua administração. Assim, o contexto clínico e económico e a experiência do médico assistente têm um papel na decisão de início da terapêutica. Todavia, há sinais de alarme urgindo a sua prescrição, destacando-se anemia severa, trombose, dor abdominal ou torácica, fadiga com impacto nas atividades da via diária, insuficiência renal e dispneia. Não servindo, isoladamente, o tamanho do clone HPN de decisor terapêutico, clones HPN superiores 50% nos granulócitos e a 10% de eritrócitos, com elevação da DHL, podem servir como indicadores, em indivíduos com boa reserva medular. Na HPN hipoplásica, uma terapêutica orientada para a causa da falência medular poderá ser mais benéfica, nomeadamente corticosteróides e imunossuppressores.

A terapêutica é administrada por via endovenosa, com intervalos de 14 dias e na dose de 900 mg. Em alguns doentes (menos de 5% dos casos) pode ocorrer hemólise súbita, geralmente nos dias prévios a nova administração do fármaco, precedida por um pico de DHL. Tal pode decorrer de fatores de *stress* pontual (infeção, cirurgia), não motivando ajuste terapêutico salvo se ocorrer com regularidade, podendo aí justificar administrações mais frequentes (12 em 12 dias) e aumento da dosagem (até 1200 mg).

A manutenção da terapêutica é fulcral, pois ocorrendo frequentemente um aumento do clone de eritrócitos de HPN circulante, a suspensão pode despoletar uma crise hemolítica grave. A monitorização deverá ser semanal no primeiro mês e posteriormente mensal, incluindo

hemograma, com contagem de reticulócitos, e perfil bioquímico, com DHL. O estudo da evolução do clone pode ser feito anualmente, por citometria de fluxo.

8.1.2 Terapêutica anticoagulante

Na HPN podem associar-se eculizumab e anticoagulantes orais, como varfarina ou acenocumarol (Hall, 2006). Os anticoagulantes orais não devem ser administrados profilaticamente em todos os doentes, pelos riscos hemorrágicos, grau desconforto associado à necessária monitorização do INR (*International Normalized Ratio*) e porque uma fração significativa de doentes sem profilaxia nunca irá desenvolver fenómenos tromboembólicos. Assim, deve ser reservada para doentes com história de pelo menos um episódio de trombose.

A utilização de heparina de baixo peso molecular deve reservar-se apenas para gravidezes.

Faltam estudos alargados sobre terapêutica com inibidores da trombina, sugerindo casos presentes na literatura uma vantagem superior na sua utilização, pela ausência de controlos de INR e menores complicações hemorrágicas (Dragoni, 2015).

8.1.3 Suplementação de ácido fólico

A estimulação da hematopoiese após episódios paroxísticos de hemólise gera uma necessidade acrescida de ácido fólico, podendo ser suplementado em doses diárias de 5 mg (Parker, 2005).

8.1.4 Suplementação de ferro

As necessidades de ferro na HPN apresentam variabilidade interindividual, podendo ser necessária suplementação (Parker, 2005). Nos casos de deficiência de ferro, pode recorrer-se à administração de ferro, por via oral, na dose de 200 a 400 mg / dia. Para monitorização das reservas de ferro não devem ser usados os valores séricos da ferritina, pois esta encontra-se frequentemente elevada na HPN, sendo uma saturação da transferrina inferior a 20% um melhor indicador de necessidade de suplementação. A administração de ferro pode, contudo, condicionar um aumento da hemólise, devido ao aumento da produção de eritrócitos deficientes (Rosse & Gutterman, 1970).

8.1.5 Suporte transfusional

As necessidades transfusionais variam entre doentes (Parker, 2005). Alguns, mesmo sem terapêutica com eculizumab, nunca precisaram de realizar transfusões, enquanto outros transfundem regularmente. Há casos com períodos de anos entre transfusões e mesmo situações de necessidade pontual ao longo da vida. A transfusão deve considerar-se em doentes com uma queda súbita dos valores de hemoglobina associada a aumento de desconforto. Este desconforto não é diretamente proporcional ao grau de anemia, sendo variável entre casos. Pode, todavia, associar-se valores basais de hemoglobina inferiores a 8 mg/dl a doença dependente de transfusões. Valores de *cut-off* para a realização de transfusão podem ser especificados para cada doente. Geralmente a indivíduos mais velhos atribui-se um *cut-off* mais elevado, não por uma maior necessidade de hemoglobina nestes casos, mas pela menor capacidade eritropoiética medular e mais comorbilidades associadas.

