

El diagnóstico de las microangiopatías trombóticas: rol del laboratorio

Analía Sánchez-Luceros, Inv. Adjunto CONICET
Jefe de Dto de Hemostasia y Trombosis
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, Argentina

MICROANGIOPATÍAS TROMBÓTICAS*

◆ **Trombocitopenia**

≥25% descenso del basal

<150.000

◆ **Hemólisis Microangiopática**

Esquistocitos >1%

LDH elevada

Descenso de haptoglobina

Descenso de Hb

Neurológicos

Confusión, convulsiones, etc.

Renales

Creatinina elevada, descenso del filtrado glomerular, HTA, alteraciones del sedimento

Gastrointestinales

Diarrea ± sangre, náuseas y vómitos, dolor abdominal, gastroenteritis

Thrombotic
Thrombocytopenic
Purpura
(ADAMTS13
deficiency)

«Atypical»
Hemolytic uremic
syndrome
(complement
alternate pathway
activation)

«Typical»
Hemolytic uremic
syndrome
(shigatoxin)

Cancer related
TMA
(bone marrow or
endovascular
metastasis, DIVC)

**Thrombotic
microangiopathy
syndrome**

Systemic
Rheumatic disease
(scleroderma
renal crisis,
systemic Lupus
erythematosus...)

Transplantation
related TMA

Malignant
hypertension

Disseminated Intra
vascular
coagulation

Metabolism
related TMA
(cyanocobalamin
deficiency in
infancy)

Drug related TMA
(toxic or immune
mechanisms)

EPIDEMIOLOGIA

PTT congénita/US: ?, menos del 5% in registros

PTT adquirida

3-6 casos por millón por año USA

2,9 adultos vs. 0,1 niños por millón por año

18-50 años, mujeres 3:1 (En niños 1:1)

Mayor riesgo: afro-americanos, obesos

- A pesar de la terapia plasmática: mortalidad alta 10-20%
- 30% de los pacientes tienen recaídas

Laboratorio

Trombocitopenia ($<20 \times 10^9/L$)

Reticulocitos \uparrow

Esquistocitos $>1\%$

Prueba de Coombs Directa

LDH

PT-APTT-Fib-DD/FDP

Sedimento

Función renal y hepática

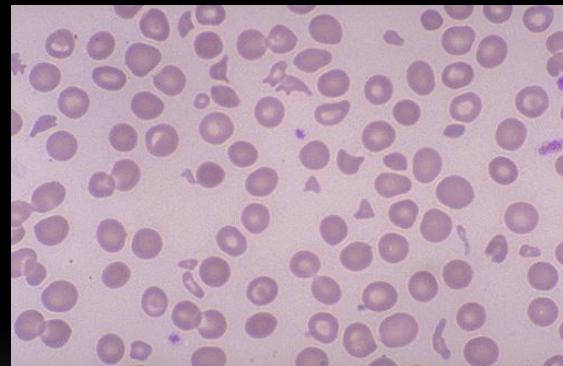
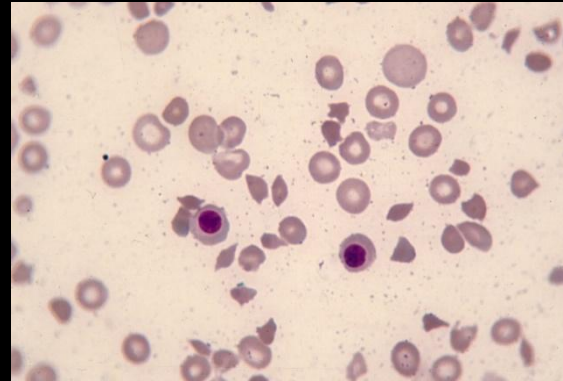
Troponina T \uparrow (50% of casos)

