



FUNDACION RENE BARON



# Diagnóstico de laboratorio en el Síndrome Urémico Hemolítico atípico (SUHa)

**Célia Dos Santos**

Becaria post-doctoral CONICET  
Directora: Dra Analía Sánchez-Luceros

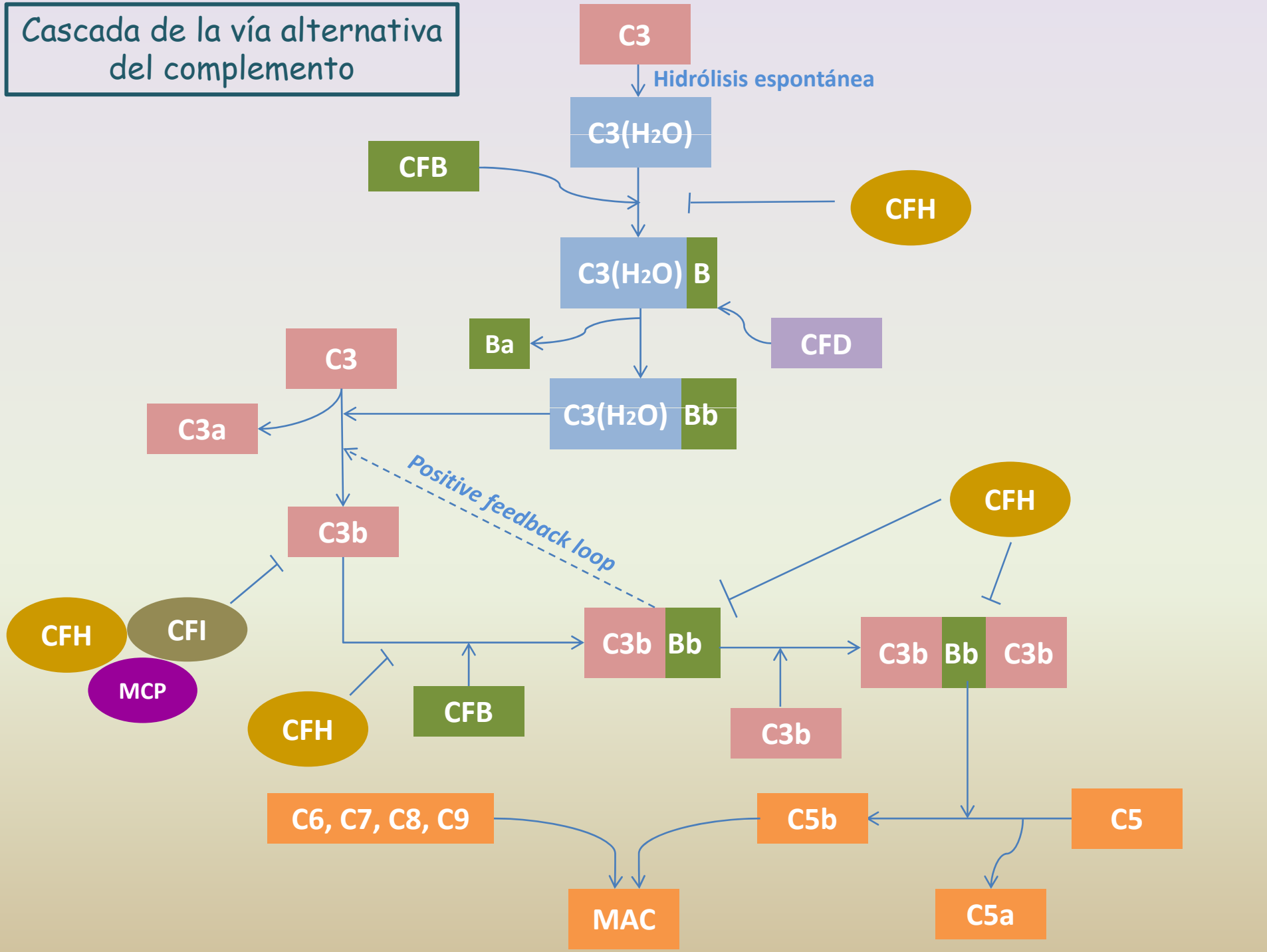
Departamento de Hemostasia y Trombosis  
Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex (IIHEMA)  
Academia Nacional de Medicina

# SÍNDROME ÚREMICO HEMOLÍTICO

---

- Tríada: anemia hemolítica microangiopática no inmune, trombocitopenia, falla renal.
- SUH típico: 90% de los casos
  - Infección por microorganismos productores de Shiga toxina (Stx) (Escherichia coli, Shigella)
- SUH atípico: 10% de los casos (0,5 casos/millón/año)
  - **Pérdida de la regulación de la vía alternativa del complemento.**
- SUHa
  - Formas hereditarias: variantes genéticas en genes del complemento.  
*Rodríguez de Córdoba et al., Semin Thromb Hemost. 2014.*
  - Formas auto-inmunes: auto-anticuerpos anti-CFH.  
*Dragon-Durey et al., J Am Soc Nephrol. 2005.*

# Cascada de la vía alternativa del complemento



# SUHa HEREDITARIO

---

➤ 40-60% de los pacientes con mutaciones en los genes del complemento.

➤ Mutaciones en los componentes de la C3 convertasa:

→ C3: 5-10%

→ CFB: <5%

➤ Mutaciones en los reguladores:

→ CFH: 25-30%

→ CFI: 5-15%

→ MCP: 10%

Haplotipos de riesgo:

CFH-H3: 6 variantes genéticas

MCP<sub>ggaac</sub>: 5 variantes genéticas

➤ Mutaciones en otros genes:

→ THBD: 5%

→ DGK $\epsilon$ : 25% (<1 año)

# SUHa HEREDITARIO

---

## Mutaciones combinadas:

➤ 8-10% de los pacientes con mutaciones en CFH, C3, o CFB son portadores de otra variante genética.

➤ 25% de los pacientes SUHa con mutaciones en MCP o CFI tienen una segunda o tercera mutación.