8.1.6 Imunomoduladores

Os imunomoduladores são frequentemente necessárias nos casos de HPN hipoplásica, pela associação com doença da medula óssea, mais concretamente anemia aplásica, mediada por um processo autoimune. São também utilizados nas associações com SMD. São exemplos a ciclosporina, a globulina anti-timócito e o alemtuzumab.

8.1.7. Corticoterapia

Os corticosteróides são frequentemente administrados no tratamento da aplasia medular, visto pretender suprimir-se a atividade autoimune subjacente. Contudo, são também amiudadas vezes utilizados na HPN clássica, nem sempre justificadamente (Parker, 2005). Não há evidência de que inibam a hemólise intravascular mediada por complemento, ainda que teoricamente possam ajudar a suprimir o estado inflamatório associado e a informação sobre o seu papel na diminuição dos períodos de exacerbação é dúbia, devendo o período de administração ser curto. A corticoterapia crónica em casos de HPN não associados a aplasia/hipoplasia medular é desaconselhada, pelos efeitos secundários associados (Parker, 2005).

8.1.8 Quelantes de ferro

Na HPN pode ocorrer sobrecarga e deposição de ferro em diferentes órgãos, particularmente fígado e baço, traduzindo a atividade do sistema reticulo-endotelial, com papel predominante na hemólise extravascular (Risitano, 2012). A deposição no fígado condiciona um estado inflamatório, podendo ocorrer fibrose e evolução para cirrose e falência hepática. A hemólise extravascular aumenta na terapêutica com eculizumab, podendo aconselhar-se a avaliação dos depósitos de ferro por RMN antes do início da terapia. A sobrecarga de ferro pode também ocorrer pela realização de transfusões e abordar-se com quelantes do ferro, na tentativa de minimizar a lesão de órgão. No entanto, não há estudos que documentem a eficácia destes e o benefício em doentes com HPN.

8.2. Tratamento curativo

8.2.1 Transplante alogénico de medula óssea

O transplante alogénico de HSC permanece a única medida terapêutica curativa, com uma taxa de cura a longo prazo superior a 60% (Saso, 1999; Matos-Fernandez, 2009; Santarone, 2010; Brodsky, 2010). Não há, contudo, estudos de caso-controlo estabelecendo uma comparação com a eficácia da terapêutica com eculizumab e, pelo grande risco de morbimortalidade no pós-transplante, é necessário ponderar o risco/benefício. As vantagens do transplante alicerçam-se na eliminação do clone de HPN, reintrodução de uma população de HSC saudáveis e substituição do sistema imune do recipiente, sendo as duas últimas as mais relevantes no prognóstico da associação de HPN com anemia aplásica.

8.3. Terapêuticas adicionais

8.3.1 Transplante hepático

A síndrome de Budd-Chiari, relativamente frequente em doentes com HPN, pode traduzir-se em grande alteração estrutural e perda funcional hepática. Até recentemente não era realizado transplante hepático nos doentes de HPN independentemente do grau de falência do órgão, pelo risco de recorrência da síndrome. Porém, o transplante pode justificar-se nalguns casos, sobretudo em doentes tratados com eculizumab (Yedibela, 2008; Singer, 2009).

8.3.2 Embolização de artérias esplénicas

Na HPN, verifica-se frequentemente hiperesplenismo, podendo ocorrer por sequestro e fagocitose das células sanguíneas, ou trombose de veias abdominais. O aumento do tamanho do baço pode ser assintomático, mas outras vezes comporta desconforto e tem implicações clínicas de relevo. Deve evitar-se a esplenectomia, pelos grandes riscos de trombose e infeções pós-operatórias, mesmo após a instituição do eculizumab. A embolização seletiva de artérias esplénicas surge, em casos muito selecionados, como uma alternativa, sendo bem-sucedida na reversão do hiperesplenismo sem expor o doente às complicações cirúrgicas do procedimento clássico (Chang, 2007; Iori, 2012; Krishnan, 2013; Araten, 2014). Diminui ainda a hemólise extravascular, nomeadamente na terapêutica com eculizumab, contribuindo para o aumento da qualidade de vida.

