

Hemoglobinuria paroxística nocturna. El rol de la anhidrasa carbónica-i urinaria en la hemólisis intravascular

Dres María Laura Facio,¹ Marcelo De Rosa,³ Claudia Garlati,²
Teresa Meller,² Laura Colin,⁴ Mariel Alejandre,¹ Pablo Bresciani,¹ Andres Brodsky⁴

1 Bioquímicos. Departamento de Bioquímica Clínica. Área Proteínas.

2 Bioquímicos. Departamento de Bioquímica Clínica. Área Química Nefrológica.

3 Médico Nefrólogo. Servicio de Nefrología.

4 Médico Hematólogo. Servicio de Hematología.
Hospital de Clínicas José de San Martín.

Resumen

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) se caracteriza por hemólisis intravascular crónica mediada por complemento. Cuando se produce la hemólisis se libera a circulación Anhidrasa Carbónica- I (AC-I), una enzima que se halla en alta concentración en el eritrocito y por su bajo peso molecular filtra por el glomérulo. El objetivo del presente trabajo fue detectar la excreción de la AC-I en orina de pacientes con HPN por Electroforesis Bidimensional de Utilidad Clínica (2D UC), y compararla con otras causas de hemólisis, de origen renal y post-renal. Se evaluaron 8 pacientes con HPN sin tratamiento con eculizumab un inhibidor del C5 del complemento, y 5 de ellos postratamiento, 12 orinas de pacientes con nefritis lúpica y 10 orinas de pacientes con hemólisis post-renal. La AC-I puede estar presente en la orina, en los tres grupos, sin embargo la relación AC-I/Hemoglobina en la hemólisis intravascular está invertida en comparación con la hemólisis glomerular y post-renal. Los pacientes con HPN tratados con eculizumab no presentan AC-I, y sería de utilidad en el seguimiento de los pacientes tratados con el inhibidor del C5, para evidenciar posibles escapes hemolíticos.

Palabras claves. Anhidrasa Carbónica, Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, Hemólisis intravascular.

Peroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: the role of urinary carbonic anhydrase-I in intravascular haemolysis

Summary

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) is characterized by chronic complement mediated haemolysis. In these conditions it might be expected that carbonic anhydrase-I (AC-I) would be liberated into the plasma and excreted in the urine, by its high concentration in the erythrocyte and low molecular weight. The objective of the present study was to detect the urinary excretion of AC-I from patients with PNH by two-dimensional clinical utility electrophoresis (2D UC) and to compare it with other causes of renal and post-renal haemolysis. We evaluated 8 patients with PNH without eculizumab, a complement C5 inhibitor, 5 of them post-treatment, 12 urine of patients with lupus nephritis and 10 urine of patients with post-renal hemolysis. AC-I may be present in the urine, in all three groups, however, the AC-I/Haemoglobin ratio in intravascular haemolysis is reversed compared to glomerular and post-renal haemolysis. Patients with PNH treated with eculizumab do not have AC-I and would be useful in monitoring patients treated with the C5 inhibitor to evidence possible haemolytic leaks.

Key words. Carbonic Anhydrase, Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Intravascular Haemolysis.

Correspondencia. Dra María Laura Facio
Correo electrónico: mlfacio@hotmail.com

Introducción

En la hemólisis intra o extravascular, la hemoglobina (Hb) se une a la haptoglobina formando un complejo irreversible, que es capturado por el hígado y el bazo para prevenir la pérdida de hierro a nivel renal, y la acción prooxidante de la Hb.¹⁻³ Cuando la capacidad de unión de la haptoglobina se satura, la Hb libre se disocia en dímero de Hb que atraviesa la barrera de filtración glomerular y la Hb es incorporada a través de los receptores megalina y cubilina en un proceso saturable en el túbulo proximal.⁴

La anhidrasa carbónica I (AC-I) es una metaloenzima que cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono a bicarbonato, y se encuentra dentro del eritrocito en alta concentración, y su relación con la Hb A1 es de aproximadamente 1 a 100, (12mg AC I/g de hemoglobina).⁵ Su peso molecular es de 30 KDa,⁶ por lo tanto la AC-I libre atraviesa la barrera de filtración glomerular y, si su concentración se encuentra elevada en circulación, se observará en la orina una proteinuria por sobrecarga, como el caso de otras proteínas de bajo peso molecular como la mioglobina, Hb, lisozima, cadenas livianas monoclonales de inmunoglobulinas, cuyo sitio catabólico es el riñón. La detección de AC-I en orina ha sido reconocida como marcadora de hemólisis intravascular, a través de un método de evaluación que media la actividad enzimática.⁷ La hemólisis intravascular ocurre en los pacientes con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), la cual se ha logrado inhibir con el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab, que bloquea la formación del complejo de ataque de membrana del complemento.⁸

Este trabajo plantea la detección de la AC-I en orina de pacientes con HPN por el método de Electroforesis Bidimensional de Utilidad Clínica (2D UC), a los efectos de comparar su hallazgo con otros indicadores y con otras causas de hemólisis, de origen glomerular y post-renal.

Materiales y métodos

Muestras

Se estudiaron 8 orinas de pacientes con HPN como causa prerenal de hemoglobinuria, 12 pacientes que presentaban Lupus Eritematoso Sistémico (LES), como causa renal, y como causa post-renal: 6 orinas de pacientes provenientes del servicio de urología y 4 pacientes con infección urinaria.

Criterios de inclusión

La toma de muestra de las orinas con:

- HPN se realizó a los pacientes que estaban sin tratamiento con eculizumab.
- LES se realizó a los pacientes que presentaban microhematuria dismórfica y solicitud de punción biopsia renal (PBR).
- Hematuria Post-renal proveniente de la sala de

urología con sonda vesical y del laboratorio central con sedimento urinario compatible con infección urinaria.