Haptoglobina

HIV, H1N1, HCV, HBV

ANA, Anti-DNA

Hcy. B12



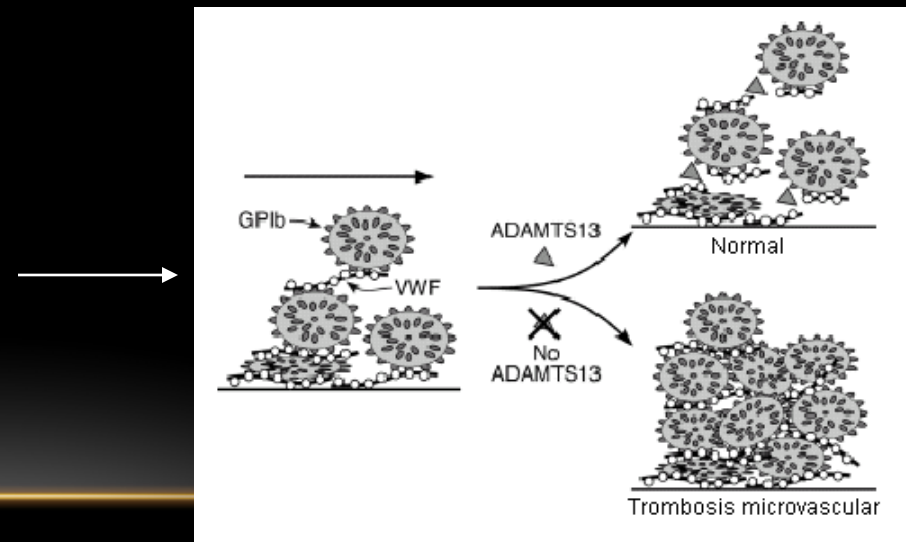
ADAMTS13

- 1982: durante la remisión de PTT: ULVWF plasmáticos (Moake)
- 1992-1996: shear rate alto indujo pérdidas de multímeros inhibida por EDTA (Kempfer), proteólisis del VWF bajo alto shear rate (Tsai), metaloproteasa plasmática que cliva VWF (Furlan; Tsai)
- 1998: severa deficiencia en PTT (Furlan; Tsai)
- 2001: A Desintegrin And Metalloprotease, with ThromboSpondin-1-like domains (Fujikawa; Gerritsen)

Chromosoma 9q34 (Levy). Síntesis hepática (Zheng)

Rol central en la fisiopatología, pero no único: es necesario un segundo hit:

Modelos de ratón y casos congénitos que se presentan en la vida adulta o asociado a embarazo



ADAMTS13 metodología

- Dosaje de antígeno (ELISA)

- Actividad:

Análisis multimérico

Enlace al colágeno

Cofactor de Ristocetina

VWF73 FRETs (fluorescence resonance energy transfer) *Kokame K, 2005*

Chr-VWF 73 (ELISA) (NV: 40-130%)

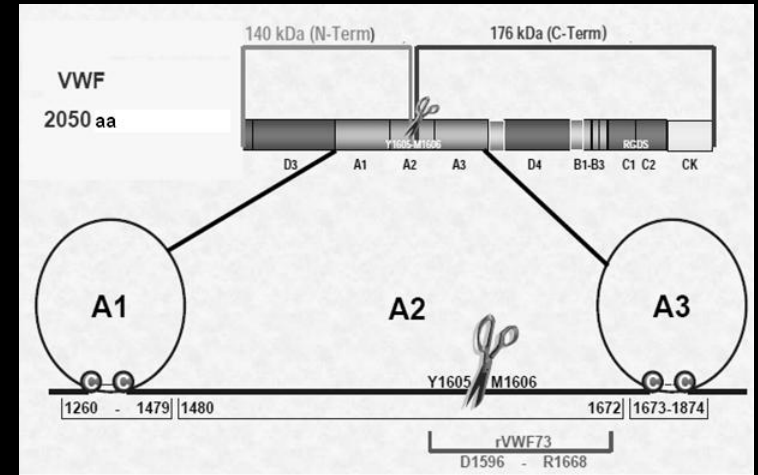
- Inhibidores:

Funcionales: ensayos de mezcla: plasma pre-tratado (56°C) + plasma normal

IgG anti-ADAMTS13 (ELISA): positiva si > 15 UI/mL

Anticuerpos Totales: inhibitorios + no inhibitorios: inmunoprecipitación, ELISA

IgA e IgM anti-ADAMTS13, CICs (home-made) *Kempfer, ISTH 2015*



FACTORES PREDICTIVOS DE DEFICIENCIA DE ADAMTS13 160/214 MATs Idiopáticas

Patient Characteristics	Adjusted Odds Ratio	95% CI	P Value
Creatinine level ≤ 200 $\mu\text{mol/L}$ (2.26 mg/dL)	23.4	8.8–62.5	<.001
Platelet count $\leq 30 \times 10^9/\text{L}$	9.1	3.4–24.2	<.001
Positive ANA	2.8	1.0–8.0	<.05

Table 5. Internal Validation to Predict Severe ADAMTS13 Deficiency at Clinical Presentation.