8.3.3 Terapêutica trombolítica

Nalguns casos de eventos tromboembólicos (dependendo do risco associado ao evento e *timing* para início da terapêutica) pode adequar-se terapêutica trombolítica com ativador tecidual do plasminogénio (tPA, *tissue plasminogen activator*) (Araten, 2012). Na síndrome de Budd-Chiari esta abordagem é bem-sucedida em casos com uma evolução de sintomatologia até 3 semanas. A trombocitopenia é uma contra-indicação, mas há centros estabelecendo como limite a contagem de plaquetas inferior a 50×10^6 / dl. Porém, há um risco hemorrágico associado, podendo ser mortal, reservando-se administração de tPA para casos selecionados.

8.3.4 Shunt transjugular intrahepático porto-sistémico

O shunt transjugular intra-hepático porto-sistémico (TIPS, *Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*) foi efectuado nalguns casos de HPN com síndrome de Budd-Chiari para contornar a perda de permeabilidade das veias hepáticas, sendo maioritariamente bem-sucedido (Sharma, 2005; Vergniol, 2005). Todavia, este tratamento não resolve o problema de base, podendo estar associado a ativação adicional do sistema complemento.

8.4. Terapêuticas em investigação

Atualmente, são alvo de estudo vários inibidores do complemento, como inibidores do C5 e do C3b e da via alternativa. A coversina, pequena proteína inibidora do C5 prevenindo a clivagem de C5 em C5a e C5b por ação da C5 convertase do C5, está a ser testada em estudos de fase 2 em doentes resistentes ao eculizumab por polimorfismos de C5 (ensaio clínico NCT02591862).

O Cp40, péptido sintético análogo da compstatina inibindo a conversão de C3 em C3b, está sendo igualmente estudado (Risitano, 2014), como acontece com os inibidores da C1 esterase, já comercializados para outros fins (DeZern, 2014).

A TT30 é uma proteína de fusão do CR2 e fator H, inibindo a via alternativa de ativação do complemento de forma semelhante à do CD55. Ao inibir a formação de C3 convertase (e degradar a existente), pensa-se poder ter um papel na prevenção da formação do CAM e na opsonização de células de HPN, intervindo portanto sobre as hemólises intra e extravascular (Risitano, 2012). Este fármaco foi recentemente alvo de estudos de fase 1, aguardando os resultados publicação.

9. CONCLUSÕES

A HPN é uma doença rara, e não havendo ainda completo conhecimento de todos os mecanismos implicados, há já uma noção profunda da sua fisiopatologia. Esta informação, associada ao encadeamento de processos culminando em doença e aos desenvolvimentos tecnológicos em Saúde, permitem tornar a abordagem a esta condição num paradigma de sucesso dos novos âmbitos da Medicina.

A introdução da citometria de fluxo como metodologia diagnóstica recomendada, cerca da década de 90, tornou mais detalhada a caracterização da doença e identificação de subgrupos de doentes. Adicionalmente, a monitorização da doença e do sucesso da terapêutica é muito mais abrangente e sensível. Tal culmina na possibilidade do clínico adaptar o seguimento aos doentes consoante as especificidades dos casos.

Na última década, o aparecimento do eculizumab como estratégia terapêutica revolucionou o *status quo* na HPN. Houve um impacto significativo na morbilidade e, não tendo decorrido muitos anos desde a introdução no mercado, o mesmo parece verificar-se na mortalidade. No caso particular da gravidez, esta terapêutica parece extremamente promissora. Contudo, é uma medicação com muitos custos associados, devendo prescrever-se judiciosamente.