Procedimiento analítico

Se procesó la primera orina de la mañana de los pacientes con HPN, LES y de 4 pacientes con infección urinaria, y se tomó una muestra, a media mañana, de sonda vesical de los pacientes internados en urología. Se evaluaron los perfiles proteicos por 2D UC.

Los datos de los pacientes y resultados de determinaciones del laboratorio clínico y de las biopsias renales se registraron de las historias clínicas de los mismos.

Electroforesis Bidimensional para Uso Clínico (2D UC)

Primera dimensión: Acetato de celulosa gelatinizado (Cellogel-Biosystem), buffer veronal pH 8.6; Fi 0,05 (Helena).

Segunda dimensión: Mini protean 3 System Bio-Rad, gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12,5 % de concentración final. Buffer de corrida continua Tris glicina con SDS y coloración argéntica.^{9, 10}

Método de identificación de proteínas

Espectrometría de masa (EM): Se procesó 1 spot coloreado con tinción argéntica y un blanco del mismo gel. Se digirió *in gel* utilizando tripsina como enzima proteolítica. El extractivo de cada una de las muestras fue sometido a análisis en el Espectrómetro de Masas tipo MALDI-TOF-TOF, modelo 4800 plus de ABSciex, origen Concord, Canadá. Los datos se obtuvieron primeramente en Modo Reflectron y posteriormente se realizó la fragmentación de las señales más importantes. Se utilizó el programa Mascot PMF para la identificación de las proteínas a través de las masas moleculares de los péptidos (M+H⁺). Para el análisis de los espectros EM/EM se utilizó el programa *MS/MS Ion Search* de Mascot y el programa Paragon de Protein Pilot.

Resultados

Identificación de la Anhidrasa Carbónica-I en orina

A partir del hallazgo de una proteína desconocida en la 2D UC realizada en la orina de un paciente con HPN (Figura 1), se identificó por EM la Anhidrasa Carbónica (Tabla 1), con posibilidad de ser de tipo I o II, ambas se encuentran dentro del glóbulo rojo, por lo tanto se procedió a realizar la lisis *in vitro* de los eritrocitos de un paciente normal y posterior electroforesis 2D UC para comparar las movilidades electroforéticas, la cual correspondió a ser la anhidrasa carbónica de tipo I (Figura 2).

Se realizó por duplicado una curva del lisado de los eritrocitos *in vitro* a partir de una solución

Figura 1. Electroforesis 2D UC de la orina de un paciente con HPN. Abreviaturas: P: muestra del paciente, Oct: Orina control tubular; ambas en una dimensión. Alb: Albúmina, AC: Anhidrasa Carbónica.

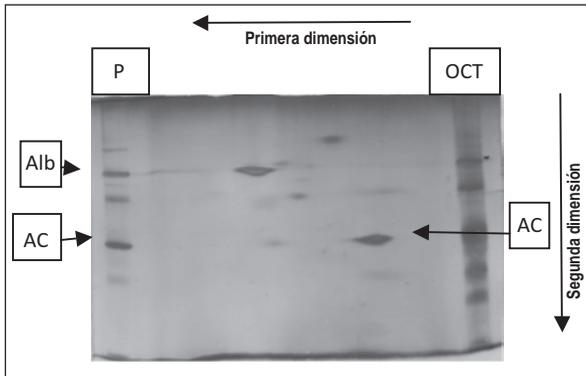


Tabla 1. Péptidos Identificados por EM de la Anhidrasa Carbónica de mayor confiabilidad.

Secuencia	Ubicación	m/z
GGPFSDSYR	82-90	985,43
ESISVSSEQLAQFR	215-228	1580,79

de 15 g/L de Hb, para establecer la relación normal en la hemólisis, entre la Hb A1 y la AC-I, en el gel de poliacrilamida con la coloración argéntica (Figura 3). Según bibliografía la relación es 12 mg AC/g Hb.⁵ A partir de la dilución 2, la muestra no presenta color rosado (la dilución se efectuó en una muestra de orina normal) y la dilución 7 correspondió a la tira reactiva Roche Combur 2+ (25 eritrocitos/ul) que aproxima-

Figura 2. Electroforesis 2D UC de la lisis de los eritrocitos de un paciente normal. Abreviaturas: A1: Hemoglobina A1, A2: Hemoglobina A2, Hb: Hemoglobina, AC-I: Anhidrasa Carbónica I, AC-II: Anhidrasa Carbónica II. Oct: Orina control tubular.

