

Prueba para el monitoreo del tratamiento con eculizumab en pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna

Test to monitor treatment with eculizumab in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Ceballo F^{1,2,3} , Arcavi M^{1,2,3} , Borda N^{1,2,3} , Lazarowski A^{1,2,3} 

¹ *Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina.*

² *Laboratorio de Hematología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, Argentina.*

³ *Instituto de Investigaciones en Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Buenos Aires, Argentina.*

fernanda@ancla.com.ar

Fecha de recepción: 9/8/2023
Fecha de aprobación: 23/8/2023



LABORATORIO

HEMATOLOGÍA
Volumen 27 n° 2: 72-75
Mayo - Agosto 2023

Palabras claves: hemoglobinuria paroxística nocturna, prueba hemolítica, eculizumab, bloqueo de complemento.

Keywords: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, hemolytic test, eculizumab, complement blockade.

Introducción y fundamento

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal, adquirida y poco frecuente, causada por una mutación somática en el gen PIG-A que se encuentra en el cromosoma X y codifica para una proteína involucrada en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esta estructura sirve como anclaje de muchas proteínas de la membrana celular, entre ellas, aquéllas que inhiben la lisis celular por acción del complemento. Las de mayor relevancia clínica son: factor acelerador de la degradación (DAF, CD55), que inhibe la C3 convertasa, y el inhibidor

de la lisis reactiva de la membrana (MIRL, CD59), que bloquea la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). La ausencia de estas proteínas desarrolla una anemia hemolítica crónica intravascular. El diagnóstico de esta enfermedad se puede realizar con diferentes metodologías, las más utilizadas son la citometría de flujo (gold standard) y el test de HAM. El fundamento de esta última prueba se basa en la susceptibilidad de los eritrocitos HPN a la lisis frente a suero humano acidificado, tanto normal (tubo 2) como del paciente (tubo 6). Esta prueba se considera positiva y es diagnóstica cuando hay lisis

en ambos tubos. El gran avance en el tratamiento de esta enfermedad se debe al eculizumab, anticuerpo monoclonal dirigido contra la fracción C5 del complemento, que impide la formación del MAC (complejo de ataque a membrana).

Para monitorizar la respuesta al tratamiento con eculizumab se diseñó un test hemolítico al que denominamos test MET (Test para el Monitoreo de Eculizumab).

Características preanalíticas y analíticas

MET se realizan en muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA y suero fresco de los pacientes en tratamiento con eculizumab. Se procesa a la par un paciente voluntario sano en las mismas condiciones. Los sueros deben ser separados del paquete globular inmediatamente después de recogida de sangre.

Se debe utilizar el suero fresco normal ABO compatible con la sangre del paciente.

Los glóbulos rojos se lavan tres veces con NaCl 9,0 g/L y luego se diluyen al 50% en solución salina.

Se utilizan diferentes controles:

(a) muestras de suero no acidificado de controles sanos y de pacientes con glóbulos rojos HPN (RBCPNH) (para descartar causas inespecíficas de lisis).

(b) muestras de suero con complemento inactivado (30 minutos a 56°C) de controles sanos y de pacientes contra RBCPNH (para confirmar que la causa de la lisis fue por la acción del complemento).

(c) suero normal no acidificado y suero acidificado frente a glóbulos rojos normales (como control normal).

Se preparan una batería de ocho tubos (llamados 1, 2, 2', 3, 4, 5, 6 y 6') (Tabla 1):

Los tubos 1, 2 y 2' contienen 500 µL de suero normal con 50 µL de RBCPNH al 50%; los tubos 3 y 4 500 µL de suero normal con 50 µL de glóbulos rojos normales al 50%; y los tubos 5, 6 y 6' 500 µL de suero de los pacientes con 50 µL de RBCPNH al 50%.