A terapêutica com eculizumab não tornou obsoletas estratégias terapêuticas de suporte, permitindo antes otimizá-las. A associação a terapêutica anticoagulante é importante, particularmente em história de fenómenos tromboembólicos. Adicionalmente, medidas terapêuticas anteriormente inviáveis podem agora ser exploradas, como o caso do transplante hepático. A associação de diferentes opções no arsenal terapêutico contribui aliás para um melhor prognóstico. Para além disso, nem todas as complicações são debeladas pelo eculizumab. Por exemplo, a hemólise extravascular, potenciada pela medicação, acaba por assumir maior relevo e a falência medular na HPN hipoplásica não é corrigida, beneficiando de tratamento apropriado. Todavia, o próprio estudo dos efeitos e limitações do eculizumab poderá ser preponderante no desenvolvimento de novas terapias para a HPN e mesmo para outras doenças.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A. M., Murakami, Y., Layton, D. M., *et al.* (2006). Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nature Medicine*, 12, 846–851.
- Araten, D. J., Iori, A. P., Brown, K., *et al.* (2014). Selective splenic artery embolization for the treatment of thrombocytopenia and hypersplenism in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Journal of Hematology and Oncology*, 7, 27.
- Araten, D. J., Notaro, R., Thaler, H. T., *et al.* (2012). Thrombolytic therapy is effective in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A series of nine patients and a review of the literature. *Haematologica*. *Haematologica*, 97, 344–52.
- Bessler, M., Mason, P.J., Hillmen, P., *et al.* (1994). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO Journal*, 13, 110–7.
- Brodsky, R. A. (2010). Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 95, 855–856.
- Brodsky, R. A. (2014). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 124, 2804–11.
- Brodsky, R. A., Mukhina, G. L., Li, S., *et al.* (2000). Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *American Journal of Clinical Pathology*, 114, 459–66.
- Brodsky, R. A., Young, N.S., Antonioli, E., *et al.* (2008). Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 111, 1840–7.
- Chang, C. Y., Singal, A. K., Ganeshan, S. V., *et al.* (2007). Use of splenic artery embolization to relieve tense ascites following liver transplantation in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Liver Transplantation*, 13, 1532–7.
- Costa, J. R., Caputo, V. S., Makarona, K., *et al.* (2014). Cell-type-specific transcriptional regulation of PIGM underpins the divergent hematologic phenotype in inherited GPI deficiency. *Blood*, 124, 3151–4.
- Dahmani, A., Roudot, H., Cymbalista, F., *et al.* (2016). Evaluation of Fluorescently Labeled Aerolysin as a New Kind of Reagent for Flow Cytometry Tests. *American Journal of Clinical Pathology*, 145, 407–17.
- Devalet, B., Mullier, F., Chatelain, B., *et al.* Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *European Journal of Haematology*, 95, 190–8.
- de Latour, R.P., Mary, J.Y, Salanoubat, C., *et al*; French Society of Hematology; French Association of Young Hematologists (2008). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*, 112, 3099-106.
- DeZern, A. E., Uknis, M., Yuan, X., *et al.* (2014). Complement blockade with a C1 esterase inhibitor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Experimental Hematology*, 42, 857–61.
- Dmytrijuk, A., Robie-Suh, K., Cohen, M. H., *et al.* (2008). FDA report: eculizumab (Soliris) for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The Oncologist*, 13, 993–1000.
- Dragoni, F., Chiarotti, F., Lombardi, L., *et al.* (2015). Anticoagulant therapy with rivaroxaban in a young patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clinical Case Reports*, 3, 790–2.
- Gargiulo, L., Papaioannou, M., Sica, M., *et al.* (2013). Glycosylphosphatidylinositol-specific,

- CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 121, 2753–61.
- Guinan, E.C. (2011). Diagnosis and management of aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 76-81.
- Hall, C., Richards, S., & Hillmen, P. (2003). Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*, 102, 3587–91.
- Hallstensen, R. F., Bergseth, G., Foss, S., *et al.* (2015). Eculizumab treatment during pregnancy does not affect the complement system activity of the newborn. *Immunobiology*, 220, 452–9.
- Helley, D., de Latour, R. P., Porcher, R., *et al.* (2010). Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica*, 95, 574–81.
- Hill, A., Kelly, R. J., & Hillmen, P. (2013). Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 121, 4985-96.
- Hill, A., Platts, P.J., Smith, A., *et al.* (2007). The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *Haematologica*, 92(suppl 2), abstract 0067.
- Hill, A., Rother, R. P., & Hillmen, P. (2005). Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 90(12 Suppl), 111–3.
- Hill, A., Rother, R. P., Wang, X., *et al.* (2010). Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology*, 149, 414–25.
- Hill, A., Sapsford, R. J., Scally, A., *et al.* (2012). Under-recognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. *British Journal of Haematology*, 158, 409–14.
- Hillmen P., Elebute M., Kelly, R., *et al.* (2010). Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *American Journal of Hematology*, 85, 553-9.
- Hillmen, P., Hall, C., Marsh, J. C. W., *et al.* (2004). Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England Journal of Medicine*, 350, 552–9.
- Hillmen, P., Lewis, S.M., Bessler, M., *et al.* (1995). Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New England Journal of Medicine*, 333, 1253–8.
- Hillmen, P., Muus, P., Dührsen, U., *et al.* (2007). Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 110(12), 4123–8.
- Hillmen, P., Muus, P., Roth, A., *et al.* (2013). Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology*, 162, 62–73.
- Hillmen, P., Young, N. S., Schubert, J., *et al.* (2006). The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England Journal of Medicine*, 355, 1233–43.
- Höchsmann, B., Leichtle, R., von Zabern, I., *et al.* (2012). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria treatment with eculizumab is associated with a positive direct antiglobulin