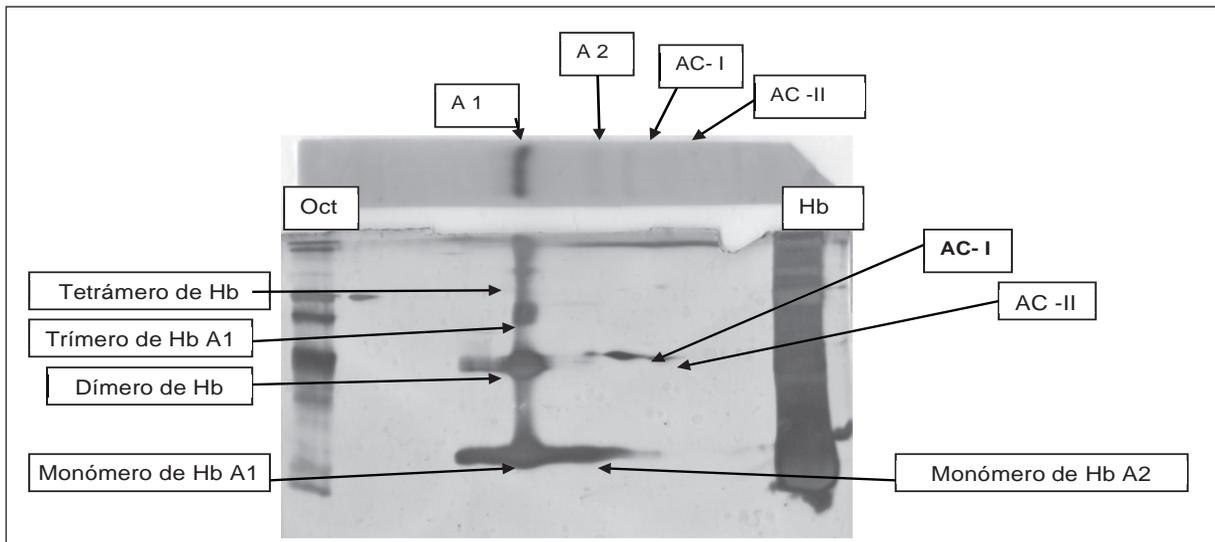
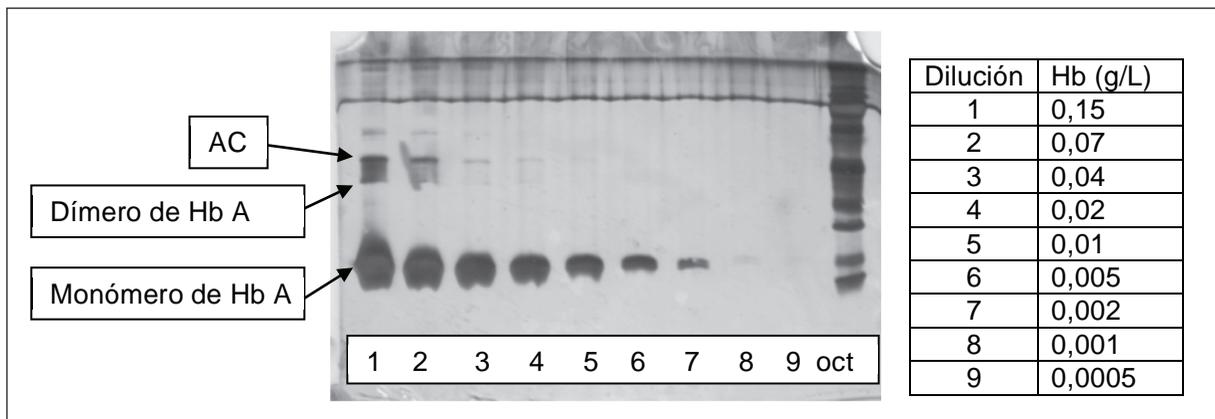


Figura 3. Diluciones al medio del lisado de eritrocitos, (a partir de una concentración de hemoglobina de 0,15 g/L) en gel de poliacrilamida al 12,5% (SDS-PAGE). Abreviaturas: AC: Anhidrasa Carbónica, Hb: Hemoglobina, oct: orina control tubular.



damente correspondería a 4 mg/L de hemoglobina, dicha concentración se encuentra entre las diluciones 6 y 7 del SDS-PAGE y no se observa la AC.

Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN)

Se realizó la electroforesis 2D UC de 8 pacientes con HPN sin tratamiento y en 5 de ellos pre y postratamiento con eculizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína C5 del complemento, que inhibe la formación del complejo de membrana, reduciendo la hemólisis intravascular.⁸ En las Tablas 2 (a-e) se presentan los datos de los pacientes y en las Figuras 4 (a-e) las respectivas electroforesis 2D UC.

En la Tabla 2a y en la Figura 4a se observan los pacientes MAE y GAR. La AC del paciente MAE fue la identificada por EM y a partir de allí se recono-

ció en el resto de las orinas de los pacientes. En el paciente GAR se observa la desaparición de la AC-I postratamiento.

El paciente RAM, de sexo masculino, no presenta criterios para ser tratado con eculizumab. Posee una comunicación interauricular (CIA), que en el año 2012 se intensifica, acompañada de síntomas asociados como orina oscura, palpitaciones y disnea. En la Tabla 2b se observa el aumento del perfil proteico, incluyendo la AC-I, que disminuyen en el año 2013, donde en agosto se cierra la CIA por parche con Amplatzer.

El paciente MON de sexo femenino, fue incluido en el estudio aunque estaba medicado, porque no respondía al tratamiento con eculizumab, por una variante génica del C5,¹¹ y se observa una marcada hemoglobina con AC-I.

El Paciente MEL, en febrero del 2013 presentó malestar abdominal, infección en una muela con supuración e infección urinaria, y recibió tratamiento con antibiótico. El aumento de la hemólisis se interpretó como escape hemolítico por infección y se observa en orina el aumento de la AC-I (Figura 4d, posición 3).

El paciente BOT presenta dolor abdominal, lumbar y de flanco derecho con una franca hematuria al interrumpir el tratamiento con el eculizumab, por falta de provisión. En la orina se observa un marcado aumento de la hemoglobina y de la AC-I.

La orina del paciente BEH, una semana después de comenzar el tratamiento con eculizumab, muestra una disminución de todas las proteínas, no solo de hemoglobina y de la AC-I, sino también de la albumina y de la alfa 1 microglobulina (Tabla 2e y Figura 4e).

Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

Se realizó biopsia renal a 12 pacientes con LES y manifestaciones renales de hematuria y/o proteinuria, todos presentaron en la microscopia óptica del sedimento urinario, microhematuria dismórfica, y en la Tabla 3 se observan los datos de los mismos y los resultados de la punción.

Tabla 2a. Datos del paciente MAE y GAR.

Paciente	MAE	GAR	GAR
Fecha	03/05/2011	21/09/2009	24/11/2011
Edad (años)	40	24	26
Eculizumab	NO	NO	SI
Bili ind (0,2-0,9 mg/dl)	1,3	1,7	2,1
LDH (100-200 UI/L)	2.161	3.247	603
Hb libre (2-7 mg/dl)	--	3,5	4,2
Haptoglobina (30-140 mg/dl)	menor de 8	menor de 8	menor de 8
Cr sérica (0,5-1,2 mg/dl)	0,65	0,61	0,61
2D			
AC-1	SÍ	SÍ	NO
Hb	NO	NO	NO

Figura 4a. Electroforesis 2D UC de los pacientes MAE y GAR. Correspondientes a las fechas de la Tabla 2a.

