



# Diagnòstic integrat en eritropatologia: Membranopaties

**María del Mar Mañú Pereira**  
**Vall d'Hebron campus – Rare anaemia research area**  
**ERN-EuroBloodNet Scientific Director**

[mar.manu@vhir.org](mailto:mar.manu@vhir.org)



## Hematíe: estructura y función

### ❖ Función principal:

- Transporte de  $O_2$



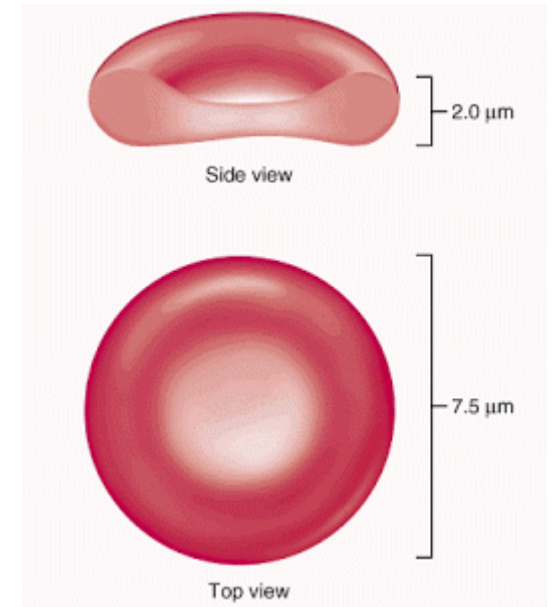
### ❖ Adaptaciones:

- **Hemoglobina**: pigmento rojo con capacidad de unión al  $O_2$
- Ausencia de núcleo y orgánulos: liberar espacio
- **Metabolismo reducido y limitado**
- Forma bicóncava: ratio superficie / volumen  $\uparrow$ : facilita la difusión de  $O_2$
- **Membrana celular** altamente flexible: permite paso por capilares

### Dimensiones

Diámetro	6-8 $\mu\text{m}$
Grosor	2,0 $\mu\text{m}$
Volumen	80-100 fL

**Vida media: 120 días**



# INTRODUCCIÓN

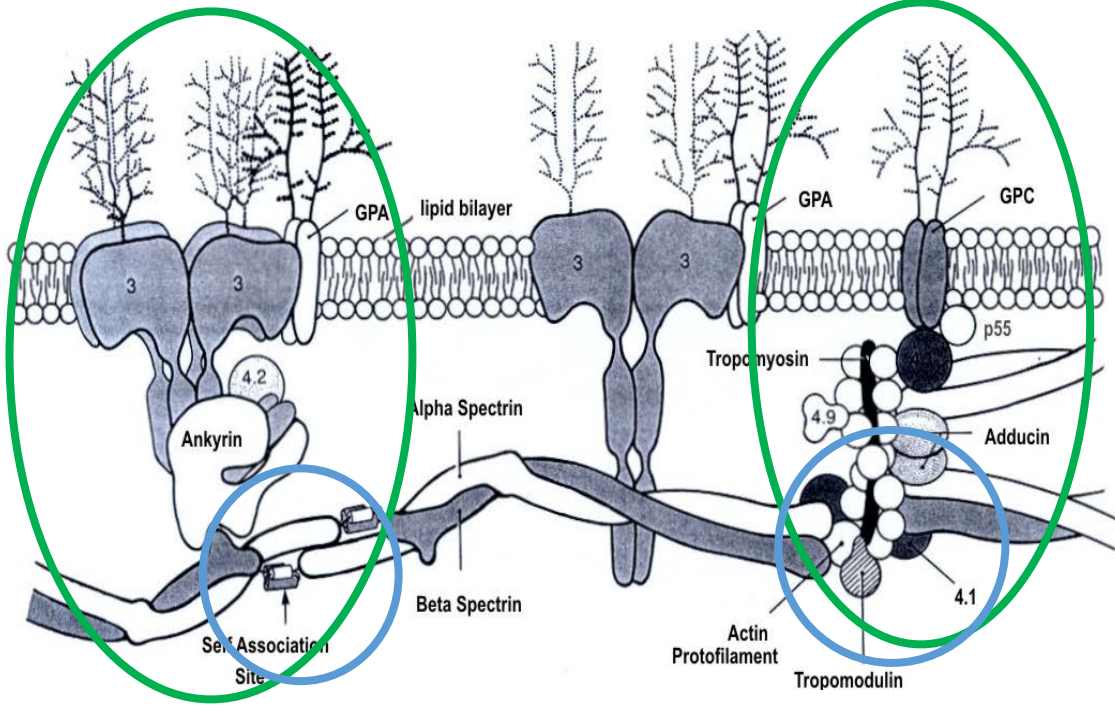


## Membrana eritrocitaria

### Características mecánicas:

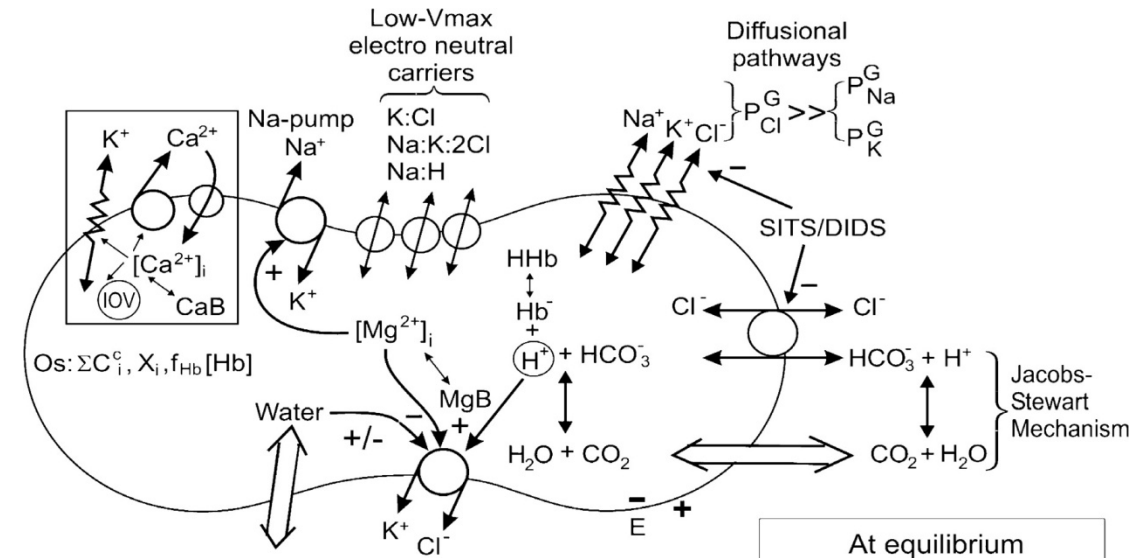
#### Complejo ankirina

#### Complejo 4.1R



Esqueleto espectralina / actina

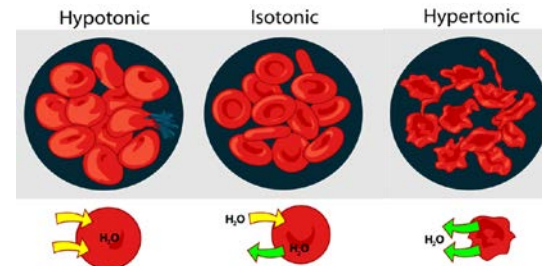
### Homeostasis iónica:



At equilibrium

$$r = \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i} = \frac{[HCO_3^-]_o}{[HCO_3^-]_i} = \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o}$$