test. *Vox Sanguinis*, 102, 159–66.

Hugel, B., Socié, G., Vu, T., *et al.* (1999). Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood*, 93, 3451–6.

Hussain, S., Qureshi, A., & Kazi, J. (2013). Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nephron - Clinical Practice*, 123, 28–35.

Iori, P., Brown, K., Araten, D. J., *et al.* (2012). Selective splenic artery embolization for the treatment of thrombocytopenia and hypersplenism in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*, 120, 1–9.

Jankowska, A. M., Szpurka, H., Calabro, M., *et al.* (2011). Loss of expression of neutrophil proteinase-3: a factor contributing to thrombotic risk in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 2011, 96, 954–62.

Kelly, R. J., Hill, A., Arnold, L. M., *et al.* (2011). Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Sustained efficacy and improved survival. *Blood*, 117, 6786–92.

Kelly, R. J., Höchsmann, B., Szer, J., *et al.* (2015). Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *The New England Journal of Medicine*, 373, 1032–9.

Kelly, R., Arnold, L., Richards, S., Hill, A., *et al.* (2010). The management of pregnancy in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria on long term eculizumab. *British Journal of Haematology*, 149, 446–50.

Kozuma, Y., Sawahata, Y., Takei, Y., *et al.* (2011). Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology*, 152, 631–9.

Krawitz, P. M., Höchsmann, B., Murakami, Y., *et al.* (2013). A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood*, 122, 1312–5.

Krishnan, S. K., Hill, A., Hillmen, P., Arnold, L. M., *et al.* (2013). Improving cytopenia with splenic artery embolization in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria on eculizumab. *International Journal of Hematology*, 98, 716–8.

Kvarnung, M., Nilsson, D., Lindstrand, A., *et al.* (2013). A novel intellectual disability syndrome caused by GPI anchor deficiency due to homozygous mutations in PIGT. *Journal of Medical Genetics*, 50, 521–8.

Lam, C., Golas, G. A., Davids, M., *et al.* (2016). Expanding the clinical and molecular characteristics of PIGT-CDG, a disorder of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Molecular Genetics and Metabolism*, 115, 128–40.

Lazo-Langner, A., Kovacs, M. J., Hedley, B., *et al.* (2015). Screening of patients with idiopathic venous thromboembolism for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Thrombosis Research*, 135, 1107–9.

Lee, S. C. W., & Abdel-Wahab, O. (2014). The mutational landscape of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria revealed: New insights into clonal dominance. *Journal of Clinical Investigation*, 124, 4227–30.

Luzzatto, L. (2016). Recent advances in the pathogenesis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *F1000Research*, 5, 677–87.