	At Least 1 Positive Criterion	All 3 Criteria Positive
Sensitivity	98.8 (96.9–100)	46.9 (41.3–53.1)
Specificity	48.1 (38.9–59.3)	98.1 (94.4–100)
Positive predictive value	85.0 (82.6–87.7)	98.7 (96.4–100)
Negative predictive value	93.3 (85.2–100)	38.6 (35.8–41.9)

Data are provided as median percent with 95% confidence interval.
doi:10.1371/journal.pone.0010208.t005

Compromiso renal en PTT

Hipótesis

- PTTa: ADAMTS13 residual renal podría proteger la microvasculatura renal del daño
- PTTc: ADAMTS13 está severamente disminuida en órganos y circulación: insultos crónicos podrían evolucionar a ESRD

SUHa: fenestración de las células endoteliales glomerulares podría conducir a mayor susceptibilidad a activación del complemento y hacerlo más vulnerable a la disregulación del complemento (ausencia de reguladores en la membrana basal)

Categorías de MAT según mecanismo

- TTP debida a deficiencia de ADAMTS13, adquirida o congénita
- SUH por enteropatógenos
- SUH por dis-regulación del complemento, congénito o adquirido
- MATs asociadas a embarazo, drogas, trasplante, cáncer, virus, etc.

Nara Medical University Registry: 919 pacientes.

PTTc 4.4 %

PTTa 31%

SUHa 11.5%

MATs secundarias 50.5%

autoinmunes 47% (21% PTT)

trasplante HSCT/hepático 13.6%

cáncer 13%

drogas 7.5%

embarazo 3.2% (27% PTT)

otros 10%

SINDROME UREMICO HEMOLITICO ATIPICO

- MAT mediada por complemento
- Afecta a niños y adultos jóvenes (60% < 18 años vs. 40%)
- Distribución similar por sexos
- SUHa: 5-10% de los SUH (STEC-HUS 6/100.000 niños).
- Incidencia es desconocida:

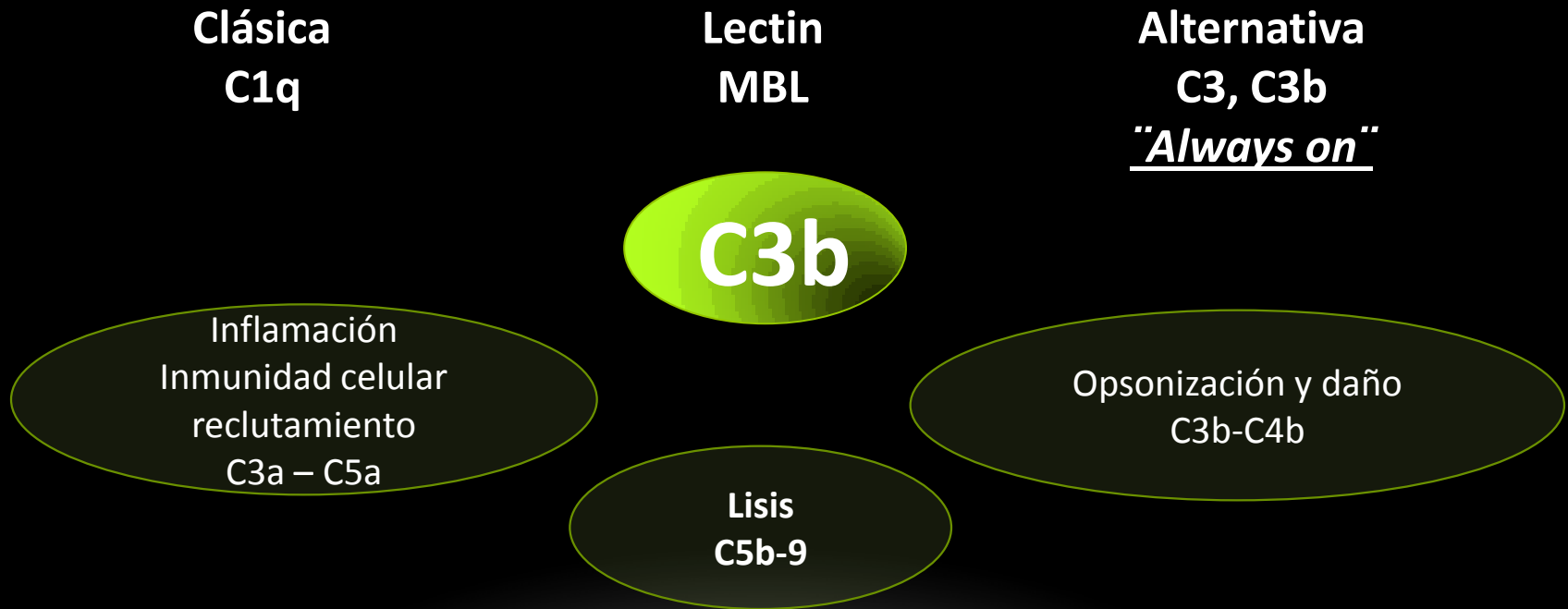
US: 1-2/millón habitantes (niños)

Europa: 0,11/millón habitantes (0-18 años).

adultos?