$$E = -\frac{RT}{F} \ln(r) \approx -10 \text{ mV}$$



# INTRODUCCIÓN

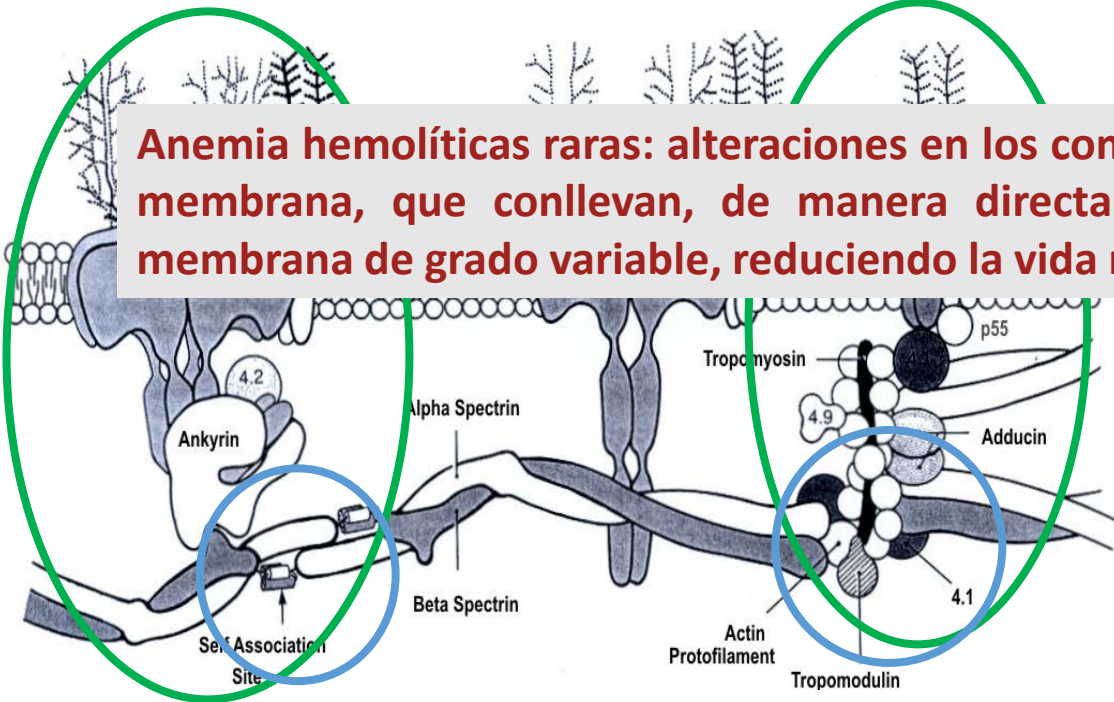


## Membrana eritrocitaria

### Características mecánicas:

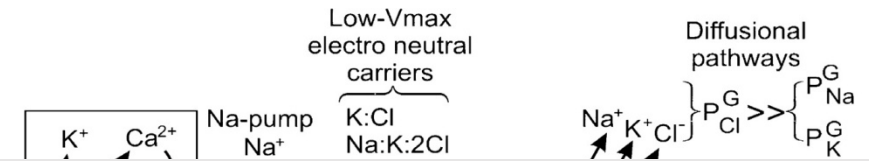
#### Complejo ankirina

#### Complejo 4.1R

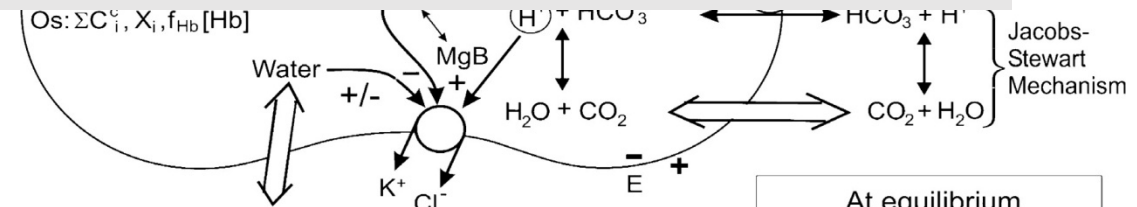


Esqueleto espectralina / actina

### Homeostasis iónica:



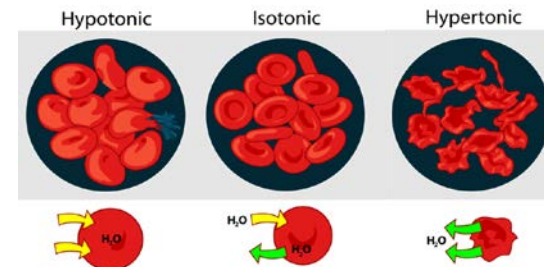
**Anemias hemolíticas raras: alteraciones en los componentes principales del hematíe, hemoglobina, enzimas o membrana, que conllevan, de manera directa o indirecta, una alteración en la deformabilidad de la membrana de grado variable, reduciendo la vida media del hematíe**



At equilibrium

$$r = \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i} = \frac{[HCO_3^-]_o}{[HCO_3^-]_i} = \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o}$$

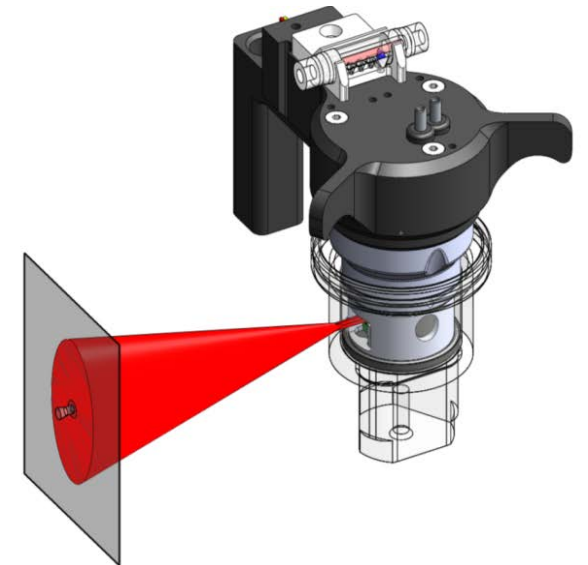
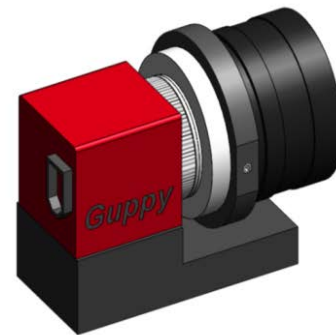
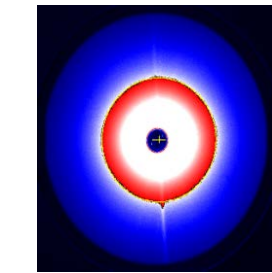
$$E = -\frac{RT}{F} \ln(r) \approx -10 \text{ mV}$$





## Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer – LORRCA

- ❖ Ectacitometría: Caracterización de las poblaciones eritrocitarias según su comportamiento reológico
- ❖ Lorca: Mide la deformabilidad eritrocitaria bajo tensión de cizalladura en un flujo de Couette.
  - Copa-cono con dos cilindros: 1 interno estacionario y 2 externo transparente que rota sobre el primero que contienen una dilución de hematíes en suspensión en un medio viscoso
  - Rayo laser rojo se proyecta desde el cilindro interior a través de la suspensión de hematies, y el patrón de difracción resultante, más o menos circular o elíptico, se proyecta sobre una pantalla blanca
  - La imagen es capturada por una cámara de video CCD, digitalizada y analizada mediante un software específico





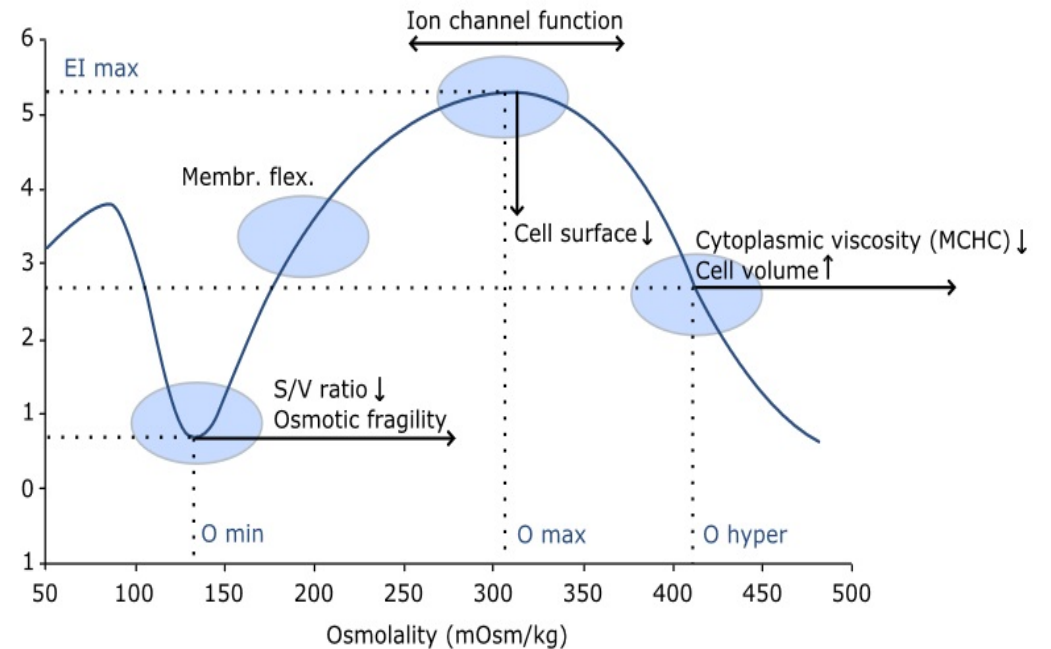
## Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer – LORRCA



Copyright © 2014 RR  
Mechatronics

❖ Los hematíes son sometidos a un gradiente osmótico en aumento (80 – 550 mOsmol/L) bajo una fuerza de cizalladura constante (<30 Pa)

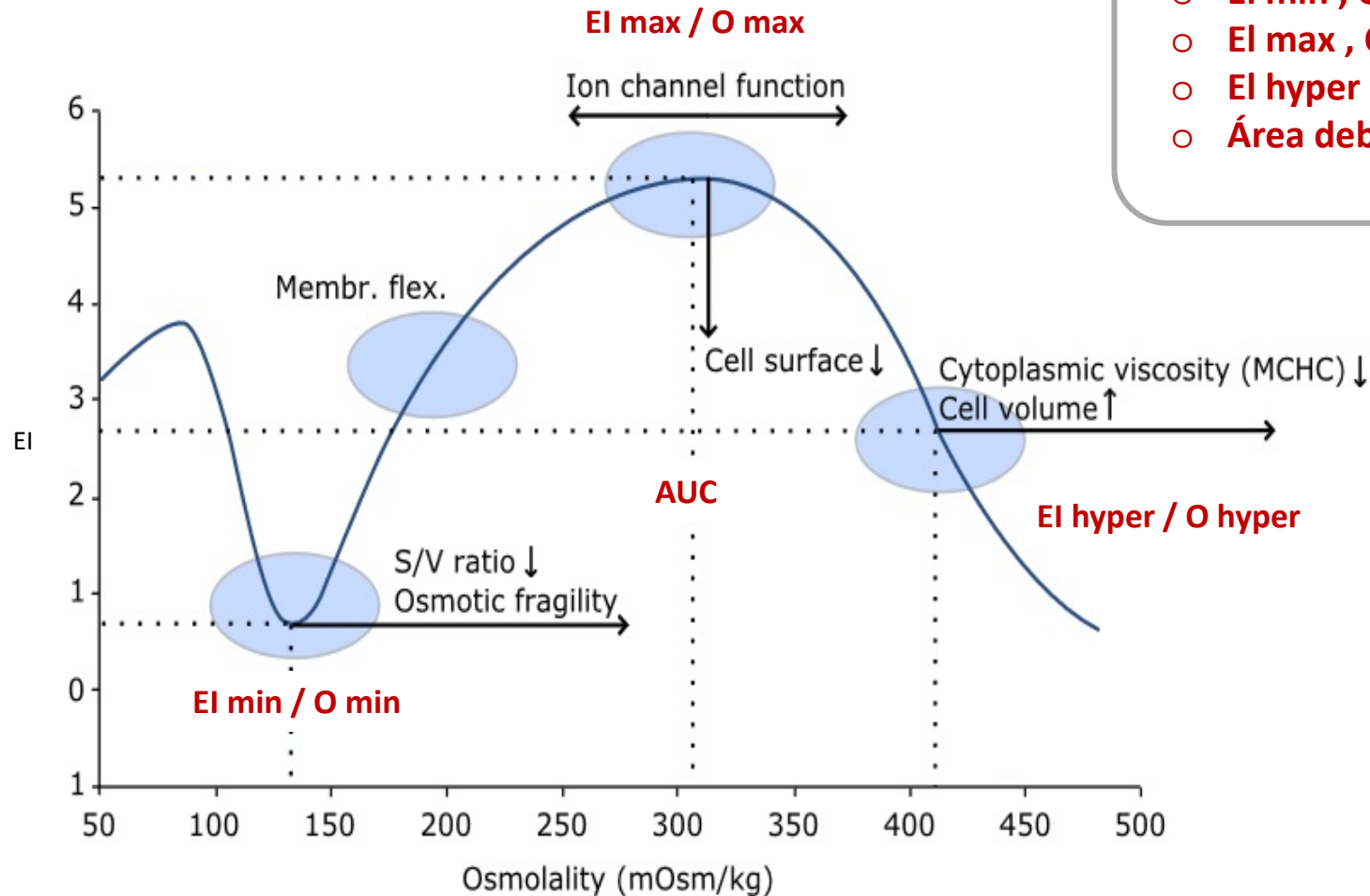
- ❖ Deformabilidad
- ❖ Osmoscan
- ❖ Agregación





## Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer – LORRCA

### Módulo Osmoscan



- **EI min , O min** : Resistencia osmótica
- **EI max , O max** : Deformabilidad
- **EI hyper , O hyper** : Estado de hidratación
- **Área debajo de la curva**



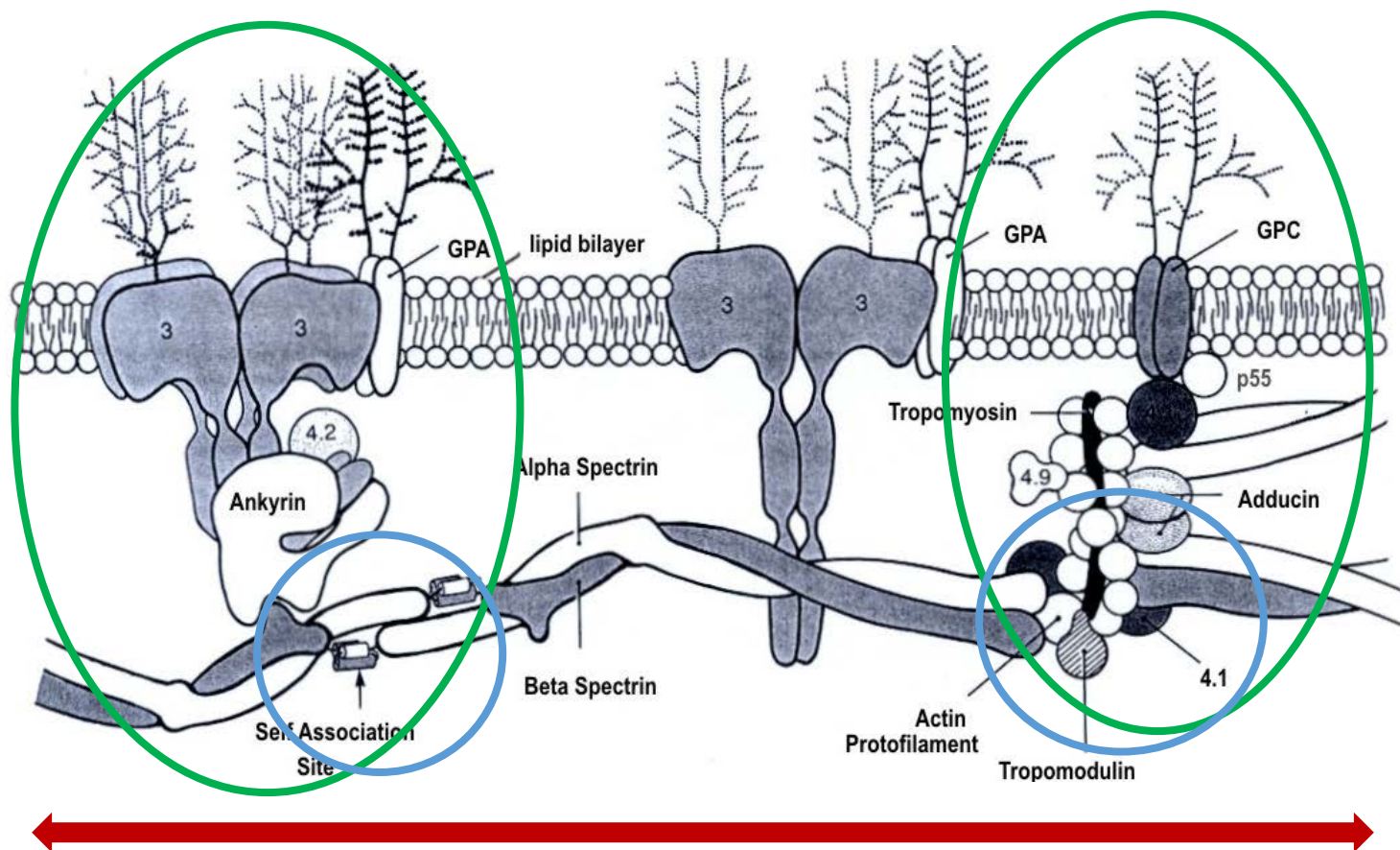
## Aplicación del LoRRCa

**Diagnóstico** de anemias hemolíticas debidas alteraciones de la membrana y/o homeostasis iónica





## Membrana eritrocitaria



- Pérdida de cohesión
- Formación vesículas lipídicas
- Pérdida superficie de membrana
- **Esferocitos**

- Disminución de la estabilidad de la membrana
- Alteración de la deformabilidad de membrana
- **Eliptocitos**

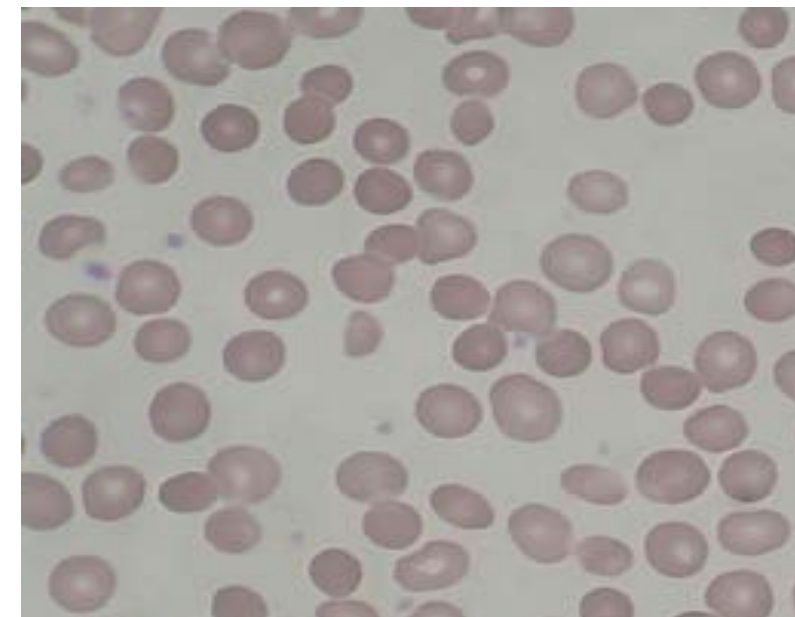


## Esferocitosis Hereditaria - HS

- ❖ Anemia hemolítica: reticulocitosis, ictericia y esplenomegalia
- ❖ Frecuencia: 3-5 de cada 10000 individuos
- ❖ 75% Autosómica dominante – 25% Autosómica recesiva

<b>Ankyrina</b>	<b>50-60%</b>
<b>Espectrina</b>	<b>20%</b>
<b>Banda 3</b>	<b>15-20%</b>
<b>Proteína 4.2</b>	<b>&lt;5%</b>
<b>Complejo Rh</b>	<b>&lt;1%</b>

- ❖ Guidelines 2012 para el dx:
  - 1) Historia familiar compatible (AD)
  - 2) Anemia hemolítica CHCM >36g/dL
  - 3) % eritrocitos hiperdensos > 4%
  - 4) Presencia de esferocitos
- ❖ Si falla alguno de los 4 criterios se deben realizar pruebas de laboratorio:
  - Convencionales:
    - a) Resistencia osmótica eritrocitaria (sensibilidad 68%)
    - b) Glicerol (sensibilidad 61%)
    - c) Pink test (sensibilidad 91%)
    - d) Electroforesis proteínas de membrana SDS-Page



### Alternativa:

- 1) Ectacitometría
- 2) EMA-binding test
- 3) Caracterización genética



### Eliptocitosis hereditaria – HE Piropoiquilocitosis hereditaria - HPP

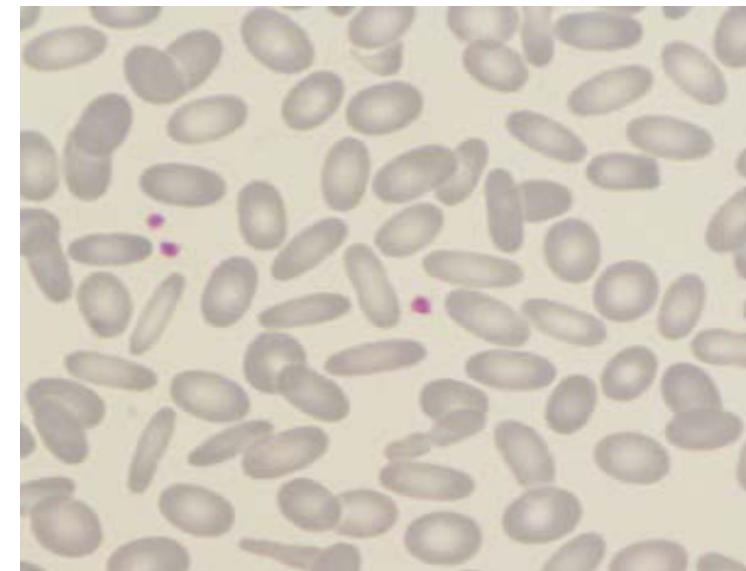
- ❖ Desde portadores asintomáticos a anemia hemolítica con ictericia y esplenomegalia
- ❖ La mayoría HE hallazgo casual – Presencia de eliptocitos en morfología eritrocitaria
- ❖ HPP – Elevada fragmentación - microcitosis (aumento contaje plaquetas)  
Anemia moderada – grave que puede requerir transfusión
- ❖ HE Autosómica dominante. La HPP es la forma Autosómica recesiva