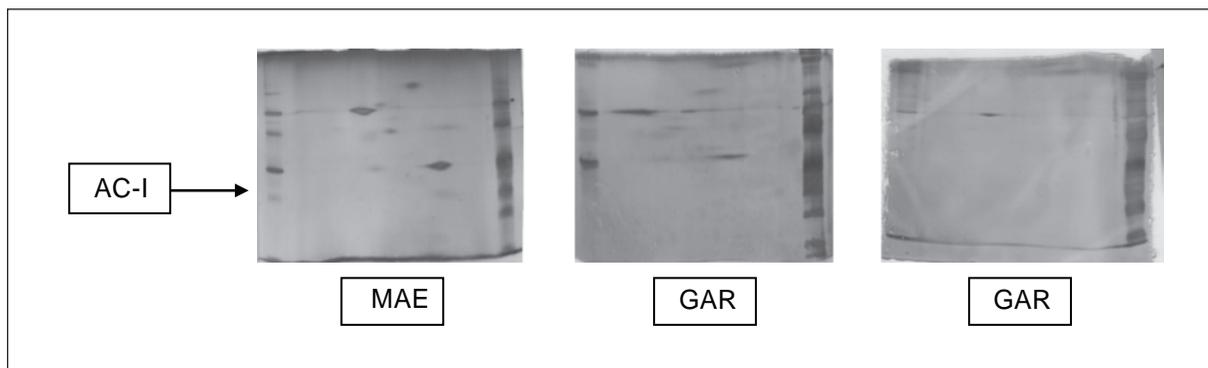


Tabla 2b. Datos del paciente RAM.

Paciente	RAM (1)	RAM (2)	RAM (3)	RAM (4)
Fecha	03/10/2011	02/09/2012	02/10/2013	16/05/2014
Edad (años)	53	54	55	56
Eculizumab	NO	NO	NO	NO
Bili ind (0,2-0,9 mg/dl)	0,6	1,1	1,0	0,7
LDH (100-200 UI/L)	2.561	2.360	2.455	1.786
Hb libre (2-7 mg/dl)	16	18,5	14	10,5
Haptoglobina (30-140 mg/dl)	Menor a 8	Menor a 8	Menor a 8	Menor a 8
Cr sérica (0,5-1,2 mg/dl)	0,81	0,84	0,85	0,92
2D				
AC-1	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
Hb	NO	NO	NO	NO

Figura 4b. Electroforesis 2D UC del paciente RAM. Correspondientes a las fechas de la Tabla 2b.

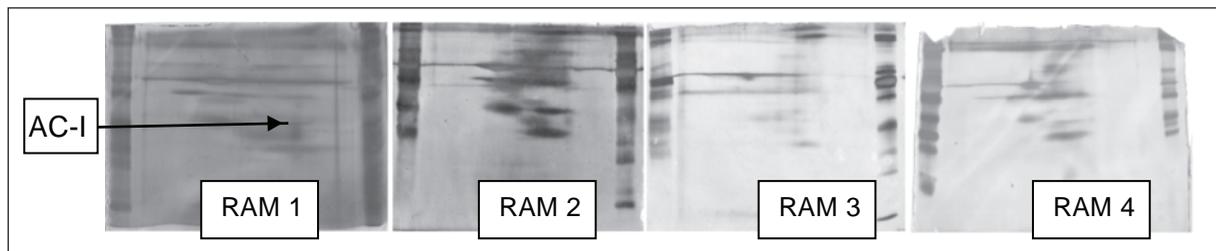


Tabla 2c. Datos del paciente QUI y MON.

Paciente	QUI	MON
Fecha	05/01/2012	02/03/2012
Edad (años)	53	36
Eculizumab	NO	SÍ
Bili ind (0,2-0,9 mg/dl)	0,7	1,1
LDH (100-200 UI/L)	1.399	4.750
Hb libre (2-7 mg/dl)	15,4	45
Haptoglobina (30-140 mg/dl)	menor de 8	menor de 8
Cr sérica (0,5-1,2 mg/dl)	0,71	0,58
2D		
AC-1	SÍ	SÍ
Hb	NO	SÍ

Figura 4c. Electroforesis 2D UC de los pacientes QUI y MON. Correspondientes a las fechas de la Tabla 2c.

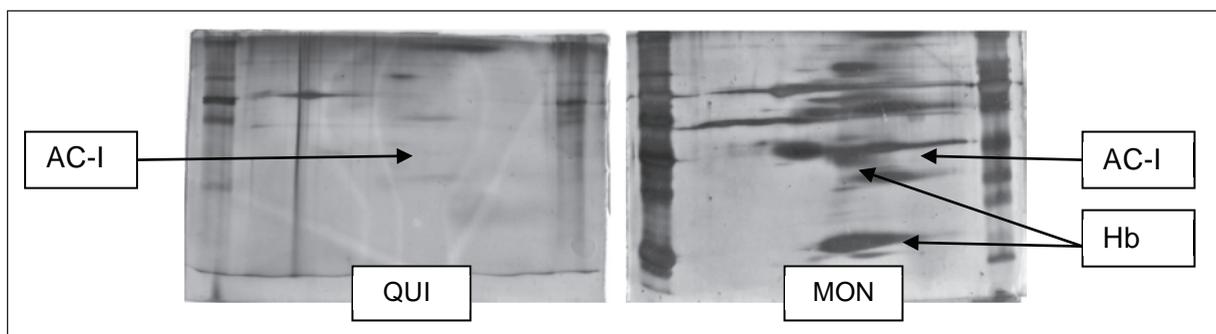


Tabla 2d. Datos del paciente MEL.