*Bresin et al., J Am Soc Nephrol, 2013*

➤ Penetrancia incompleta: 50% de los portadores no presentan síntomas.

➤ Factores adicionales, eventos gatillos:

→ infecciones bacterianas (no-*E. coli*) o virales

→ cáncer (drogas)

→ enfermedades auto-inmunes

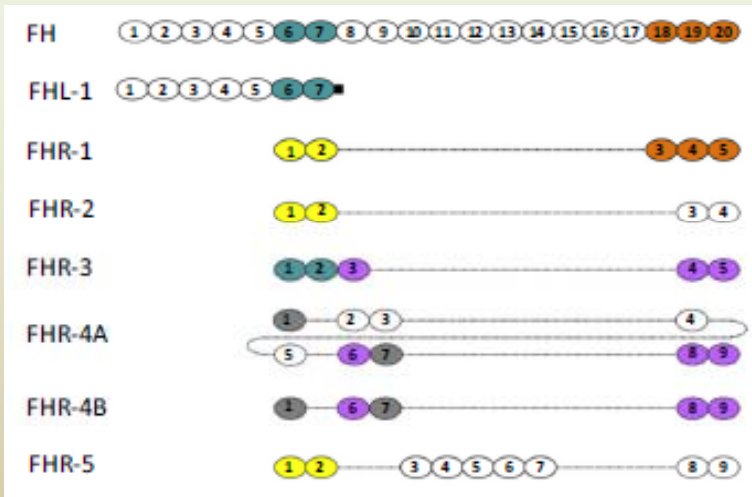
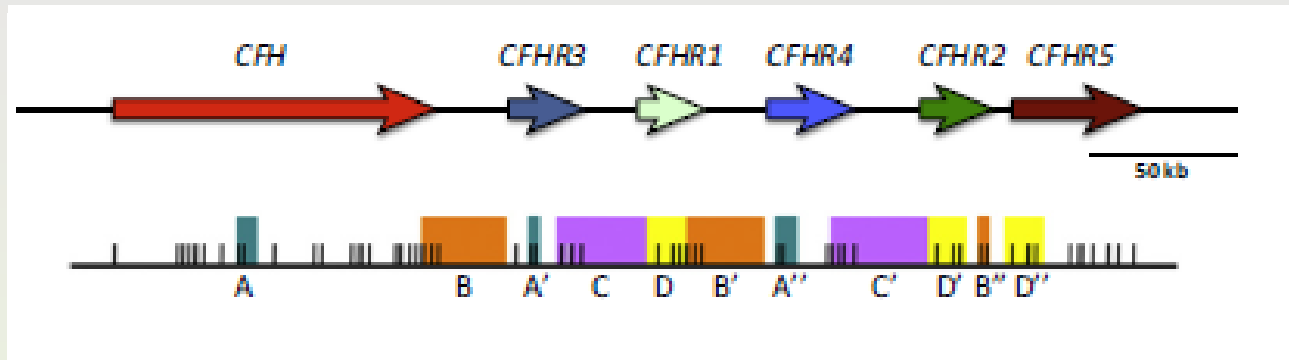
→ embarazo

→ trasplantes (órganos sólidos, CPSP)

→ ...

# SUHa HEREDITARIO

- Gen CFH en el *cluster* RCA (Regulators Complement Activation), Chr 1q32  
CFHR1-5: homólogos de CFH



- Recombinación génica generando proteínas híbridas CFH/CFHR1 o CFH/CFHR3.
- Delección completa de CFHR1-CFHR3 asociada a la forma autoinmune del SUHa en la población pediátrica.

# SUHa: LABORATORIO

PTT vs SUHa → Parámetros de ADAMTS13: Actividad e Inhibidores

Hematología	<ul style="list-style-type: none"><li>- Hemoglobina &lt;10 g/dL</li><li>- &gt;1% esquistocitos (frotis de SP)</li><li>- Plaquetas &lt;150 000/mm<sup>3</sup> (descenso 25% nivel basal)</li><li>- Prueba de Coombs directa negativa</li></ul>
Bioquímica	<ul style="list-style-type: none"><li>- LDH</li><li>- Creatinina/Urea</li><li>- Bilirubina</li><li>- Haptoglobina</li></ul>
SUH Stx	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aislamiento, caracterización, identificación patógeno</li></ul>
Otros	<ul style="list-style-type: none"><li>- Test de embarazo</li><li>- Hipertensión</li></ul>