**alpha-Spectrina 65%**

**beta-Spectrina 30%**

**Banda 4.1 5%**

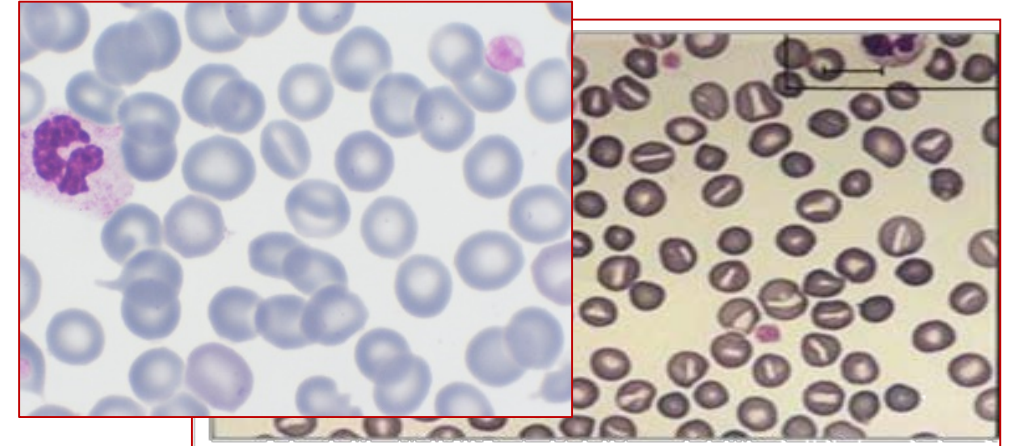
- ❖ Diagnóstico diferencial HE vs HPP NO en etapa neonatal (<1 año) – HbF – Incremento de 2,3 DPG – desestabiliza complejo actina-espectrina-proteína 4.1 – Inestabilidad de membrana





## Estomatocitosis hereditaria - HSt

- ❖ Expresión clínica de asintomático a anemia hemolítica grave
- ❖ Desequilibrio en el balance Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>
  - Contenido intracelular alterado
  - Alteraciones en el volumen eritrocitario - Contenido de H<sub>2</sub>O
- ❖ Herencia Autosómica dominante



### 1. Estomatocitosis deshidratada o Xerocitosis - HDSt

- Más frecuente
- Pérdida de contenido K<sup>+</sup> y H<sub>2</sub>O
- MCHC incrementado (>36 g/dL)
- Anemia leve a moderada
- Estomatocitos y dianocitos en RN
- Proteína PIEZO1 - canal iónico mecanosensible

### 2. Estomatocitosis hiperhidratada - HOSt

- 20 casos descritos
- Fenotipos más graves
- Anemia hemolítica macrocítica >110 fL (hasta 150 fL)
- MCHC disminuido (24 a 30 g/dL)
- RhAG - transportador de amonio

En ambas la esplenectomía está completamente contraindicada – Importante diagnóstico diferencial con otras membranopatías.



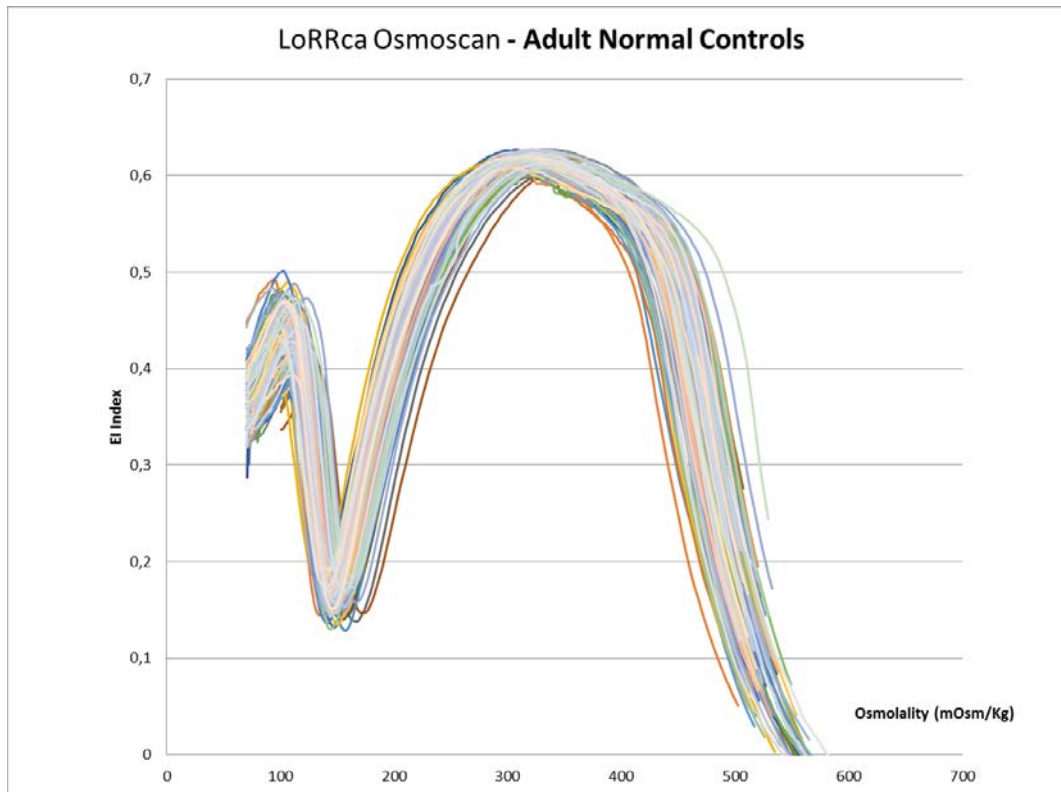
## Estudio – 2015 - Actualidad

### 210 muestras: controles / pacientes:

- 137 controles adultos normales
- 13 controles recién nacidos normales
- 60 pacientes membranopatias adultos
  - 51 Esferocitosis hereditaria (HS)
  - 5 Eliptocitosis hereditaria /  
Piroikilocitosis hereditaria ( HE/ HPP)
  - 4 Xerocitosis hereditaria (HDSt)



## Valores de referencia – Controles adultos normales (137)



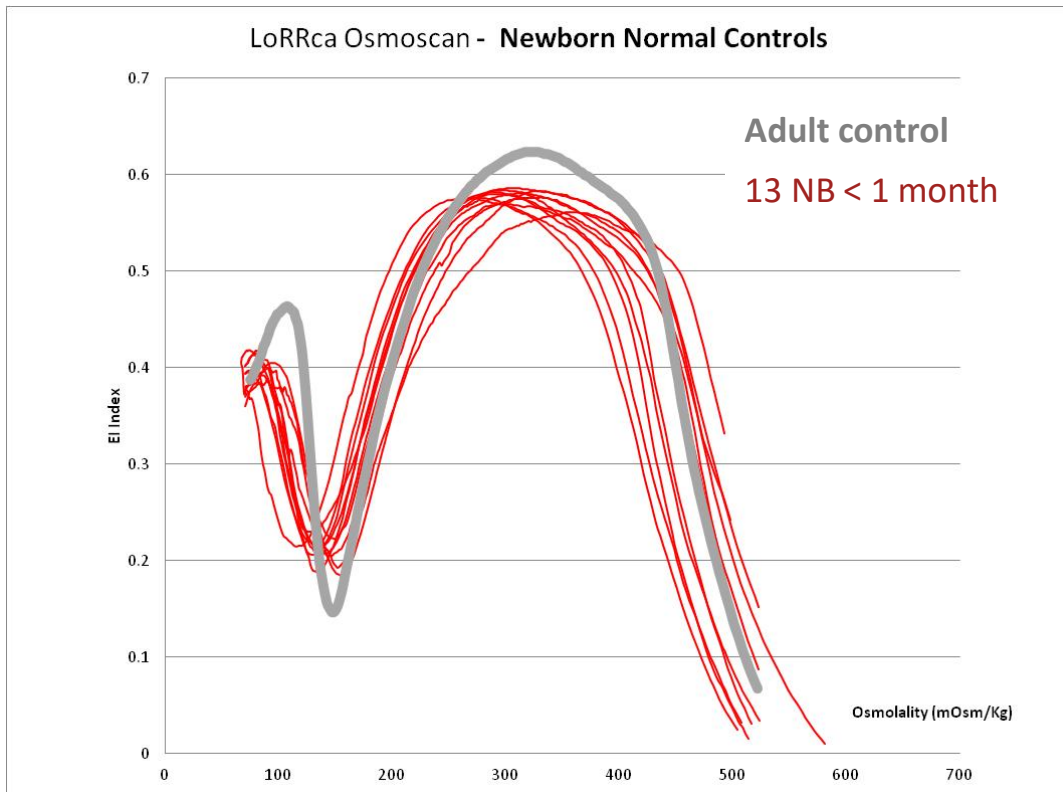
N= 137	MEAN	SD	M-2SD	M+2SD
EI min	0.171	0.018	0.135	0.208
O min	152.4	8.122	136.1	168.6
EI max	0.616	0.006	0.603	0.628
O max	320.0	13.452	293.1	346.9
EI hyper	0.307	0.003	0.301	0.314
O hyper	477.2	13.993	449.2	505.2
AUC	169.6	6.723	156.2	183.0

- **EI min:** **0.135 – 0.208**
- **O min :** **136.1 – 168.6**
- **EI max :** **0.603 – 0.628**
- **O max :** **293.1 – 346.9**
- **EI hyper :** **0.301 – 0.314**
- **O hyper :** **449.2 – 505.2**
- **AUC :** **156.2 – 183.0**