Paciente	MEL (1)	MEL (2)	MEL (3)	MEL (4)
Fecha	13/09/2012	16/11/2012	22/02/2013	05/04/2013
Edad (años)	22	22	23	24
Eculizumab	NO	SÍ	SÍ	SÍ
Bili ind (0,2-0,9 mg/dl)	1,7	1,3	2,2	1,1
LDH (100-200 UI/L)	4.899	3.099	451	380
Hb libre (2-7 mg/dl)	46	2,6	14	3,2
Haptoglobina (30-140 mg/dl)	menor de 8	menor de 8	menor de 8	menor de 8
Cr sérica (0,5-1,2 mg/dl)	0,52	0,49	0,46	0,50
2D				
AC-1	SÍ	NO	SÍ	SÍ
Hb	NO	NO	NO	NO

Figura 4d. Electroforesis 2D UC del paciente MEL el día 1, sin tratamiento. Electroforesis en una dimensión en SDS-PAGE de las orinas correspondientes a los días 1, 2, 3 y 4 de la Tabla 2d. Orinas 2, 3 y 4 con tratamiento con eculizumab.

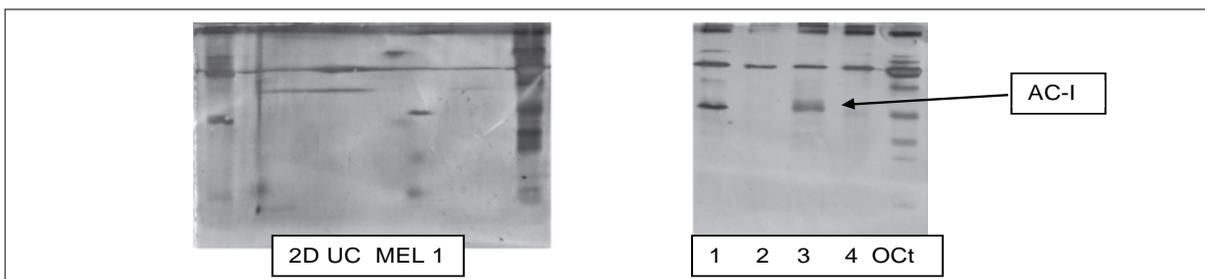


Tabla 2e. Datos del paciente BOT y BEH.

Paciente	BOT	BEH (1)	BEH (2)
Fecha	21/03/2012	08/02/2013	15/02/2013
Edad (años)	49	48	48
Eculizumab	NO	NO	SÍ
Bili ind (0,2-0,9 mg/dl)	5,8	3,1	2,1
LDH (100-200 UI/L)	3.274	1.0037	2.559
Hb libre (2-7 mg/dl)	68	68	14,4
Haptoglobina (30-140 mg/dl)	menor de 8	menor de 8	menor de 8
Cr sérica (0,5-1,2 mg/dl)	0,89	0,84	0,78
2D			
AC-1	SÍ	SÍ	SÍ
Hb	SÍ	SÍ	SÍ (leve)

Figura 4e. Electroforesis 2D UC de los pacientes BOT y BHE (1 y 2). Orinas correspondientes a la Tabla 2e. Abreviaturas: Hb: hemoglobina, AC-I: Anhidrasa carbonica I, Alfa 1 micro: Alfa 1 microglobulina.

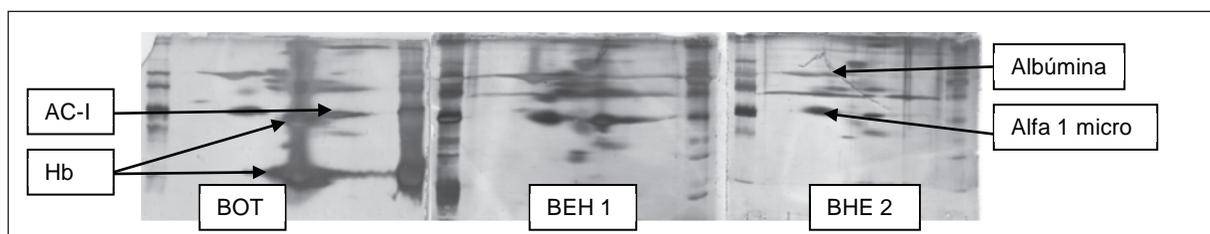
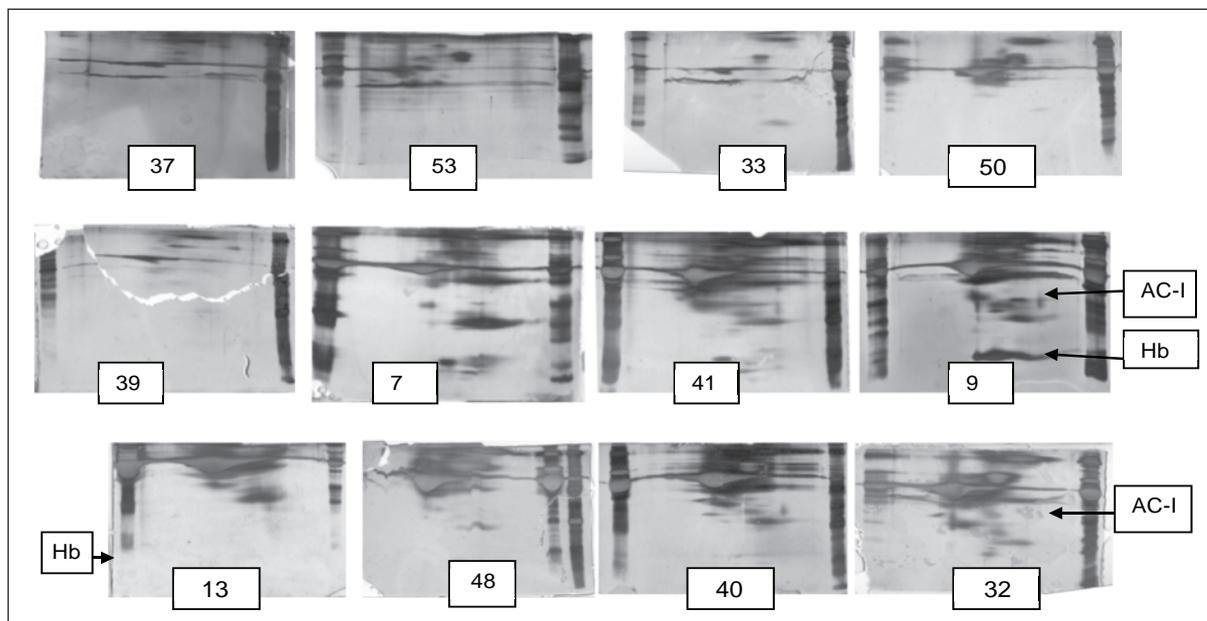