*Goodship et al., Kidney International, 2017*

# SUHa: ENSAYOS DEL COMPLEMENTO

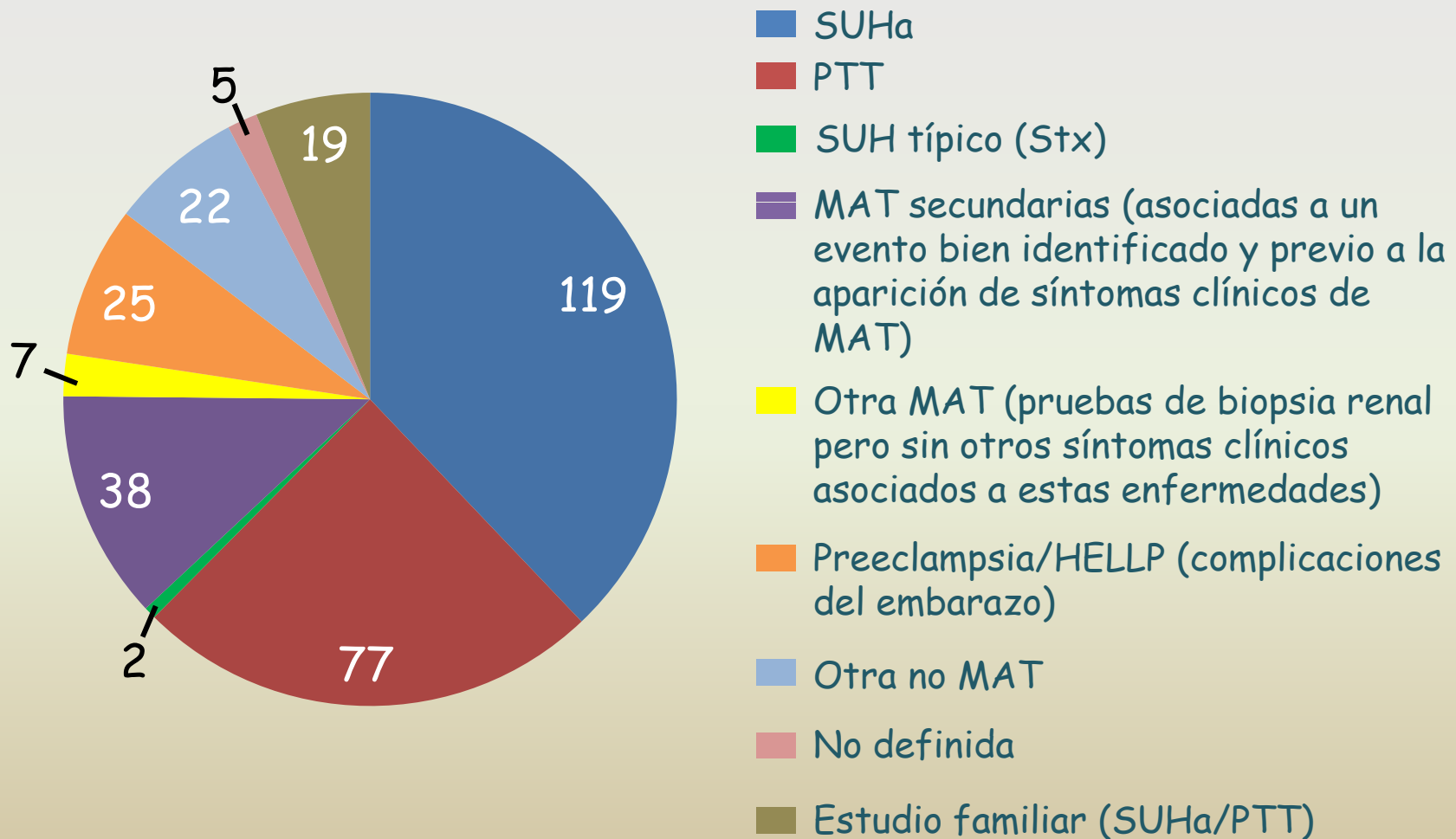
Dosaje de proteínas (plasma o suero)	<ul style="list-style-type: none"><li>- C3, C4, FB</li><li>- Reguladores: FH, FI, MCP</li><li>- Productos de cisión: C3c, C3d, Bb</li><li>- Producto de activación: C5b-9</li></ul>
Ensayos funcionales	CH50, AH50, FH específico (eritrocitos)
Auto-anticuerpos	Anti-FH
Biología molecular	<ul style="list-style-type: none"><li>- Panel de genes (secuenciación): CFH, CFI, MCP, C3, CFB, THBD, DGKE</li><li>- Reordenamiento genómico (MLPA): CFH/CFHR1-5</li></ul>

Angioi *et al.*, *Kidney International*, 2016  
Goodship *et al.*, *Kidney International*, 2017



# REGISTRO DE PACIENTES CON MAT

Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHEMA-ANM)  
Enero 2013 → Marzo 2017, n= 337 pacientes (ADAMTS13)



# REGISTRO DE PACIENTES CON MAT

---

- Registro actualizado permite la caracterización y la descripción de la población afectada por estas enfermedades.
- Registro institucional
  - elaborar recomendaciones y normas de cuidado
  - mejorar la atención y el tratamiento de los pacientes
- Único laboratorio en Argentina que propone estudios de ADAMTS13: diagnóstico diferencial PTT/SUHa.
- Único laboratorio en Argentina que propone estudios del complemento en las enfermedades asociadas a las alteraciones de la vía alternativa.

# ESTUDIOS IMPLEMENTADOS IIHEMA (1)

---

- Biología Molecular de los genes del complemento en nuestro laboratorio
- Muestra: **2-10 mL sangre entera EDTA**
- Metodología: estudio por PCR y secuenciación de Sanger
- Genes estudiados: **CFH, CFI y MCP**
- Cantidad de pacientes estudiados en nuestro laboratorio: n=25
  - Pacientes con sospecha de SUHa (n=19): n=13 → CFH  
n=6 → CFH/CFI/MCP
  - Pacientes con sospecha de glomerulopatías (GMP) : n=6 → CFH
- 4/19 (21%) SUHa presentan variantes genéticas patogénicas en CFH.
- 1/6 GMP presenta una variante genética patogénica asociada al SUHa.

# ESTUDIOS GENETICOS IIHEMA

---

➤ Pacientes con haplotipo de riesgo CFH-H3:

➤ 6 variantes:

Fragmento	Posición nucleótido ADNc	Posición proteína
Promotor	c.-331 C>T	-
Exón 2	c.184 G>A	p.V62L
Exón 9	c.1204 T>C	p.Y402H
Exón 14	c.2016 A>G	p.Q672Q
Intrón 15	c.2237-543 G>A	-
Exón 19	c.2808 G>T	p.E936D

➤ 10/19 pacientes con SUHa son portadores del haplotipo de riesgo

→ 2 pacientes en homocigosis

→ 8 pacientes en heterocigosis

# ESTUDIOS GENETICOS IIHEMA

---

➤ Pacientes con haplotipo de riesgo MCP<sub>ggaac</sub> :

➤ 5 variantes:

Fragmento	Posición nucleótido ADNc	Posición proteína
Promotor 1	c.-652 A>G	-
Promotor 2	c.-366 A>G	-
Intrón 9	c.989-78 G>A	-
Intrón 12	c.1127+638 G>A	-
3'UTR	c.*897 T>C	-

➤ 3/6 pacientes estudiados por MCP son portadores del haplotipo de riesgo

→ 1 paciente en homocigosis

→ 2 pacientes en heterocigosis

➤ 1 paciente es portador de los 2 haplotipos H3 (heterocigosis) y MCP<sub>ggaac</sub> (homocigosis).

✓ Relacionar síntomas clínicos con la presencia del haplotipo de riesgo?