## Valores de referencia – Controles recién nacidos \* normales

\* Recién nacidos : < 1 mes



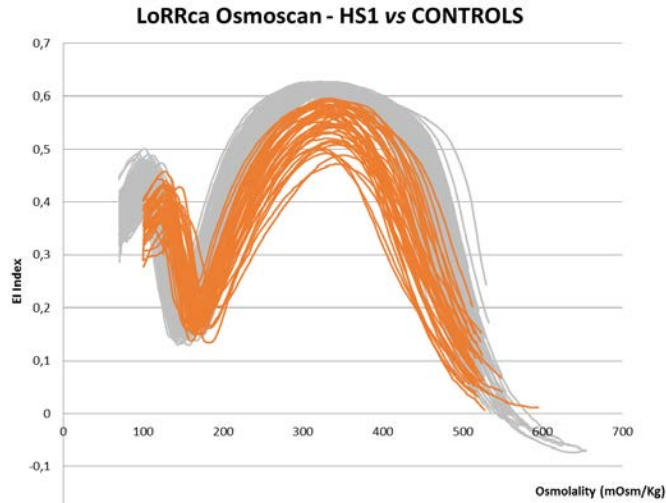
N= 13	MEAN	SD	M-2SD	M+2SD
EI min	0.201	0.017	0.166	0.235
O min	137.9	10.0	117.9	158.0
EI max	0.582	0.012	0.558	0.607
O max	304.9	24.0	256.9	352.9
EI hyper	0.291	0.006	0.279	0.303
O hyper	456.8	22.3	412.1	501.4
AUC	160.9	7.0	146.9	174.9

- **EI min:** **0.166 – 0.235**
- **O min :** **117.9 – 158.0**
- **EI max :** **0.558 – 0.607**
- **O max :** **256.9 – 352.9**
- **EI hyper :** **0.279 – 0.303**
- **O hyper :** **412.1 – 501.4**
- **AUC - Area:** **146.9 – 174.9**



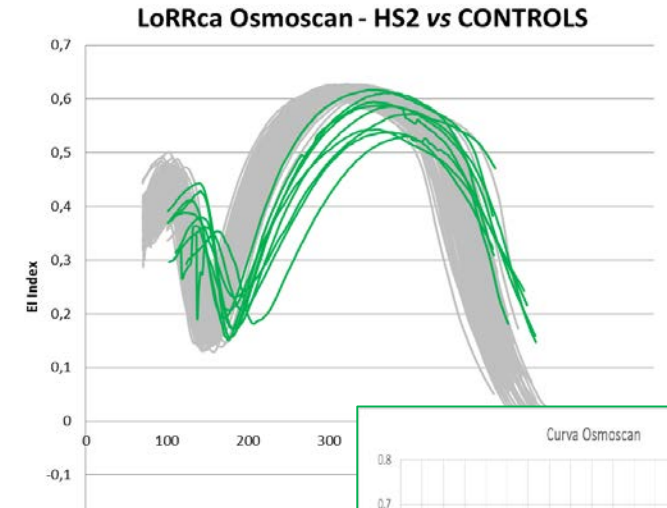
## Perfiles membranopatías: Esferocitosis hereditaria (n=51)

Perfil 1 (n=42)

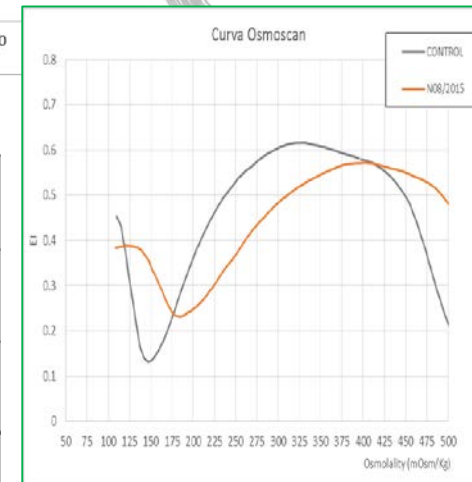
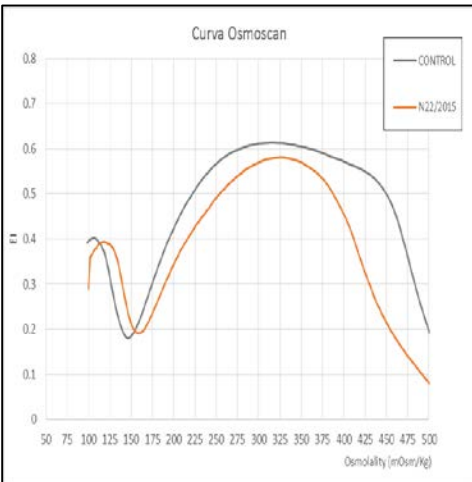


↑ O min  
↑ O max  
↑ O hyper

Perfil 2 (n=9)



↑ O min  
↓ EI max / EIhyper  
↓ AUC



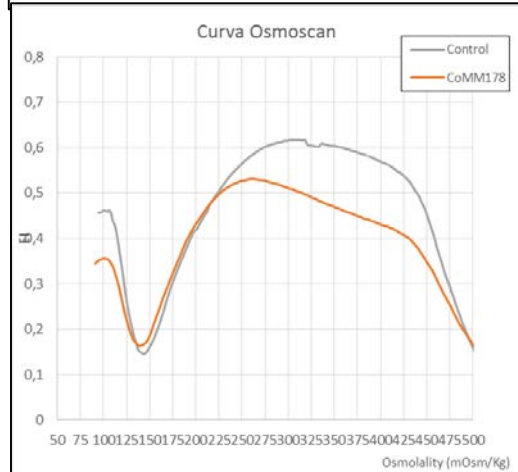
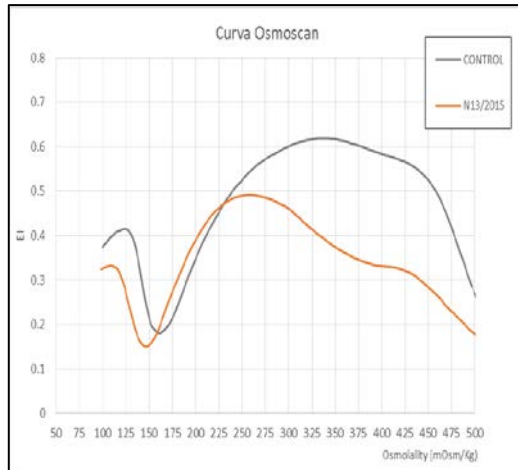
t-Test: IC 95%	EI min	O min	EI max	O max	EI hyper	O hyper	AUC
<b>p CTR versus HS 1</b>	<b>0.0317</b>	<b>2.12E-17</b>	<b>6.69E-15</b>	<b>1.094E-10</b>	<b>5.46E-15</b>	<b>2,65E-8</b>	<b>3.34E-23</b>
<b>P CTR versus HS 2</b>	0.088	<b>3.56E-6</b>	<b>0.006</b>	<b>8.69E-6</b>	<b>0.006</b>	<b>1.41E-5</b>	<b>0.0011</b>
t-Test: IC 95%	EI min	O min	EI max	O max	EI hyper	O hyper	AUC
<b>p HS1 versus HS2</b>	0.338	<b>0.002</b>	0.097	<b>0.000117</b>	0.094	<b>5.10E-07</b>	<b>0.0061</b>



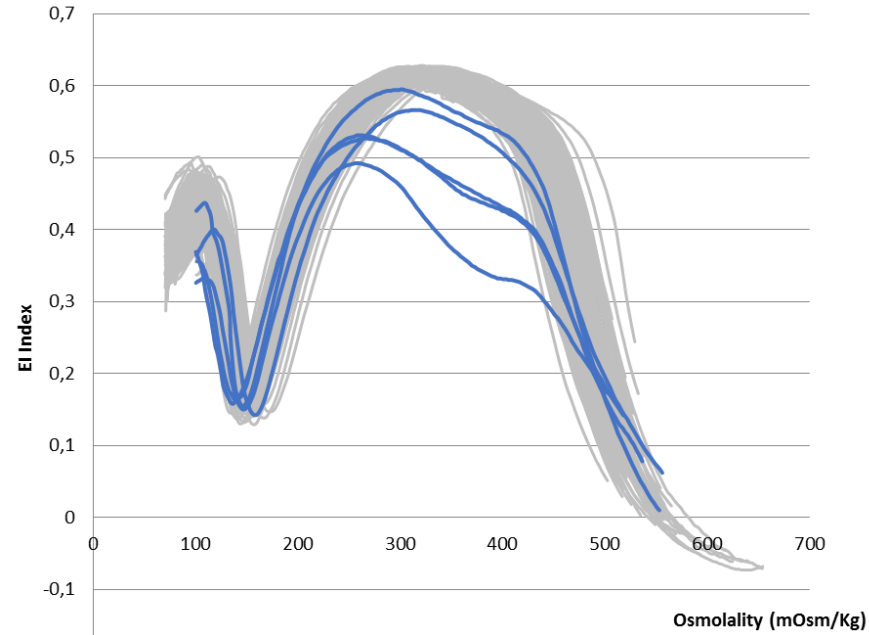


## Perfiles membranopatías

Eliptocitosis hereditaria/ Piropoiquilocitosis hereditaria (n=5)