Tabla 3. Pacientes con Nefritis Lúpica diagnosticado por Biopsia Renal.

Identif. paciente	Edad (años)	Clearance de creatinina (ml/min)	Proteinuria (g/24 hs)	Microhematuria (Erit. por campo)	Presencia AC-I Orina 2DUC	Presencia Hb Orina 2DUC	Glomérulos en obleas (%)	Diagnóstico de la Punción Biopsia Renal
7	18	128	0,78	----	SÍ	SÍ	0	Nefritis Lúpica clase IV-G (A)
9	33	96	1,2	50-60	SÍ	SÍ	0	Nefritis Lúpica clase IV-G (A/C) 13/24, 3/12
13	34	56	3,7	15-20	SÍ	SÍ	9,3	Nefritis Lúpica clase IV-S (A/C) 13/24, 3/12
32	30	22	2,46	0-2	SÍ	NO	79,2	Nefritis Lúpica IV-G (A/C) 1/24, 7/12
33	49	136	0,14	30-50	NO	NO	15,4	Nefritis Lúpica mesangial clase III Actividad 2-24, cronicidad 2-12
37	31	174	neg	2-3	NO	NO	0	Nefritis Lúpica focal clase III a Actividad 2/24, cronicidad 2/12
39	18	102	Vestigios	15-20	NO	NO	5,3	Nefritis Lúpica clase III Actividad 2-24, cronicidad 4-12
40	41	80	5,50	5-10	SÍ	SÍ	23,1	Nefritis Lúpica clase IV-S (A/C) y membranosa (Clase V) 8/24, 3/12
41	39	52	3,0	4-8	SÍ	SÍ	0	Nefritis Lúpica clase IV-S (A/C) 14/24, 2/12
48	23	136	3,0	10-20	SÍ	SÍ	0	Nefritis Lúpica clase III (A/C); 7/24, 3/12
50	30	124	2,2	---	NO	NO	18	Nefritis Lúpica clase IV (A/C) 5/24; 4/12
53	37	94	0,92	30-40	NO	NO	0	Nefritis Lúpica clase III (C)

Figura 5. Electroforesis 2D UC de orinas de pacientes con Nefritis Lúpica. Abreviaturas: AC-I: Anhidrasa carbonica-I, Hb: Hemoglobina.



Paralelamente se realizaron las electroforesis de las orinas por 2D UC, en las que se observó la AC-I y la hemoglobina conjuntamente. En la Figura 5 se observan las electroforesis 2D UC de los pacientes con Nefritis Lúpica.

Hematuria Post-renal

Realizamos la electroforesis 2D UC a 4 orinas de pacientes con infección urinaria (A, B, C y D) y 6 orinas provenientes del servicio de urología de pacientes con sonda vesical. El aspecto de las orinas se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Orinas con infección urinaria (A, B, C y D) y provenientes del servicio de urología (1, 2, 3, 4, 5 y 6). Aspecto de la orina y tira reactiva de hemoglobina Roche Combur (Hb).

ORINAS	ASPECTO	Tira reactiva Hb
A	Rojo	Abundante
B	Amarillo claro	Regular
C	Amarillo claro	Abundante
D	Amarillo claro	Abundante
1	Amarillo claro	Vestigios
2	Amarillo claro	Abundante
3	Rosado +	Abundante
4	Rosado ++	Abundante
5	Rojo	Abundante
6	Rojo	Abundante

En las orinas de los pacientes con hemólisis post-renal, puede observarse solamente Hb, y en caso en que se observe la AC-I en la orina, coexiste con una abundante hemoglobinuria, en relación AC-I/Hb como en la hemólisis in vitro (Figuras 6 y 7).

Discusión y conclusiones

La AC-I fue detectada en la orina de los pacientes con HPN (hemólisis intravascular) por la técnica de Electroforesis Bidimensional 2D UC, aún en aquellas orinas donde no se observa hemoglobina, o la misma está presente en muy baja concentración. Si se compara con la hemólisis que se produce en el glomérulo de los pacientes con LES, las orinas también presentan AC-I, sin embargo está acompañada por la presencia de hemoglobina, debido a que se lisa el glóbulo rojo en el glomérulo y la Hb es captada parcialmente por la Haptoglobina (Hp) por su corta permanencia, por lo tanto la Hb libre filtra en una relación más próxima con la AC-I, en contraste con la hemólisis post-renal, donde la AC-I solo se observa en caso de una abundante hemoglobinuria y expone una relación AC-I/Hb similar a la producida in vitro como se observa en el esquema de la Figura 8.

Los pacientes con HPN que recibieron tratamiento con eculizumab disminuyeron los parámetros de hemólisis, así como la presencia de AC-I en orina. El dosaje de Hp continúa disminuido luego del tratamiento porque persiste la hemólisis extravascular. Al disminuir la hemólisis, no solo baja la Hb y la AC-I en orina, sino también el resto de las proteínas que estaban aumentadas, como la albúmina y la alfa 1 microglobulina, en el lapso de una semana (paciente BEH), suponiendo una inhibición en la reabsorción de las proteínas por competencia. En el paciente MEL es de consideración el aumento de la AC-I en orina frente a un escape hemolítico por infección, evidenciando la utilidad de la AC-I en el seguimiento del paciente en tratamiento.