SUH atípico

La dis-regulación del complemento lleva a una activación crónica, sin control, del complemento



Prevalencia de mutaciones/SNPs que afectan la inhibición de la C3 convertasa de la vía alternativa del sistema del complement, con baja concentración de C3 sérico en SUHa

Regulación ↓
Pérdida de Función

CHF	25%
CIF	5-10%
CD46	10%
THBD	<5%
Anti-FH	10%

Combinadas 2-12%

Desconocidas 40-50%

Activación ↑
Ganancia de Función

C3	5-10%
CBF	rara

Penetrancia: alrededor de 50%

SUH atípico

- Inicio abrupto (80%). 20% puede ser insidioso, solo con hemólisis y recuento plaquetario disminuido aislado.
- Eventos gatillo presentes en 39-70%
- Clínicamente muy severas
 - 15% muerte
 - 25-50% ESRD
 - 15% insuficiencia renal
- 1/3 recuperación sin enfermedad renal significativa
 - 75% episodio único
 - 25% SUHa recurrente

aHUS y manifestaciones extra-renales

Presentes hasta en un 20% of pacientes

- Alteraciones neurológicas (10-48%; 16% en niños)
- Gastrointestinales (25-30%)
- Cardiovasculares (3-10%)
- Pulmonares: hipertensión/hemorragia
- Hipertensión maligna (8%)
- 5% Multivisceral: pancreatitis y/o hepatitis
- Otros: úlceras en piel, gangrena distal, rabdomiolisis

la hipertensión y sobrecarga de volumen pueden contribuir a estas manifestaciones y son difíciles de diferenciar.

Métodos para el diagnóstico y monitoreo del tratamiento

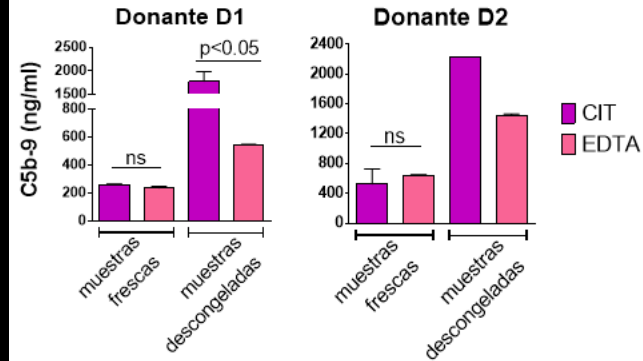
Aplicaciones, utilidad, y trampas

- **Actividad de ADAMTS13**: para confirmar el diagnóstico clínico de PTT, o excluir PTT si el SUHa es considerado. FUERTE RECOMENDACIÓN
- **Screening STEC**
- Medidas plasmáticas de FH, FB, FI, C3, C4, CD46: normal en 50% de los casos
- Estudios genéticos: varias semanas. CFH, CFI, CFB, MCP, C3, THBD. Normal en 35-50% de los casos
- Anticuerpos Anti-FH