LoRRca Osmoscan - HE vs CONTROLS



Perfil forma trapezoidal

↓ EI max / EI hyper

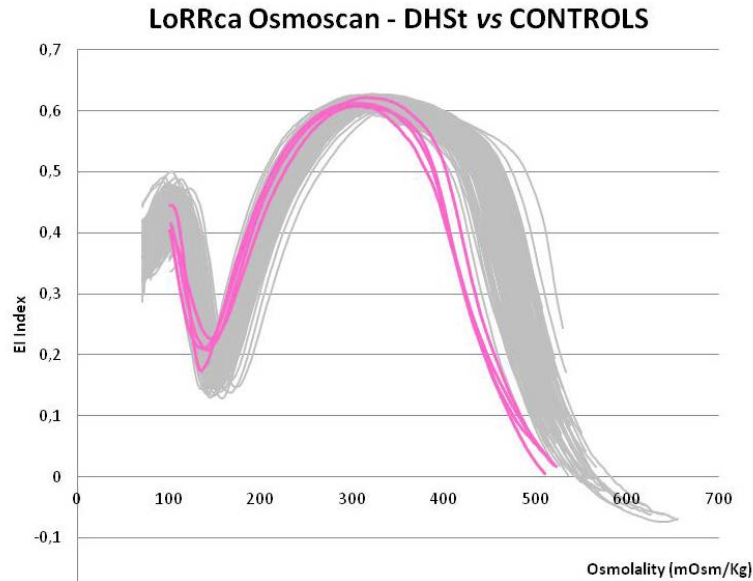
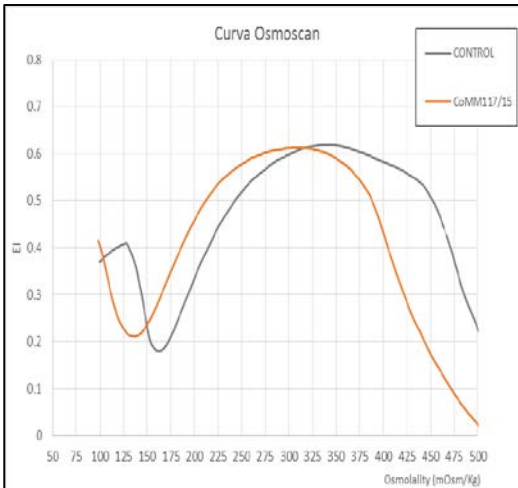
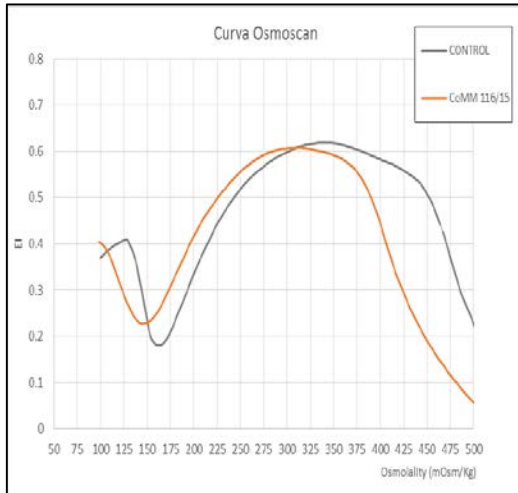
<b>EI min:</b>	0.137 – 0,174	<b>EI hyper :</b>	0.232 – 0.310
<b>O min :</b>	130.8 – 163.2	<b>O hyper :</b>	465.2 – 478.0
<b>EI max :</b>	0.463 – 0.621	<b>AUC :</b>	120.0 – 174.3
<b>O max :</b>	228.1 – 332.3		

t-Test: IC 95%	EI min	O min	EI max	O max	EI hyper	O hyper	AUC
<b>p CTR versus HE</b>	<b>0.0178</b>	0.2574	<b>0.0144</b>	<b>0.0277</b>	<b>0.0143</b>	0.328	<b>0.0211</b>



## Perfiles membranopatías

### Xerocitosis hereditaria (n=4)



↓ Ohyper

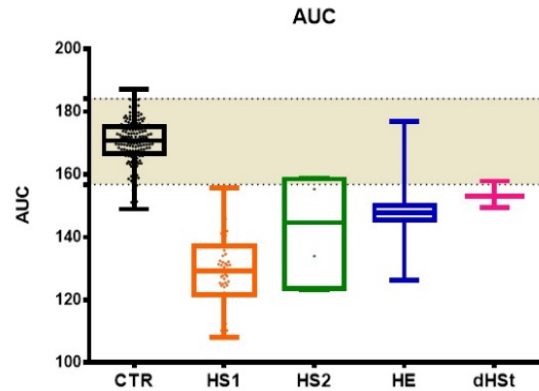
<b>EI min:</b>	0,170 – 0.244	<b>EI hyper :</b>	0.301 – 0.313
<b>O min :</b>	133.6 – 147.9	<b>O hyper :</b>	413.6 – 434.9
<b>EI max :</b>	0.601 – 0.627	<b>AUC :</b>	145.8 – 160.1
<b>O max :</b>	296.9 – 321.1		

	EI min	O min	EI max	O max	EI hyper	O hyper	AUC
<b>p CTR versus DHSt</b>	<b>0.0315</b>	<b>0.0045</b>	0.732	<b>0.0285</b>	0.723	<b>1.40E-08</b>	<b>0.0009</b>

# RESULTADOS: HS Osmoscan discriminating parameters

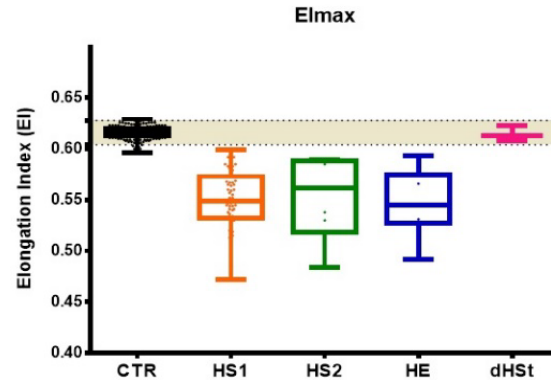


**ROC curve analysis: HS versus non-HS**



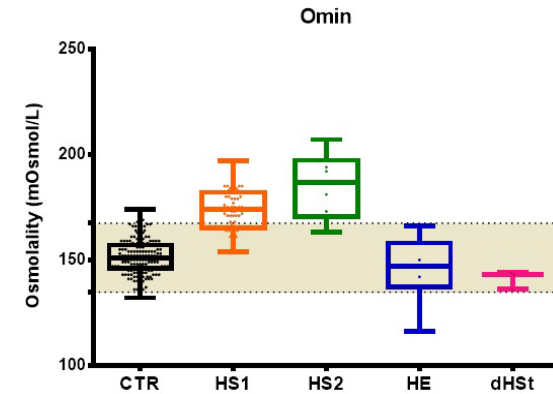
ROC analysis: AUC 0.9903;  $p < 0.0001$   
 Cut-off  $< -14.9\%$  (sensitivity 86.15%, specificity 99.45%)

**HS vs controls and HS vs dHSt**



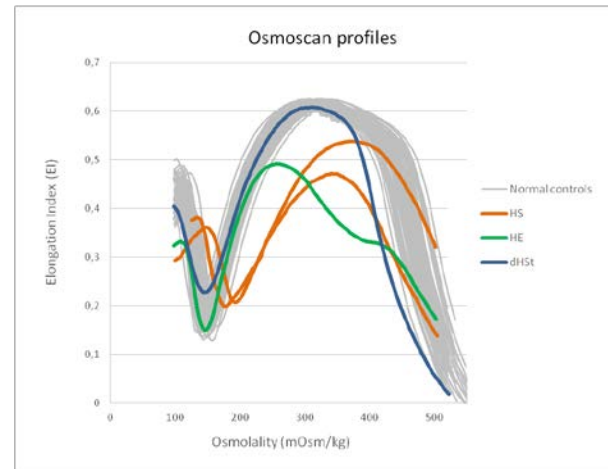
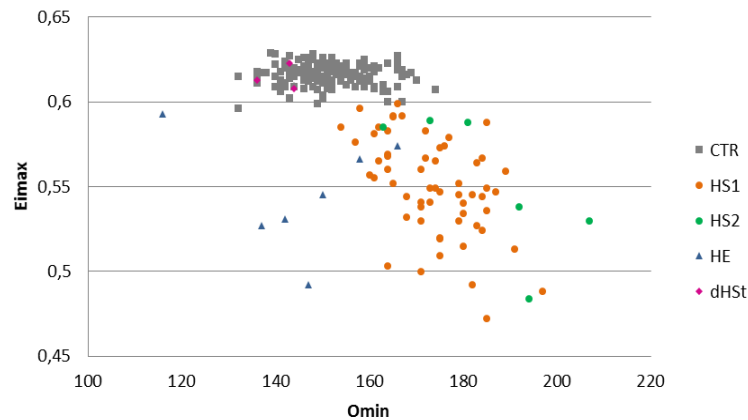
ROC analysis: AUC 0.9998,  $p < 0.0001$   
 Cut-off  $< -3\%$  (sensitivity 98.46%, specificity 99.42%)

**HS vs HE**



ROC analysis: AUC 0.959,  $p < 0.0001$   
 Cut-off  $> 5.2\%$  (sensitivity 95.38%, specificity 85.71%)