Figura 6. Electroforesis 2D UC de orinas de pacientes con infección urinaria.

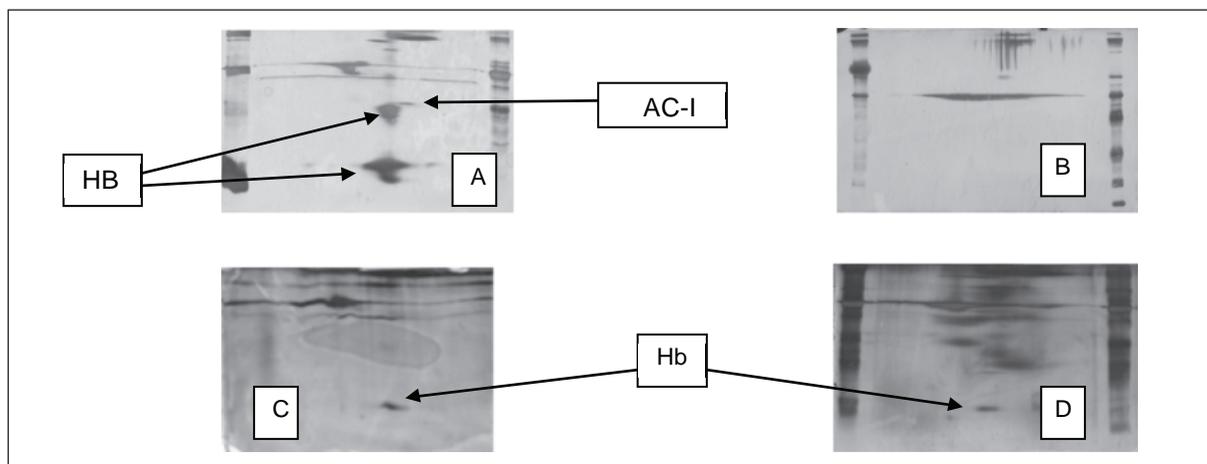


Figura 7. Electroforesis 2D UC de orinas de pacientes con sonda vesical provenientes del servicio de urología.

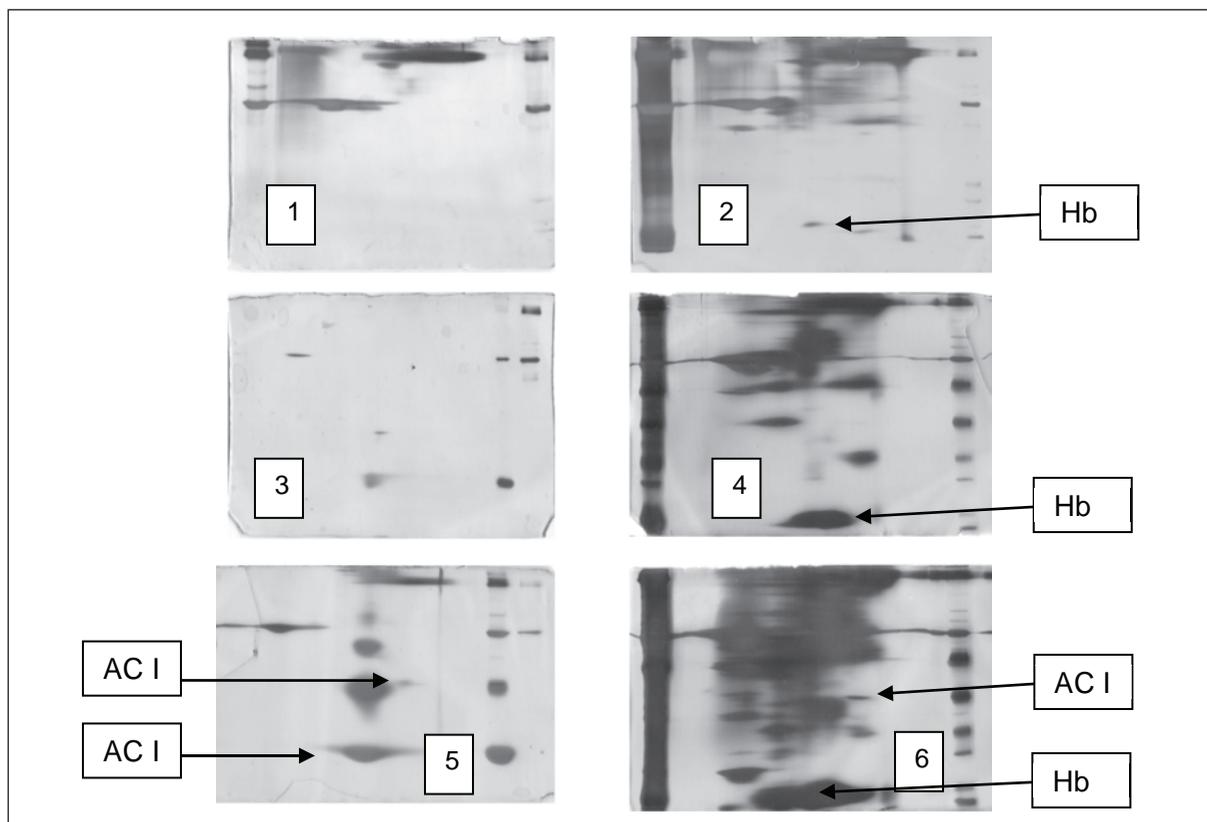
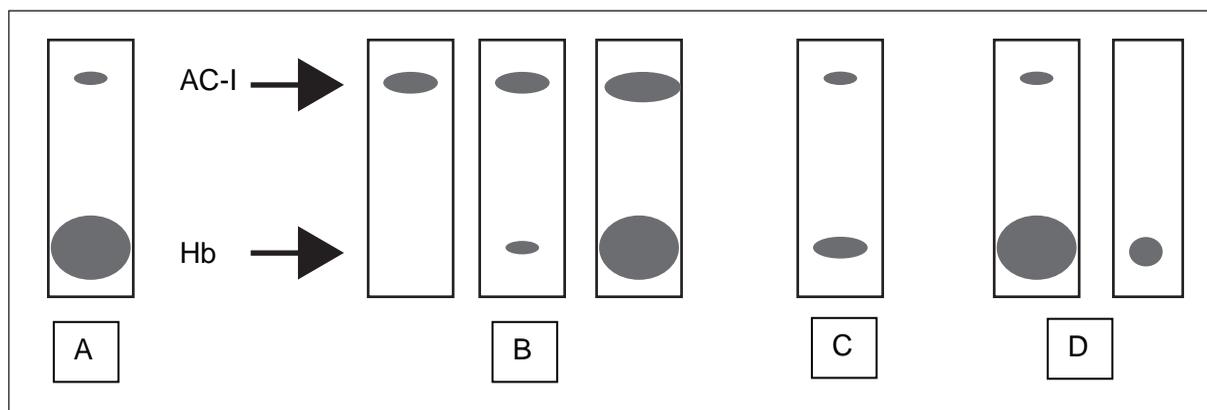