A los tubos 2, 2', 4, 6 y 6' se les añaden 50 µL de HCl 0,2 N (previa a la adición de sus respectivos glóbulos rojos). Los tubos se incuban a 37°C por 1 hora, luego se centrifugan por 5 minutos a 2500 rpm, para luego poder observar la presencia o ausencia de lisis en el sobrenadante.

El desempeño de la droga se monitorea durante la fase de mantenimiento, a partir de la semana 5 de tratamiento, tras la administración de 900 mg de eculizumab los días 2, 8, 12 y 14 y luego cada 14 días para un total de 6 meses. Las muestras para la prueba MET deben ser obtenidas antes de la infusión intravenosa siguiente.

Valores de referencia

En pacientes que reciben eculizumab podemos encontrar los siguientes resultados:

(a) positivo: RBCPNH lisis con suero normal acidificado y con suero acidificado del paciente. Esto indicaría que eculizumab no está bloqueando la vía alternativa del complemento, y es un paciente que no responde (Figura 1).

(b) perfil de bloqueo: RBCPNH lisis con suero acidificado normal y ausencia de lisis con suero acidificado del paciente tratado. Esto indicaría que eculizumab estaría bloqueando la vía alternativa del complemento, y es un paciente respondedor (Figura 2).

(c) negativo: ausencia de lisis RBCPNH con ambos sueros (Figura 3).

Tabla 1. Protocolo. Test para el monitoreo de eculizumab.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero normal (µl)	500	500	500	500	-----	-----
Suero paciente (µl)	-----	-----	----	----	500	500
CIH 0.2N (µl)	-----	50	----	50	-----	50
GR 50% paciente	50	50	----	----	50	50
GR 50% normal	-----	-----	50	50	-----	-----
Cl2Mg 250 mM (µl)	10	10	10	10	10	10

*Tubos 2' y 6': contienen suero inactivado a 56°C.

Utilidad clínica

La técnica de elección para el diagnóstico de HPN es la citometría de flujo. Por su alta sensibilidad permite detectar y cuantificar clones pequeños <1% (pacientes con síndrome de insuficiencia medular). Esta metodología no sirve para reflejar lo que sucede con el eculizumab, por lo que no permite diferenciar pacientes respondedores de refractarios.

La prueba MET demostró ser una técnica funcional útil para monitorear la acción de dicho tratamiento, ya que permite evaluar el bloqueo de la vía alternativa del sistema del complemento en pacientes con HPN.

Es una metodología sencilla, accesible y económica que se puede utilizar para:

- (a) controlar la eficacia del tratamiento con eculizumab.
- (b) monitorear la respuesta al aumento de la dosis de eculizumab.
- (c) detectar pacientes que son refractarios al tratamiento.

El monitoreo con MET permite así ajustar las dosis y/o los intervalos de administración de la droga para una mejor respuesta terapéutica.

Figura 1. Test de HAM positivo: resultado observado en pacientes con HPN, previo al tratamiento con eculizumab.

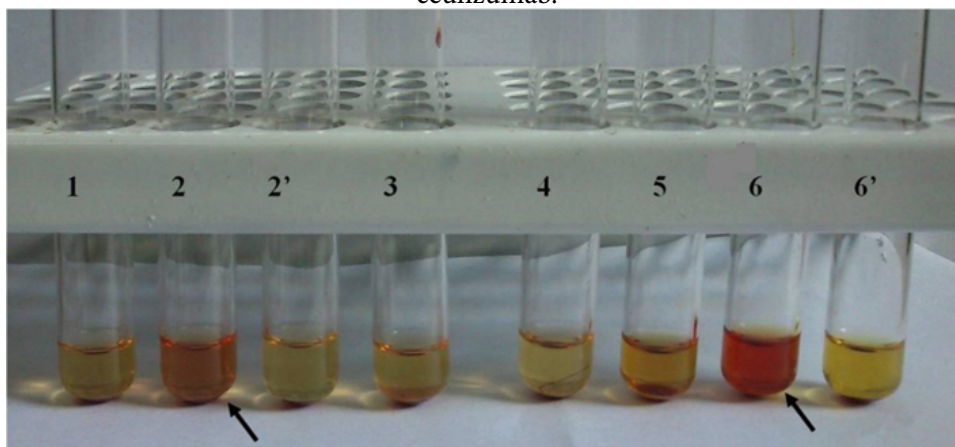


Figura 2. Test de HAM perfil bloqueo. Resultado observado en pacientes post tratamiento con eculizumab.