- Luzzatto, L., Gianfaldoni, G., & Notaro, R. (2011). Management of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: A personal view. *British Journal of Haematology, British Journal of Haematology*, 153, 709–20.
- Matos-Fernandez, N. A., Abou Mourad, Y. R., Caceres, W., *et al.* (2009). Current status of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 15, 656–61.
- Meppiel, E., Crassard, I., Peffault de Latour, R., *et al.* (2015). Cerebral venous thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a series of 15 cases and review of the literature. *Medicine*, 94, e362.
- Miyata, T., Takeda, J., Iida, Y., *et al.* (1993). The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science*, 259, 1318–20.
- Miyata, T., Yamada, N., Iida, Y., *et al.* (1994). Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New England Journal of Medicine*, 330, 249–55.
- Muñoz-Linares, C., Ojeda, E., Forés, R., *et al.* (2014). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A single Spanish center's experience over the last 40 yr. *European Journal of Haematology*, 93, 309–19.
- Ninomiya, H., Hasegawa, Y., Nagasawa, T., *et al.* (1997). Excess soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in the plasma of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria inhibits cell-associated fibrinolytic activity. *International Journal of Hematology*, 65, 285–91.
- Ninomiya, H., Kawashima, Y., Hasegawa, Y., *et al.* (1999). Complement-induced procoagulant alteration of red blood cell membranes with microvesicle formation in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH): Implication for thrombogenesis in PNH. *British Journal of Haematology*, 106, 224–31.
- Nishimura, J., Yamamoto, M., Hayashi, S., *et al.* (2014). Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *The New England Journal of Medicine*, 370, 632–9.
- Noris, M., & Remuzzi, G. (2013). Overview of complement activation and regulation. *Seminars in Nephrology*, 33, 479–92.
- Packman, C. H., Rosenfeld, S. I., Jenkins, D. E., *et al.* (1979). Complement lysis of human erythrocytes. Differing susceptibility of two types of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to C5b-9. *Journal of Clinical Investigation*, 64, 428–33.
- Pakdeesuwan, K., Wanachiwanawin, W., Siripanyaphinyo, U., *et al.* (2000). Immunophenotypic discrepancies between granulocytic and erythroid lineages in peripheral blood of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *European Journal of Haematology*, 65, 8–16.
- Parker, C., Omine, M., Richards, S. *et al.*; International PNH Interest Group (2005). Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 106, 3699–709.
- Ploug, M., Plesner, T., Rønne, E., *et al.* (1992). The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 79, 1447–55.
- Preis, M., & Lowrey, C. H. (2014). Laboratory tests for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *American Journal of Hematology*, 89, 339–41.
- Pu, J., Mukhina, G., Wang, H., *et al.* (2011). Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *European Journal of Haematology*, 87, 37–45.

Queirós, M. L., & Lima, M. (2011). Hemoglobinúria Paroxística Nocturna: várias faces da mesma doença, do diagnóstico ao tratamento. Fórum Hematológico do Norte, Ed. (1a edição). Pedços de Cor - Artes Gráficas, Lda.

Raza, A., Ravandi, F., Rastogi, A., *et al.* (2014). A prospective multicenter study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 86, 175–82.

Reiss, U. M., Schwartz, J., Sakamoto, K. M., *et al.* (2014). Efficacy and safety of eculizumab in children and adolescents with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Pediatric Blood & Cancer*, 61, 1544–50.

Richards, S. J., Hill, A., & Hillmen, P. (2007). Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 72, 291–8.

Risitano, A. M. (2013). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the complement system: Recent insights and novel anticomplement strategies. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 734, 155–72.

Risitano, A. M., Notaro, R., Pascariello, C., *et al.* (2012). The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood*, 119, 6307–17.

Risitano, A. M., Ricklin, D., Huang, Y., *et al.* (2014). Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 123, 2094–101.

Risitano, A.M., Imbriaco, M., Marando, L., *et al.* (2012). From perpetual haemosiderinuria to possible iron overload: Iron redistribution in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patients on eculizumab by magnetic resonance imaging. *British Journal of Haematology*, 158, 415-8.

Risitano, M., Perna, F., & Selleri, C. (2011). Achievements and limitations of complement inhibition by eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the role of complement component 3. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 528–35.

Rosse, W. F., & Gutterman, L. A. (1970). The Effect of Iron Therapy in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood*, 36, 559–65.

Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., *et al.* (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*, 293, 1653–62.

Roumenina, L. T. (2015). C3dg-CR3 interaction in erythrophagocytosis. *Blood*, 126, 828–9.

Sahin, F., Ozkan, M. C., Mete, N. G., *et al.* (2015). Multidisciplinary clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *American Journal of Blood Research*, 5, 1–9.

Sahin, F., Yilmaz, A. F., Ozkan, M. C., *et al.* (2015). PNH is a debilitating, fatal but treatable disease: same disease, different clinical presentations. *American Journal of Blood Research*, 5, 30–3.