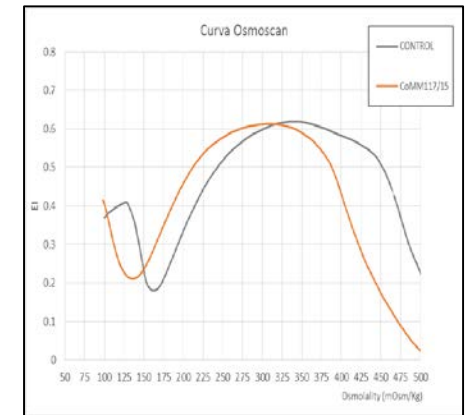
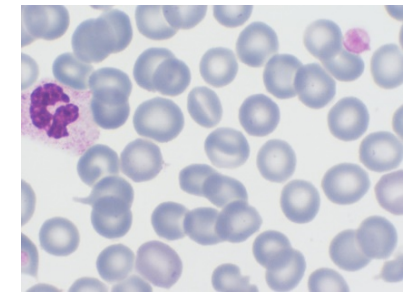
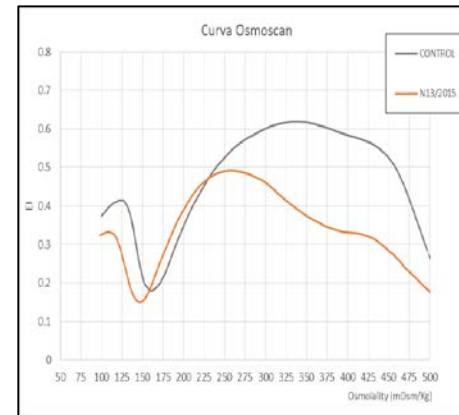
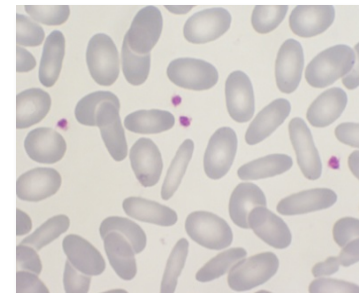
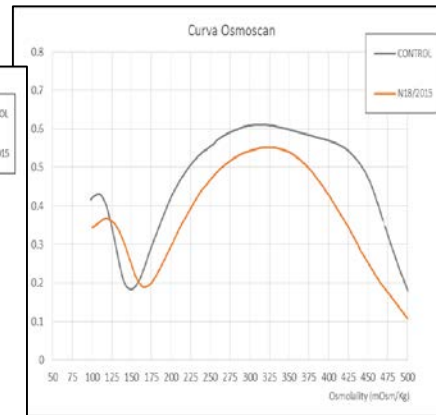
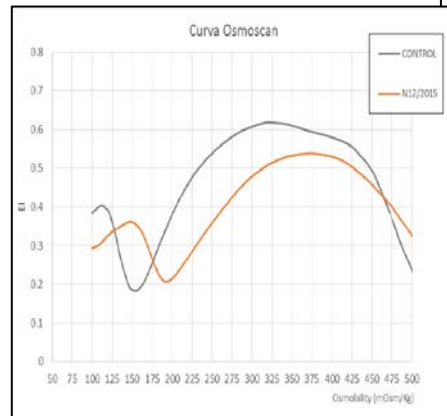
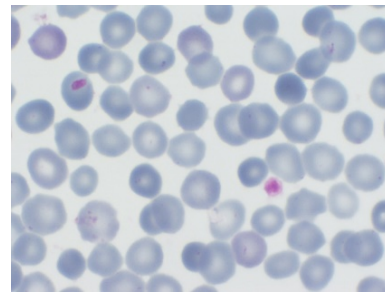
**Elmax/Omin**



This combination of parameters (**Elmax  $< -3\%$  and Omin  $> 5.2\%$** ) was used as criteria to classify all the 246 samples included in the present study, and the result showed 62 samples detected as HS. Of the 62 patients classified as HS, 61 were actually HS (**specificity 98.38%**) and 1 was an HE. 4 HS patients were classified in the no-HS group (**sensitivity 93.85%**)

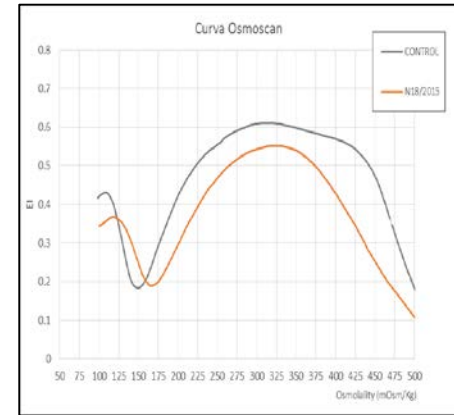
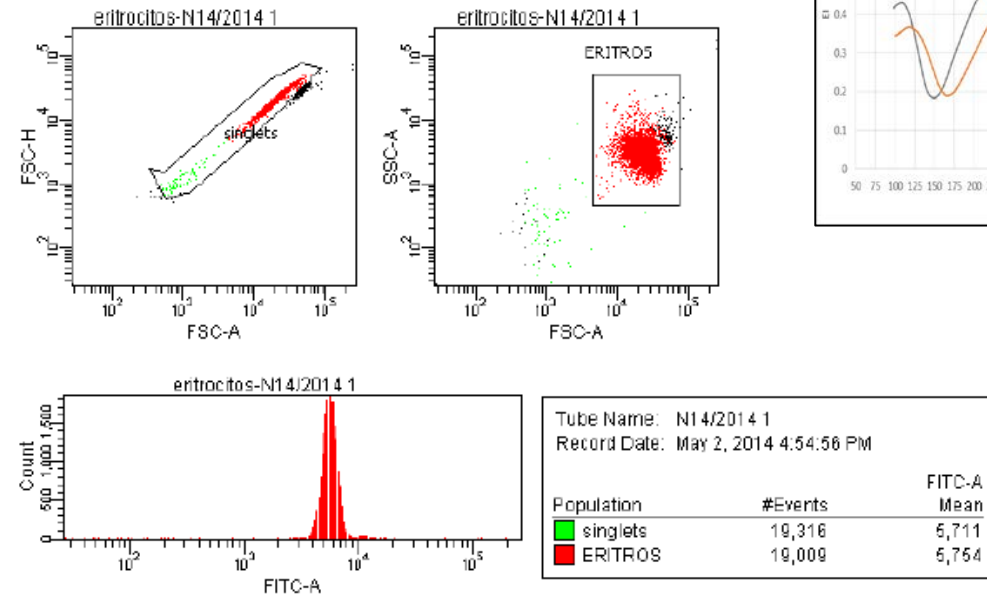
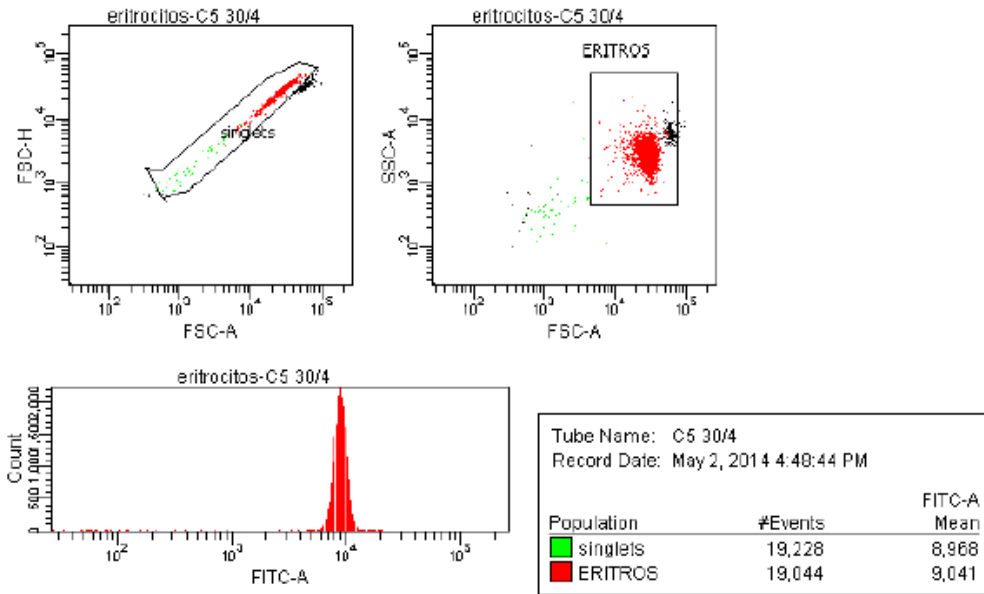


La ectacitometría de gradiente osmótico es una técnica muy específica que permite el diagnóstico diferencial entre la esferocitosis, eliptocitosis/ piropoiquilocitosis y la xerocitosis hereditarias gracias a los perfiles característicos que ofrece para cada entidad patológica.





## Cuantificación de Banda 3-EMA mediante citometría de flujo



Diagnóstico: % de disminución de fluorescencia – Banda 3

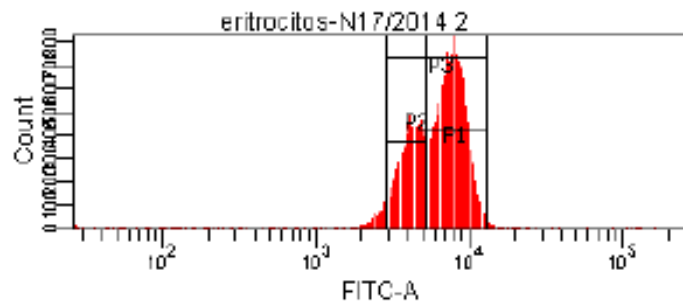
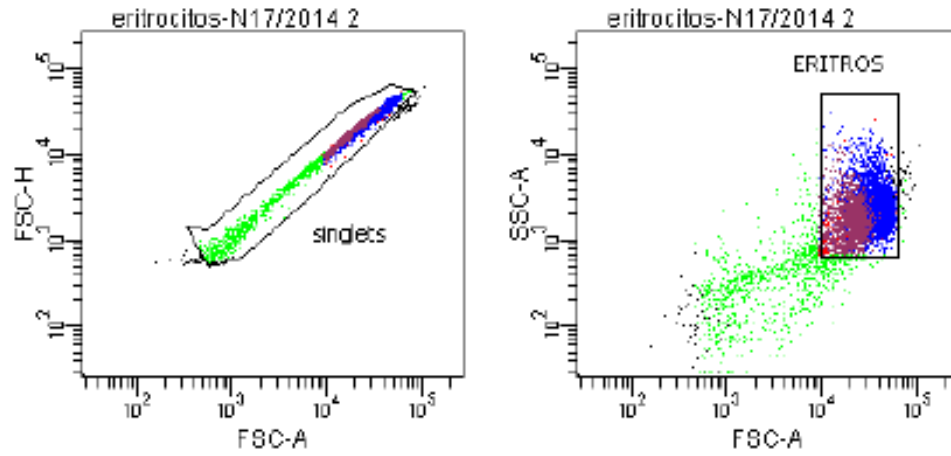
- > 21% Esferocitosis hereditaria
- 11-21% Membranopatía (Eliptocitosis hereditaria)
- < 11% Negativo

# Ema-binding test



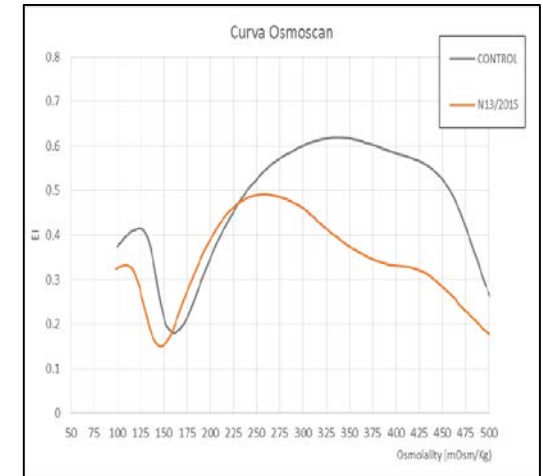
Cuantificación de Banda 3-EMA mediante citometría de flujo