# ESTUDIOS GENETICOS IIHEMA

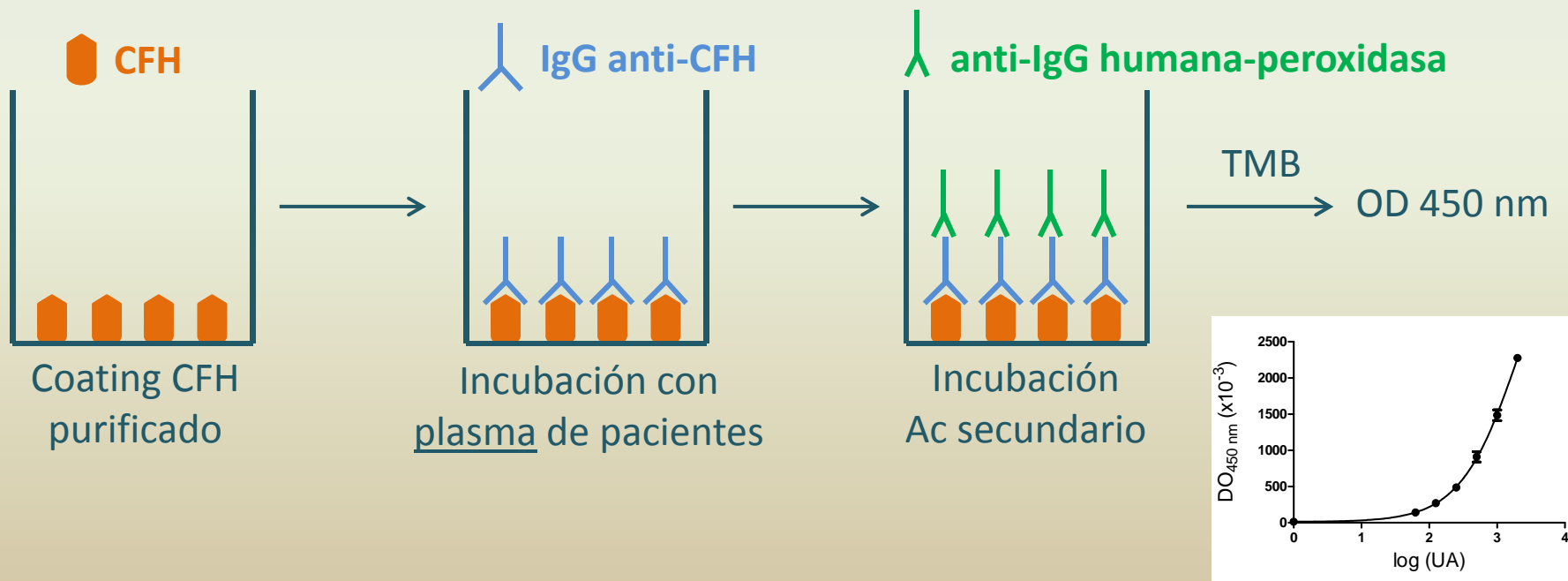
---

## ➤ Conclusiones:

- ✓ Estudios de CFH, CFI y MCP disponibles en nuestro laboratorio.
- ✓ SUHa: enfermedad multifactorial, el estudio amplio de los genes implicados en la patología es imprescindible.
- ✓ Fase de optimización para el estudio de C3 (dominio TED).
- ✓ Facilitar el estudio con el uso de la secuenciación de alto rendimiento (NGS: Next Generation Sequencing):
  - Colaboración con el laboratorio del Prof. R. Smith (MORL, Iowa)
  - Colaboración con el servicio de unidad genómica del Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, INTA-Castelar.

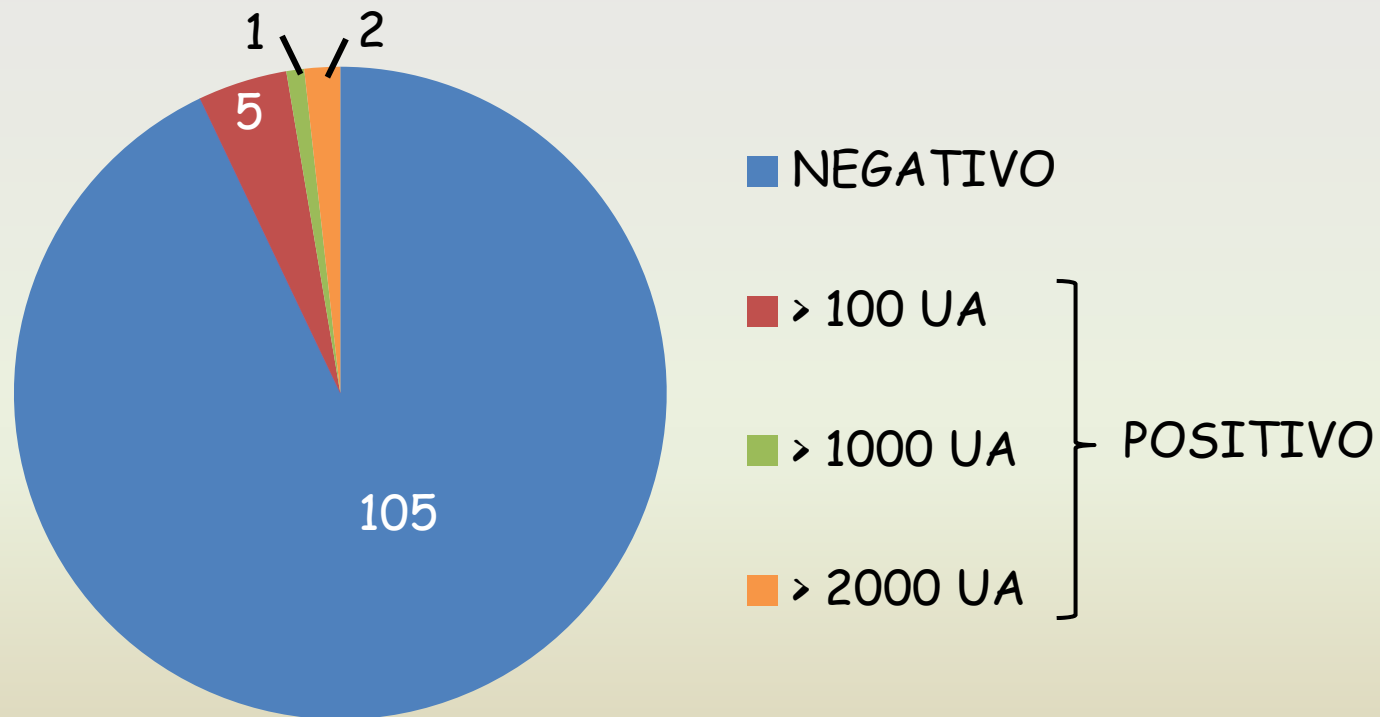
# ESTUDIOS IMPLEMENTADOS IIHEMA (2)