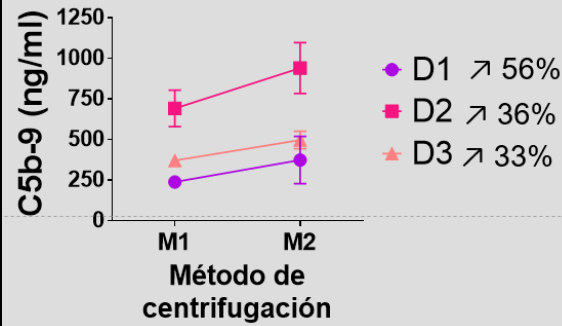
Métodos de diagnóstico y monitoreo

Pros y Cons: C5b-9 plasmático

1. Elección del anticoagulante

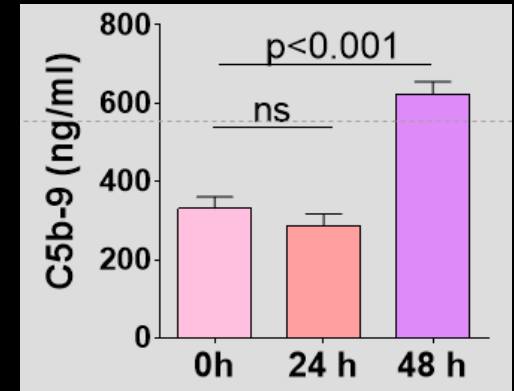


2. Método de centrifugación

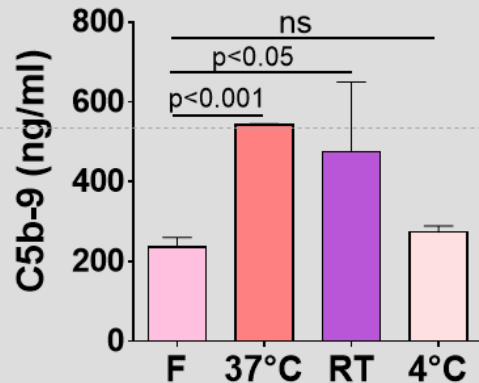


M1: 1000g 10min + 1000g 10min (4°C)
 M2: 1000g 10min + 12000g 2min (4°C)

3. Almacenamiento post-extracción



4. Descongelación de muestras



Precauciones con C5b-9

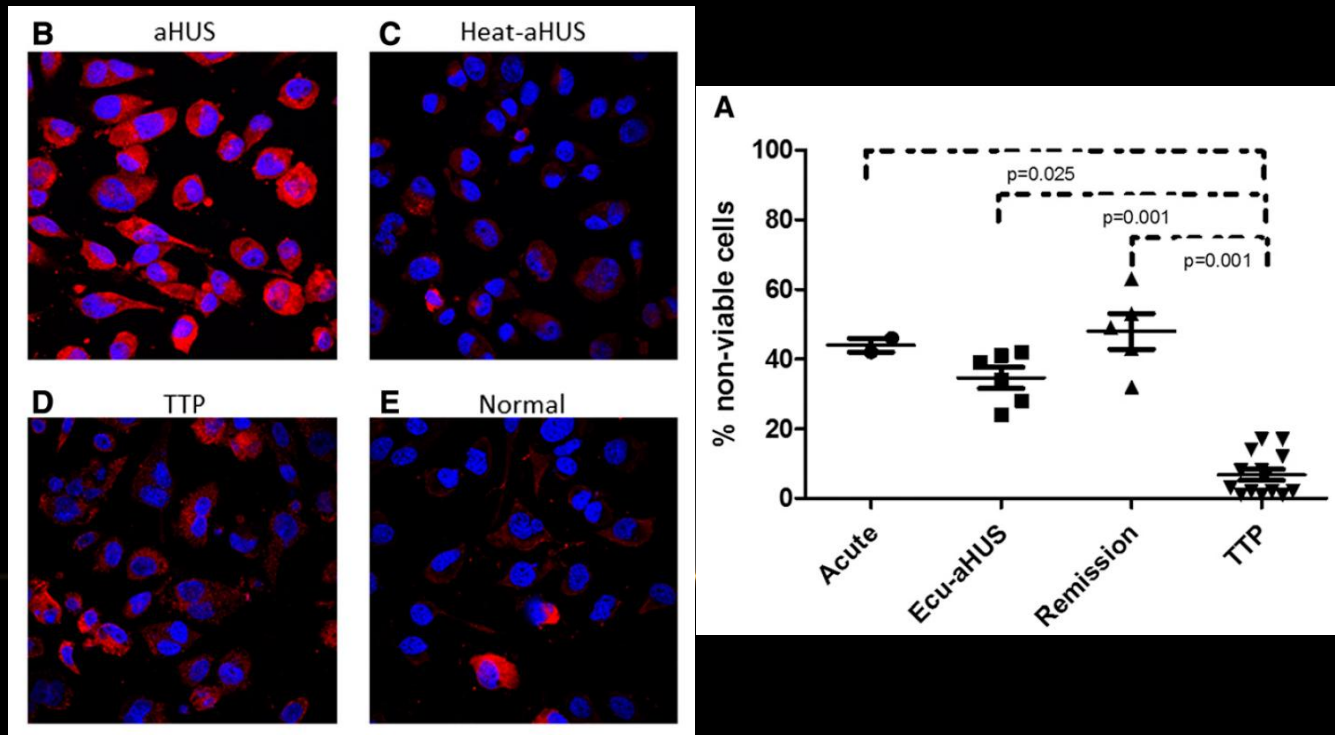
- Sangre recién extraída mejor
- EDTA
- 2 centrifugaciones de 10 min a 1000g a 4°C
- Hasta 24 hs estable a 4°
- Descongelación a 4°C

Métodos de diagnóstico y monitoreo

Pros y Cons: activación del complemento ex vivo.