Santarone, S., Bacigalupo, A., Risitano, A. M., *et al.* (2010). Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Long-term results of a retrospective study on behalf of the gruppo italiano trapianto midollo osseo (GITMO). *Haematologica*, 95, 983–8.

Saso, R., Marsh, J., Cevreska, L., *et al.* (1999). Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology*, 104, 392–6.

- Schrezenmeier, H., Muus, P., Socié, G., *et al.* (2014). Baseline characteristics and disease burden in patients in the international paroxysmal nocturnal hemoglobinuria registry. *Haematologica*, 99, 922–9.
- Sharma, A., Itha, S., Baijal, S. S., *et al.* (2005). Superior sagittal sinus thrombosis and Budd-Chiari syndrome due to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria managed with transjugular intrahepatic portosystemic shunt: a case report. *Tropical Gastroenterology*, 26, 146–8.
- Shen, W., Clemente, M. J., Hosono, N., *et al.* (2014). Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Journal of Clinical Investigation*, 124, 4529–38.
- Shichishima, T., & Noji, H. (2002). A new aspect of the molecular pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology*. 2002, 7:211-27.
- Simak, J., Holada, K., Risitano, A. M., *et al.* (2004). Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology*, 125, 804–13.
- Simões, M. J., Fernandes, T., Gonçalves, P., Bettencourt, C., & Furtado, C. (2014). Doença meningocócica do serogrupo B (MenB) em Portugal : uma reflexão sobre estratégias de imunização, *Boletim Epidemiológico Observações*, 10, 28–32.
- Singer, A. L., Locke, J. E., Stewart, Z. A., *et al.* (2009). Successful liver transplantation for Budd-Chiari syndrome in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with the anti-complement antibody eculizumab. *Liver Transplantation*, 15, 540–3.
- Sloand, E. M., Pfannes, L., Scheinberg, P., *et al.* (2008). Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Experimental Hematology*, 36, 1616–24.
- Socie, G., Mary, J.Y., de GA, *et al.* (1996). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet*, 348, 573–7.
- Sutherland, D. R., Kuek, N., Davidson, J., *et al.* (2007). Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 72, 167–77.
- Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., *et al.* (1993). Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*, 73, 703–11.
- Timeus, F., Crescenzo, N., Longoni, D., *et al.* (2014). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in children with acquired aplastic anemia: A multicentre study. *PLoS ONE*, 9, e101948.
- Valla, D., Dhumeaux, D., Babany, G., *et al.* (1987). Hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A spectrum from asymptomatic occlusion of hepatic venules to fatal Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology*, 93, 569–75.
- van Bijnen, S. T. A., van Heerde, W. L., & Muus, P. (2012). Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10, 1–10.
- Van Den Heuvel-Eibrink, M. M., Bredius, R. G. M., Te Winkel, M. L., *et al.* (2005). Childhood paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH), a report of 11 cases in the Netherlands. *British Journal of Haematology*, 128, 571–77.
- Varela, J. C., & Tomlinson, S. (2015). Complement. An Overview for the Clinician. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 29, 409–27.
- Vergniol, J., Laharie, D., Drouillard, J., *et al.* (2005). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and

Budd-Chiari syndrome: therapeutic challenge with bone marrow transplantation, transjugular intrahepatic portosystemic shunt, and vena cava stent. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 17, 453–6.

Weitz, I. C. (2011). Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 37, 315–21.

Weitz, I. C., Razavi, P., Rochanda, L., *et al.* (2016). Eculizumab therapy results in rapid and sustained decreases in markers of thrombin generation and inflammation in patients with PNH independent of its effects on hemolysis and microparticle formation. *Thrombosis Research*, 130, 361–8.

Weitz, I., Meyers, G., Lamy, T., *et al.* (2013). Cross-sectional validation study of patient-reported outcomes in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Internal Medicine Journal*, 43, 298–307.

Wijewickrama, E., Gooneratne, L., De Silva, C., *et al.* (2013). Acute tubular necrosis in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 24, 105–8.

Yedibela, S., & Hohenberger, W. (2008). Liver transplant for Budd-Chiari syndrome caused by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Experimental and Clinical Transplantation*, 6, 180–3.