- Determinación de auto-anticuerpos anti-FH
- Muestra: **0,2-1 mL de plasma EDTA (o CITRATO)**
- Metodología: ELISA (modificado de Dragon-Durey *et al.*, *Methods in Molecular Biology*, 2014)



## ESTUDIOS IMPLEMENTADOS IIHEMA (2)

- Determinación de auto-anticuerpos anti-FH
- Estudio de 113 pacientes (59 adultos y 54 pediátricos):



- ✓ 8/113 pacientes con SUHa presentan auto-anticuerpos anti-CFH.
- ✓ Los 8 pacientes son pediátricos.



# SUHa AUTOINMUNE

POBLACION PEDIATRICA n=35	SUHa + Ac anti-FH n=6	SUHa - Ac anti-FH n=29
Edad (años)	7 (5 a 13)	6,7 (0 a 18)
Varon	3 (50%)	10 (35%)
Titulo Ac Anti-FH (UA)	<b>1797</b> (179-4361)	<b>3,6</b> (0-27)
Síntomas gastrointestinal	4 (67%)	25 (86%)
-Diarrea	1 (17%)	16 (55%)
-Vomitos	3 (50%)	9 (31%)
Hipertensión	<b>3 (50%)</b>	<b>7 (24%)</b>
Síntomas neurológicos	<b>3 (50%)</b>	<b>9 (31%)</b>
-Convulsiones	2 (33%)	8 (28%)
-Infarto cerebral	1 (17%)	1 (3%)
Hemoglobina (g/dL ± SD)	7,9 ± 2,2 (5,6-10,3)	9,3 ± 4,6 (4-30)
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L ± SD)	45,4 ± 21,4 (28-80)	56,7 ± 34,1 (5-137)
LDH (IU/L ± SD)	<b>4687</b> ± 2550 (2321-9536)	<b>3131</b> ± 2651 (500-11300)*
Creatinina (mg/dL ± SD)	3,5 ± 1,8 (1,5-6,25)	4,4 ± 2,9 (1,2-11,6)
Diálisis	4 (67%)	16 (55%)
Corticoides	4 (67%)	4 (14%)
Transfusión: -GR	4 (67%)	15 (52%)
-Plasma	0 (0%)	2 (7%)
-Plaquetas	1 (17%)	3 (10%)
Plasmaferesis	4 (67%)	10 (35%)

# SUHa AUTOINMUNE

---

## ➤ Conclusiones:

- ✓ **A19** Forma autoinmune afecta en su mayoría pacientes entre 9 y 13 años de edad.  
Nuestros pacientes tienen entre 5 y 13 años.
- ✓ Frecuencia:  $\approx 10\%$  de los pacientes SUHa con título positivo de anticuerpos
- ✓ Población pediátrica: 11-13% hasta 25% en Europa, 30% Corea, 56% en India  
→ **Argentina 14,8%**
- ✓ Forma asociada a síntomas graves:
  - severa hemólisis
  - insuficiencia renal
  - compromiso extra-renal (neuroológico más frecuente, hepático)Asociados a un mal pronóstico en ausencia de tratamiento.
- ✓ Diagnóstico y tratamiento temprano de los pacientes para:
  - evitar la muerte
  - limitar los casos de IR en etapa terminal
  - limitar las recaídas
  - recuperar una función renal normal

## Diapositiva 18

---

**A19**

La forma...

Alejandro; 22/04/2018

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

- Enfermedades raras: registro de las MAT del IIHEMA.
  - ✓ Investigación biomédica: correlación genotipo/fenotipo.
  
- Desarrollo de los análisis genéticos del complemento.
  - ✓ Secuenciación de alto rendimiento, descubrir otros genes asociados a la enfermedad.  

Database of complement gene variants  
<http://www.complement-db.org/home.php>
  
- Expresión y funcionalidad de las proteínas del complemento.
  - ✓ ELISA CFH/CFI, Citometría de flujo MCP, hemolisis eritrocitos .
  
- Biomarcadores del SUHa ?
  - ✓ Ensayo in vitro de cultivo de células endoteliales microvasculares.

Noris *et al.*, Blood, 2014

# GRACIAS

---

## División Trombosis:

Dra Analía Sánchez-Luceros  
Dra María Fabiana Alberto  
Dra Lucila Romero  
Dra Mara Agazzoni  
Dra Magalí Barrenechea  
Dra Fabiana María Alberto  
Residentes del Dpto H&T  
Secretarias del Dpto H&T

## División Química:

Dra Ana C. Kempfer  
Dra María A. Lazzari  
Msc. Juvenal Paiva  
Dra Adriana Woods  
Lic. Natalia Mogóllon  
Tec. María M. Casinelli

## División Hemostasia:

Dra Alicia Blanco  
Bioq. Lucía Remotti  
Bioq. María Paula Morandini  
Bioq. Marcelo Ingratti  
Bioq. Silvia Grosso

## Colaboradores:

MORL, University of Iowa, Iowa City, USA  
Prof. Richard J. Smith

Hôpital Européen G. Pompidou, Paris, France  
Dra M.A. Dragon-Durey



FUNDACION RENE BARON





# SÍNDROME ÚREMICO HEMOLÍTICO

## MICROANGIOPATÍAS TROMBÓTICAS (MAT)

Grupo de enfermedades raras que comparten características patológicas:

- Lesión microvascular de arteriolas y capilares (engrosamiento de pared)
- Edema y desprendimiento de las células endoteliales
- Acumulación de proteínas y residuos, trombos ricos en fibrina/plaquetas
- Isquemia/Necrosis tisular

Purpura Trombocitopénica Trombótica  
(PTT)

Síndrome Urémico Hemolítico  
(SUH)

TRIADA

- 1) anemia hemolítica microangiopática no inmune
- 2) trombocitopenia
- 3) injuria de órgano(s) de variable severidad

ADAMTS13 → Diagnóstico PTT vs SUH

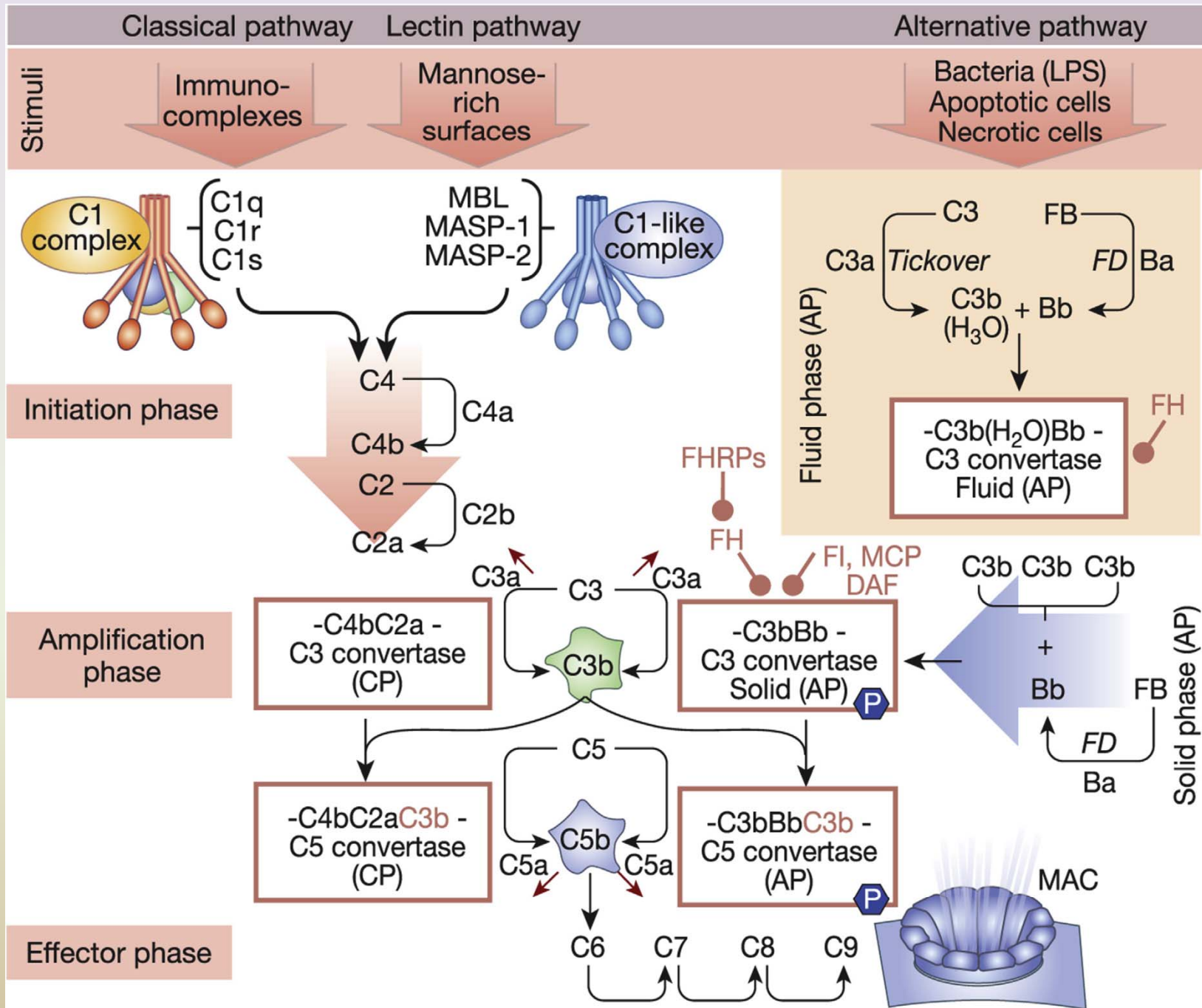
# ESTUDIOS GENETICOS IIHEMA

## ➤ Pacientes con mutaciones en CFH:

PACIENTES	Diagnóstico	Dominio	Cambio de nucleótido	Cambio de amino ácido	Literatura
Paciente nº1	SUHa	CCP 20	c.3572C>T	S1191L	Heinen S. <i>et al.</i> , Hum Mutat 2006
Paciente nº2	SUHa	CCP 20	c.3572C>T c.3590T>C	S1191L V1197A	Heinen S. <i>et al.</i> , Hum Mutat 2006
Paciente nº3	SUHa	CCP 20	c.3565C>T	L1189F	Rodríguez de Córdoba <i>et al.</i> , Mol Immunol 2004
Paciente nº4	GMNC3	CCP 2	c.242 A>C	Q81P	Bresin <i>et al.</i> , J Am Soc Nephrol 2013
Paciente nº5	SUHa	CCP 4	c.575 G>A	C192Y	No publicado/Col. Prof. Smith, Universidad de Iowa

- ✓ S1191L: asociada al SUHa. Impide la unión de CFH con C3b.
- ✓ S1191L + V1197L: conversión génica entre CFH y CFHR1 asociado al SUHa.
- ✓ L1189F: asociada al SUHa. Se sospecha que impide la unión CFH-C3b.
- ✓ Q81P: asociada al SUHa. Efecto "probablemente dañino" sobre la función. Reportada por primera vez en un paciente con GMNC3.
- ✓ Cys192 está localizado en el dominio CFH CCP4 de la proteína, implicado en la unión con C3b. C192Y efecto "probablemente dañino".