Graviilaki E, 2015

- **Diagnóstico:** Ham modificado ex vivo
 - 1- células híbridas EA.hy926
 - 2- células híbridas EA.hy926 tratadas con fosfolipasa C específica de GPI
 - 2- línea celular TF-1 PIGA-null (deficiente en GPI)

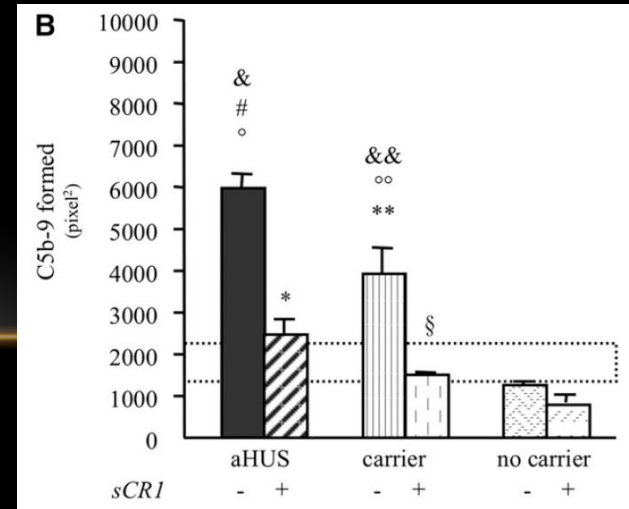
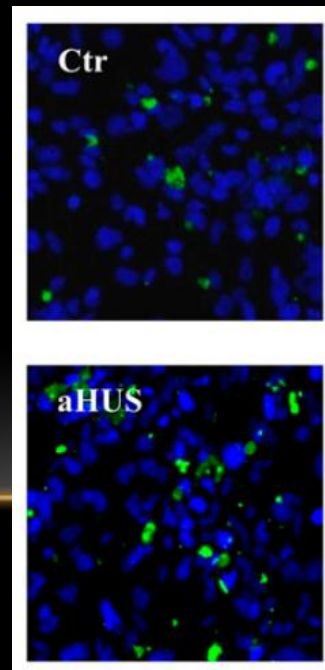
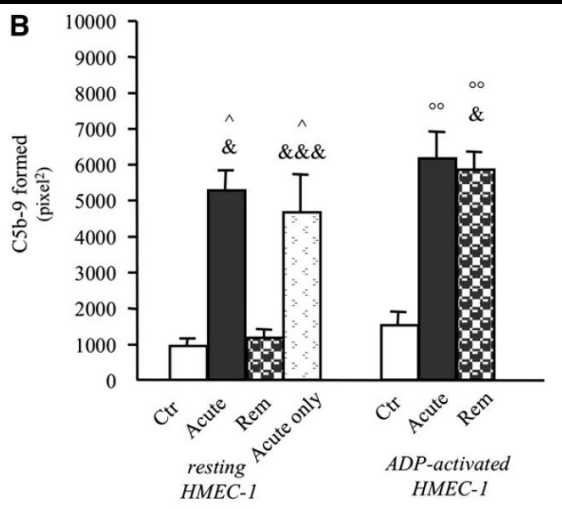


Métodos de diagnóstico y monitoreo

Pros y Cons: activación del complemento en métodos basados en células, Noris, 2014

Diagnóstico y monitoreo:

- C3, C5a, C5b-9 circulantes normales en agudo
- SUHa en agudo: todos con depósito de C3 and C5b-9 en HMEC-1
- Eculizumab: normalización de depósitos, en paralelo o pre-remisión. Dos niños requirieron aumento de dosis y dos adultos pudieron espaciarlas.