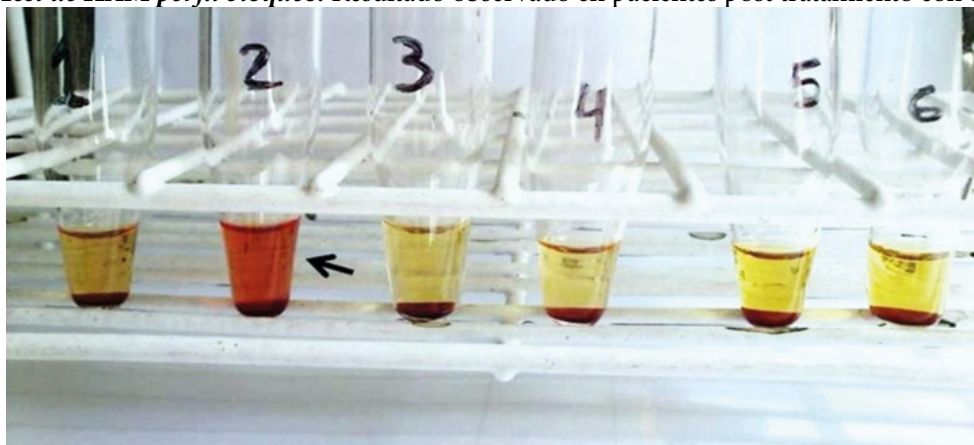
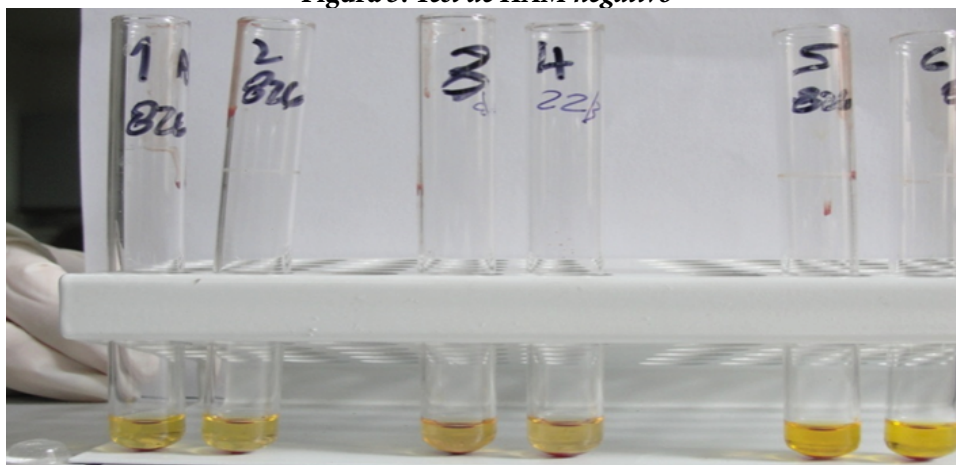


Figura 3. Test de HAM negativo



Conflictos de intereses: Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

References

1. Parker C, Omine M, Richards S et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106:3699-3709.
2. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014;124(18):2804-2811.
3. Loschi M, Porcher R, Barraco F et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no treatment study. *Am J Hematol*. 2016;91(4):366-370.
4. Arcavi M, Ceballo F, Caracciolo M, Lazarowski A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Test to monitor the action of eculizumab treatment. *Lab Hematol*. 2020;00:1-6.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.