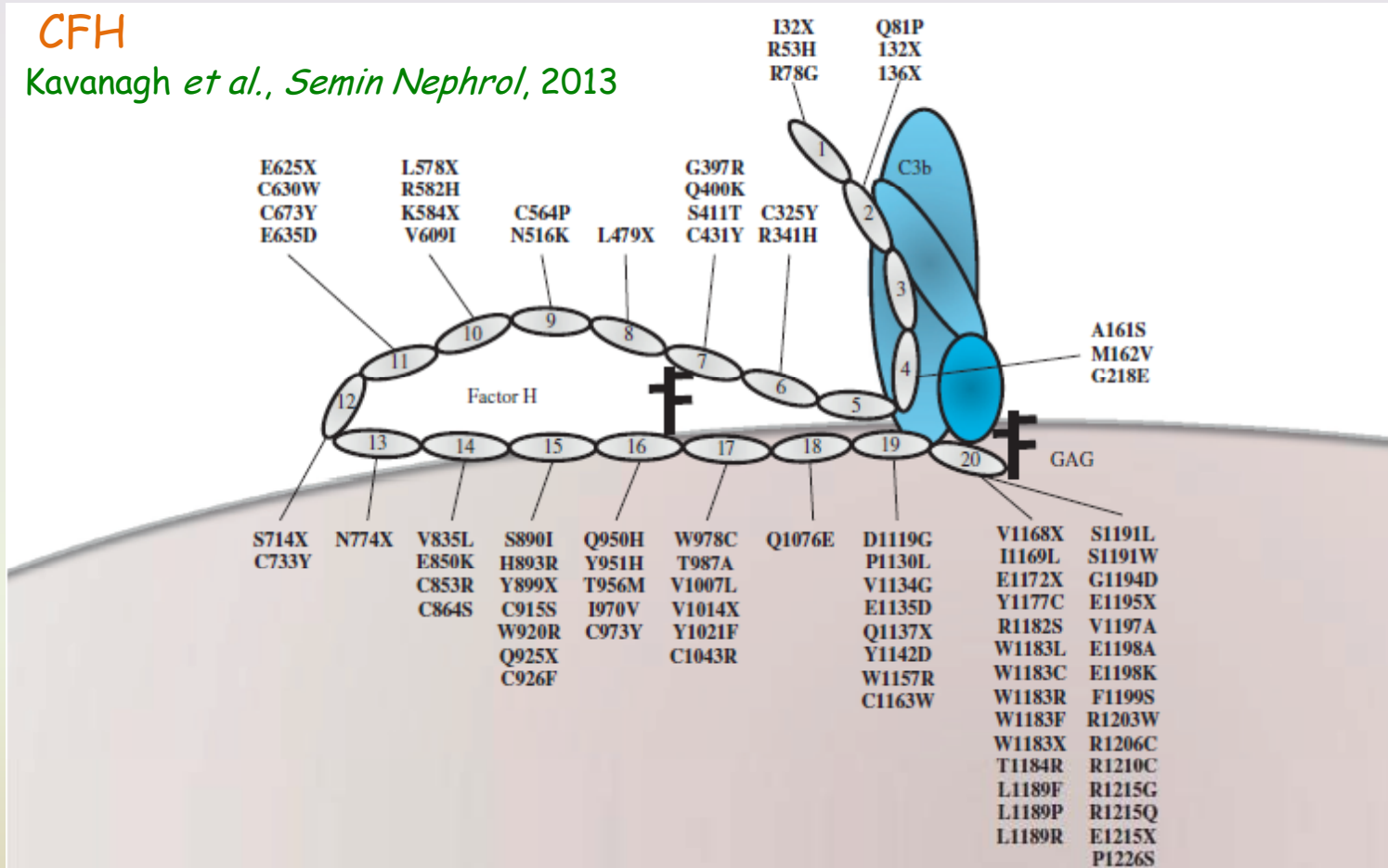




# SUHa HEREDITARIO

## CFH

Kavanagh *et al.*, *Semin Nephrol*, 2013



- Deficiencia de la proteína CFH:
  - cuantitativa (alteración de la producción o de la secreción)
  - cualitativa (alteración de la función)

# TRATAMIENTOS DEL SUHa

---

- Eculizumab (Soliris®): aprobado en 2011 por EMA y FDA
  - Anticuerpo IgG monoclonal recombinante anti-C5
  - Estudios en embarazadas
  - Después de trasplante para evitar rechazo, recurrencia
- Terapia plasmática (plasmaféresis o infusión de plasma)
  - reemplazar las proteínas no funcionales
  - eliminar los auto-anticuerpos anti-CFH y las proteínas mutadas
- Trasplante renal: requiere análisis completos
  - C3, C4, CFH, CFI, CFB plasmático, expresión de MCP
  - Auto-anticuerpos anti-CFH
  - Análisis genético para detectar variantes genéticas conocidas
  - Búsqueda de variantes genéticas en paciente y en donante
- Trasplante riñón + hígado:
  - Niños con variantes genéticas en CFH, CFI, CFB
  - Riesgo morbilidad/mortalidad por la cirugía + efectos de la inmunosupresión a largo plazo

# REGISTRO DE MAT IIHEMA

Enero 2013 → Marzo 2017, n= 337 pacientes

- Estudio prospectivo: Enero 2013 → Junio 2016, n= 250 pacientes
- Pacientes en fase aguda y congénitos, n=107

Laboratorio ADAMTS13	SUHa	PTTa	PTTc
Niveles de Actividad de ADAMTS13 (%±SD)	<b>86 ± 24</b>	7 ± 12 p<0.005	4 ± 3.8 p<0.005
Niveles de anticuerpos anti-ADAMTS13 (U/mL)	4.2 ± 3.4 p<0.005	<b>105 ± 171</b>	3.2 ± 2 p<0.005

p: Mann–Whitney

# SUHa HEREDITARIO

## ➤ Paciente n°1:

Mujer de 27 años con un evento de MAT 1 mes post-parto.