Pacientes con MAT estudiados 2013-2014

Departamento de H & T

- Criterios de inclusión: MAHA + trombocitopenia, sin otra causa; con muestra plasmática previa al tratamiento con PF y/o inmunosupresor; o biopsia renal con MAT; y/o sospecha de SUH atípico
- 153 pacientes consecutivos, 2013-2014
- 113 adultos (74%), 39 años (18-78), 72% mujeres
- 40 children: $13 \leq 2$ años, 37.5% niñas
- 9/153: biopsia renal MAT, o MF intraútero sin causa

21% deficiencia severa de actividad de ADAMTS13: PTT

Registro Oklahoma: 70/301, 23% con deficiencia severa, George JN, 2013

Pacientes con MAT estudiados 2013-2014

Departamento de H & T

	ADAMTS13 ≤10%	PTTc	PTTa
Niños	6/40 (15%)	2 Bajo terapia plasmática crónica	4: CR 1 post-rituximab 2 tratados con sirolimus
Adultos	26/113 (23%)	13 5: USS embarazo 6: bajo terapia plasmática crónica 2: 50 y 73 años	13 7 RC 5 (38%) rituximab intermitente 1 tratada con sirolimus 1 fallecido

aHUS

2 variantes/substituciones (significado desconocido):

CFH CCP3 (Exon 5): Heterocigota c.575G>A, C192Y

=> Polyphen-2/SIFT/PANTHER: *Afecta la función proteica*

=> polyP/phastCons: Nucleótido altamente conservado

CFI SP11 (Exon 11): Heterocigota c.1189G>T, V397L

=> Polyphen/SIFT/PANTHER: No afecta la función

=> polyP/phastCons: Nucleótido no conservado

2 variantes silentes (SNPs con riesgo de enfermedad):

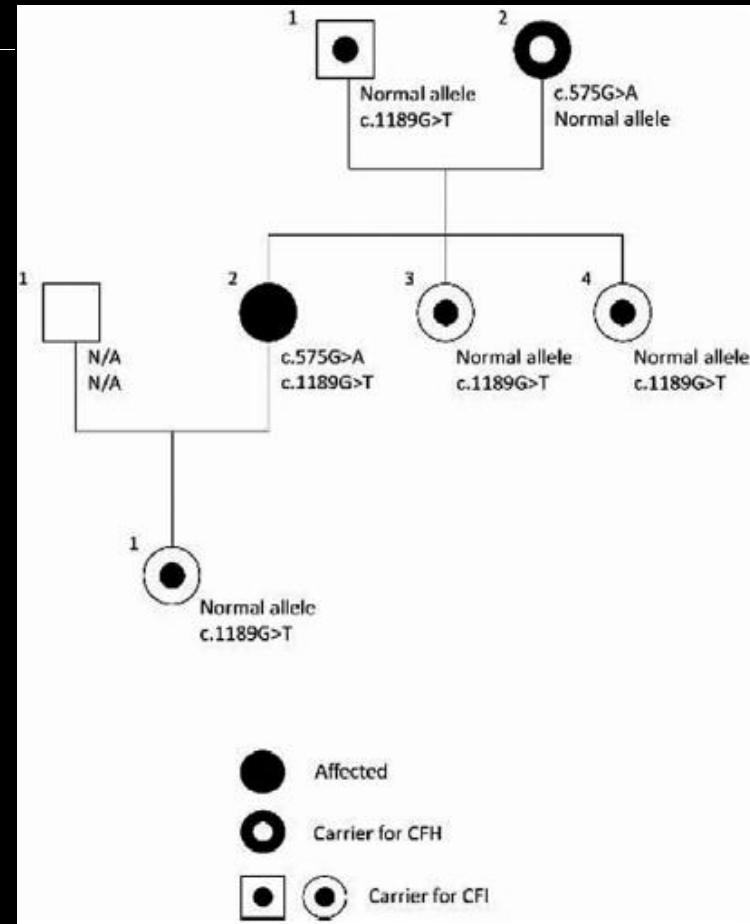
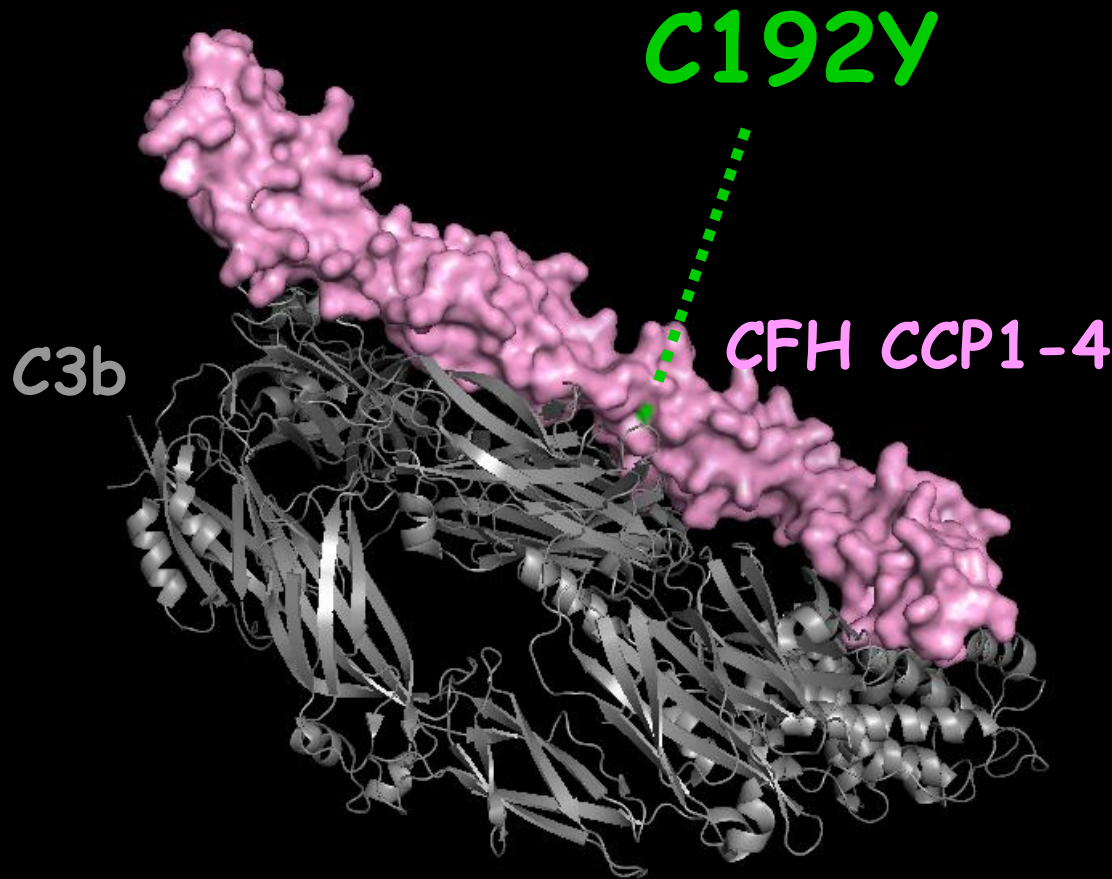
CFH CCP8 (Exon 11): Heterocigota c.1419G>A, A473A