Figura 8. Esquema representativo del SDS-PAGE de los diferentes patrones cualitativos de la relación AC I/Hb. A) Relación normal dentro del eritrocito in vitro. B) Posibles patrones en HPN. C) Posible patrón en LES. D) Posibles patrones en hemólisis post-renal. Abreviaturas: HPN: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, LES: Lupus Eritematoso Sistémico.



En las orinas de los pacientes lúpicos con microhematuria dismórfica, se observa la presencia simultánea de ambas proteínas, la AC-I y la Hb, y la intensidad de las mismas en la electroforesis 2D UC no correlaciona con el número de eritrocitos por campo observado en el sedimento urinario (Tabla 3). En un trabajo anterior, se discutieron los perfiles urinarios en distintas glomerulopatías.¹²

En los pacientes con Hb por causa post-renal, la orina A y 5, que presentan una franca macrohematuria, se observa la relación AC-I/Hb, semejante a la hemólisis in vitro (Figura 2). Es de interés observar el aporte de otras proteínas plasmáticas de alta concentración, como la albúmina y la inmunoglobulina G en dichas orinas, las cuales mantienen una relación con la hemoglobina acorde a la presente

en sangre entera, por lo tanto es claramente diferenciable de los paciente 1, 2, 4 y 6, con sonda vesical y compromiso renal. Esto es importante desde el punto de vista del análisis del laboratorio frente a la presencia simultánea de Hb y albuminuria al momento de informar el origen de la proteinuria, ya que la albúmina podría ser de origen glomerular o una contaminación plasmática post-renal.

En los casos 2 y 3 de hemoglobinuria post-renal, con baja concentración de hemoglobina, no se observa la AC-I. Si hubiese sido de causa renal, con dicho nivel de hemoglobina, se observaría la AC-I como en los pacientes con nefritis lúpica: 7, 41 y 48.

La relación aumentada AC-I/Hb en los pacientes con HPN, obtenida por la Electroforesis Bidimensional, permitió caracterizar la hemólisis intravascular en dichos pacientes, siendo diferenciable de las causas de hemoglobinuria renal y post-renal. Además, la AC-I podría ser de utilidad para evaluar posibles "escapes hemolíticos" durante el tratamiento con eculizumab.

Bibliografía

1. Pavlicek Z, Jaenicke R. On the Mechanism of Hemoglobin-Haptoglobin Complex Formation. *Eur. J. Biochem* 1971; (18): 305-312.
2. Fagoonee S, Gburek J, Hirsch E, Marro S, Moestrup SK, Laurberg JM, Christensen EI, Silengo L, Altruda F, Tolosano E. Plasma Protein Haptoglobin Modulates Renal Iron Loading. *American Journal of Pathology* 2005; 166 (4): 973-983.
3. Asleh R, Levy P. In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vascular Health and Risk Management* 2005; 1(1): 19-28.
4. Gburek J, Verroust PJ, Willnow TE., Fyfe JC, Nowacki W, Jacobsen C, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin and Cubilin are Endocytic Receptors Involved in Renal Clearance of Hemoglobin. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 423-430.
5. Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu rev biochem* 1995; 64: 375-401.
6. Petermann ML, Hakala NV. Molecular kinetic and electrophoretic studies on carbonic anhydrase. Received for publication 1942. Downloaded from www.jbc.org at swets subscription service.
7. Robinson JR. Urinary excretion of carbonic anhydrase. A simple test for the detection of intravascular haemolysis. *J Clin Path* 1950; 3: 142-145.
8. Hillmen P, Hall C, Marsh J, Elebute M, Michel P, Bombara M y col. Effect of Eculizumab on Hemolysis and Transfusion Requirements in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004; 350: 552-559.
9. Facio ML, Madalena LB, Fraind S, Alejandro ME, Bresciani P, Pizzolato M. Electroforesis bidimensional en orina. Una alternativa para el laboratorio clínico. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013; 47(1): 37-46.
10. Switzer RC et al. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1979; 98(1): 231-237.
11. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky A, Lazarowski A, Kanakura Y y col. Genetic Variants in C5 and Poor Response to Eculizumab. *N Engl J Med* 2014; 370: 632-639.
12. Facio ML, De Rosa M, Bresciani P, Angerosa M, Pizzolato M. Microproteínas urinarias marcadoras de daño renal en pacientes con glomerulopatías. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2016; 50 (4): 525-546.