Tratamientos: Plasmaferesis (10 sesiones), Eculizumab (actual)

Hematocrito	22%	C3 (89-187 mg/dL)	<27 mg/dL
Hemoglobina	7,6 g/dL	C4 (165-380 mg/dL)	120 mg/dL
Plaquetas	138 000/ $\mu$ L	CFH (265-684 mg/dL)	396 mg/dL
LDH	654 IU/L	CFB (205-400 mg/dL)	142 mg/dL
Creatinina	3,3 mg/dL		

Screening genético → 2 variantes genéticas no descritas en la literatura:

CFH (NM\_000186): c.575 G>A, p.C192Y

CFI (NM\_000204): c.1189 G>T, p.V397L

- Colaboración con el Pr Richard Smith, Molecular Otolaryngology and Renal Research Laboratories, Carver College of Medicine, University of Iowa, USA.

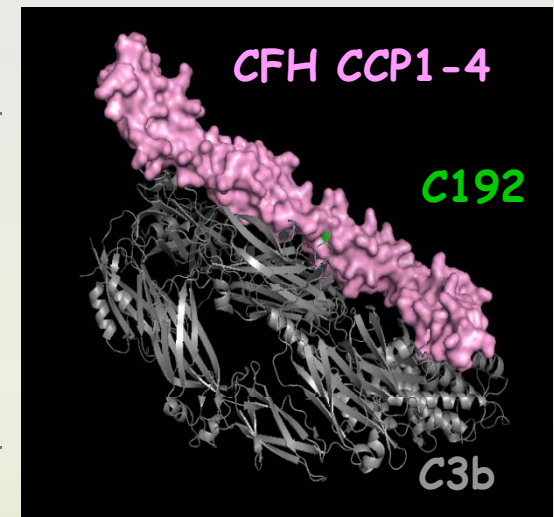
Dos Santos C. et al., 62nd Annual SSC Meeting of the ISTH.  
Montpellier, France. May 2016. J Thromb Haemost. 2016; 14 (Suppl 1): 75

# SUHa HEREDITARIO

➤ Paciente n°1:

Estudio *in silico*:

CFH p.C192Y	Prediction score	Prediction results
SIFT	0.00	Affect protein function
Polyphen-HDIV	1.00	Probably damaging
PANTHER	1.00	Disease causing
Mutation Taster	0.99	Disease causing
Meta-SNP	0.99	Disease causing



Modelo molecular 3D (Pymol)  
Modificado de Wu *et al.*, 2009.

✓ Cys192 está localizado en el dominio CFH CCP4 de la proteína, implicado en la unión con C3b.

# SUHa HEREDITARIO

---

➤ Paciente n°1:

Estudio *in silico*:

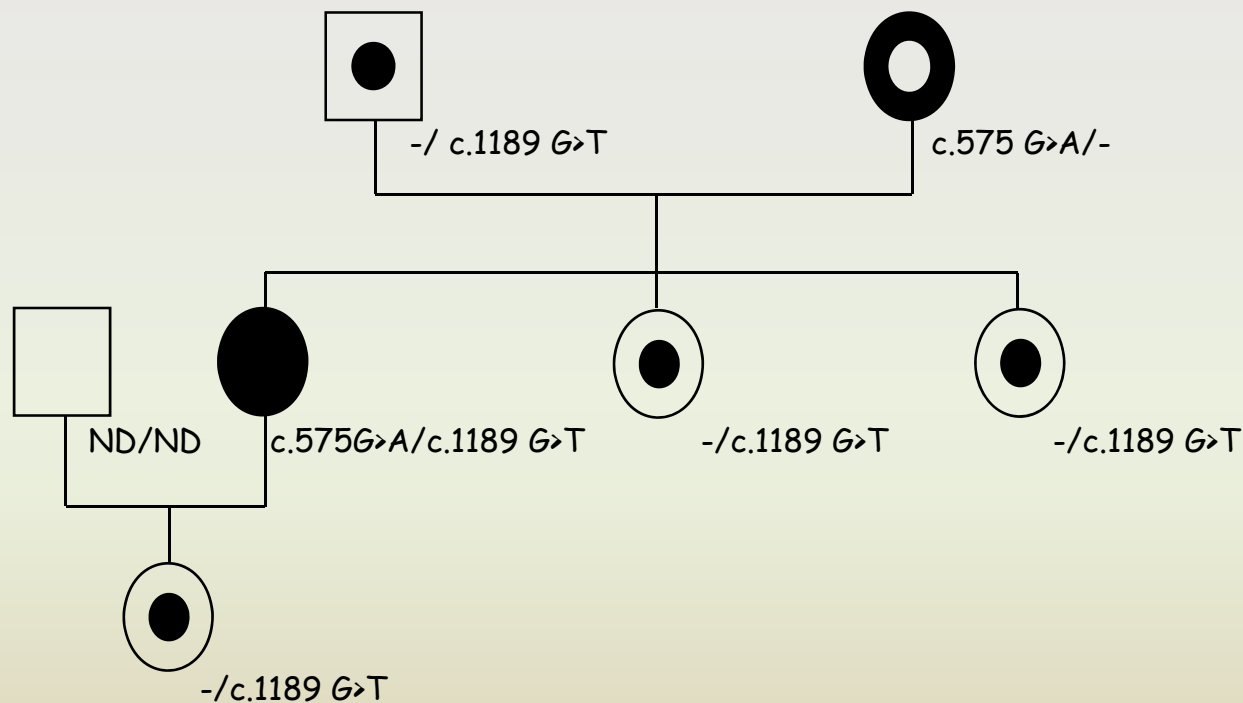
CFI p.V397L	Prediction score	Prediction result
SIFT	1.000	Tolerated
Polyphen-HDIV	0.001	Benign
PANTHER	0.145	Neutral
Mutation Taster	0.999	Polymorphism
Meta-SNP	0.273	Neutral

✓ V397L no parece tener efecto dañino sobre la expresión o la función de la proteína.

# SUHa HEREDITARIO

➤ Paciente n°1:

Estudio familiar:



- ✓ La paciente heredó la variante CFH p.C192Y de su madre y la variante CFI p.V397L de su padre.
- ✓ Pendiente: estudios funcionales para validación de resultados *in silico*.