CFH CCP11 (Exon 14): Heterocigota c.2016A>G, Q672Q

1 variante silente (significado desconocido):

- CFH CCP5 (Exon 7): Heterocigota c.849A>G, K302K

(Modificado de Wu *et al.*, 2009)



Cys192 está localizado en el dominio CCP3 de CFH:
implicado en el binding a C3b

BASES DEL TRATAMIENTO EN PACIENTES AGUDOS

- **Recambio plasmático-PF: Beneficios**

- Remover anticuerpos (anti-ADAMTS13 or anti-FH) y otros inhibidores (plasmina, IL6, Hb libre, trombina, etc.)
- Infundir ADAMTS13 and reguladores del complemento
- Remover moléculas trombogénicas y anti-fibrinolíticas
- Beneficio en el SUHa es controvertido



Primera línea de tratamiento en todos los pacientes PTT/SUHa

- **INMUNOSUPRESIÓN**

- Corticoides
- Rituximab
- Nuevas terapias: Anti – VWF nanobody: ALX-0081; ARC1779; ADAMTS13r
Eculizumab.

Respuesta al recambio plasmático en 142 ptes PTT/SUH

Relación con el nivel de ADAMTS13

ADAMTS13 (basal)	<5% (N=18)	5-9% (N=7)	10-25% (N=23)	>25% (N=94)
% Respuesta	89	71	39	60

PF es beneficiosa aún en pacientes con ADAMTS13 normal

Resumen

COSTOS DE LAS NUEVAS TERAPIAS: necesitamos parámetros más específicos que nos ayuden a identificar aquellos pacientes que realmente se beneficiarían con estos tratamientos.

*Todos los involucrados en el cuidado agudo de estos pacientes deberían hacer un esfuerzo extra para obtener y guardar muestras de **plasma citratado** –rotulado- para medir **ADAMTS13**.*

*Si la sospecha de SUHa es firme: guardar **suero** y **plasma obtenido con EDTA***