Piropoiquilocitosis hereditaria



Tube Name: N17/2014 2  
Record Date: May 9, 2014 1:25:17 PM

Population	#Events	FITC-A Mean
■ singlets	21,957	6,087
■ ERITROS	18,346	6,688
■ P1	12,077	7,911
■ P2	5,631	4,124
⊠ P3	17,668	6,693





## Caracterización genética – Colaboración CNAG

Estudio genético mediante panel NGS –  

ANEMIA: 35 GENES CAUSING RCHA AND CDA				
<b>MEMBRANE</b>				
ANK1	EPB41	EPB42	SLC4A1	SPTA1
PIEZO1	KCNN4	RHAG		
<b>ENZYMES</b>				
ADA	AK1	ALDOA	BPGM	CYB5A
G6PD	GCLC	GPI	GSS	HK1
NT5C3A	PFKM	PGK1	PKLR	TPI1
<b>HAEMOGLOBIN</b>				
HBA1	HBA2	HBB		
<b>CDA</b>				
CDAN1	C15orf41	SEC23B	KLF1	GATA1
KIF23				

- 35 genes identificados como causantes de anemia hemolítica
- 36 genes nuevos candidatos o moduladores de la variabilidad clínica



## 1- Criteria for clinical orientation:

- Clinical manifestations
- CBC parameters
- Morphology

## 2- Phenotyping tests:

- EMA- binding tests,
- Osmotic gradient ektacytometry (LoRRca MaxSis)
- Enzyme quantification assay

## 3- t-NGS

		n.Pt	CONCLUSIVE DIAGNOSIS					NO CONCLUSIVE DIAGNOSIS
			HS	HS + ENZYME	HE/HPP	HSt	HBA	
CLINICAL ORIENTATION	<b>HS</b>	43	36	5				2
	HS 4 criteria met	5	5					
	HS 3 criteria met	10	9	1				
	HS 2 criteria met	17	11	4				2
	HS 1 criteria met	11	11					
	<b>HE/HPP</b>	6			5			1
	<b>HSt</b>	1				1		
	<b>CNSHA</b>	3				1	1	1
	<b>COMPENSATED HEMOLYSIS</b>	1					1	





## 43 cases were oriented as HS

	Clinical Orientation	EMA		LoRRca		HS confirmed diagnosis
	CBC parameters and morphology	Positive HS	Sensitivity	Positive HS	Sensitivity	NGS
HS (4)	5	5	100%	5	100%	5
HS (3)	10	8	80%	10	100%	10
HS (2)	17	15	93%	17	100%	15
HS (1)	11	8	73%	11	100%	11
<b>Total</b>	43	36	85%	43	100%	41

- 5 met the 4 HS criteria and EMA BT, LoRRca and t-NGS confirmed the diagnosis.
- Of the remaining 38 patients
  - ✓ EMA BT was HS positive in 31 cases, 30 of them were confirmed after t-NGS
  - ✓ 6 from the 7 HS negative EMA BT were false negative
  - ✓ LoRRca showed HS curve in all the cases and only two of them were not confirmed after NGS
  - ✓ T-NGS confirmed the diagnosis in 36 cases and 5 patients showed also a disease causing variant on RBC enzymes
  - ✓ 2 patients remain undiagnosed



- Establishing an integrative harmonized diagnostic algorithm from the clinical orientation to the final diagnosis, including LoRRca and t-NGS has been revealed essential for high diagnosis performance and reduce misdiagnosis. **92% of the patients included in this study were diagnosed and only 8% of the patients stay undiagnosed and will be further analyzed by modulators genes and/or WES.**
- **Diagnosis of 85% of HS clinically oriented patients was confirmed by t-NGS.** In this patients LoRRca showed a sensitivity of the **100% for HS (83% for HE) confirming LoRRca as a decisive screening tool in RBC diagnostic workflow for HS patients, but also for HE and dHSt patients.**
- EMA-BT showed a total sensitivity of 85% for HS using >21% of decreased fluorescence as cut-off but the sensitivity is higher decreasing at **>16% the cut-off**
- **t-NGS** confirmed the diagnosis of the 6 HE oriented patients and furthermore allowed the **classification into HE and HPP of the patients.**
- Main issue with NGS analysis is the big number of VUS (variant of uncertain significance) we are facing due to the lack of genetic knowledge on based databases.



## Aplicación del LoRRCa

**Estratificación según gravedad de pacientes afectos  
con enfermedad de células falciformes**

**Inicio precoz de medidas terapéuticas**



**EVIDENCE: ERYTHROCYTES PROPERTIES AND VIABILITY IN DEPENDENCE OF FLOW AND EXTRA-CELLULAR ENVIRONMENT**

**Principal Investigator: María del Mar Mañú Pereira (VHIR)**

**Research Team: David Beneítez (VHIO), Cristina Diaz de Heredia (VHIR), Pablo Velasco (VHIR), Thais Murciano**

**Marie Skłodowska-Curie Actions - Innovative Training Networks (ITN)**

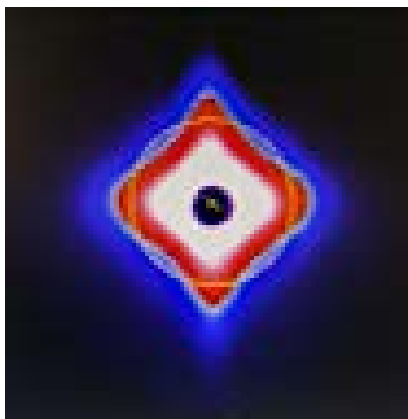
**Starting Date: 1<sup>st</sup> November 2019**

**First patient: Q2 2020**



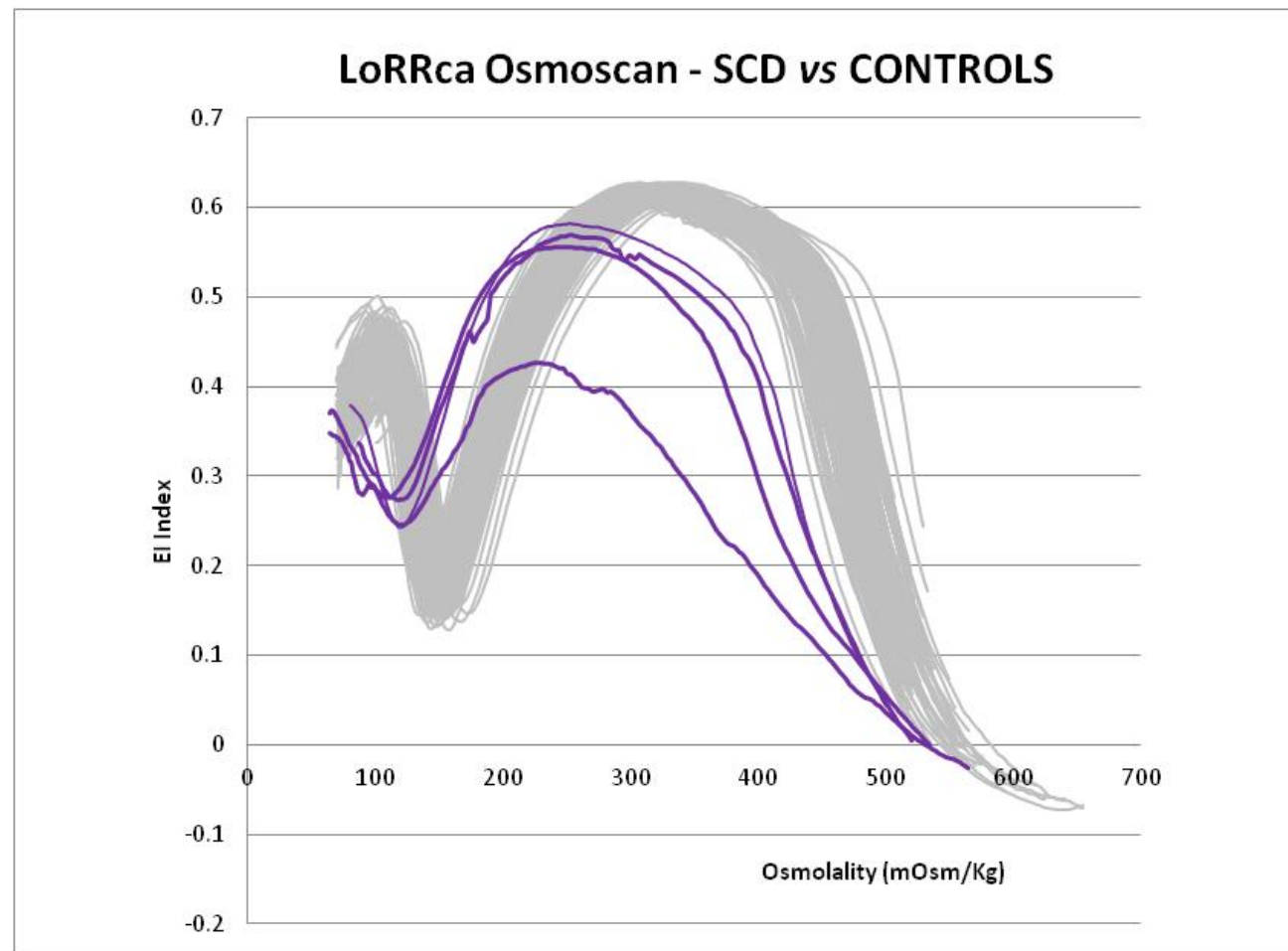


Análisis de **4 pacientes con ECF**



Patrón de difracción de una muestra que contiene combinación de dos poblaciones:

- ❖ Hematíes sanos
- +
- ❖ Hematíes falciformes



## Lorrca European working group for diagnostics – supported by Mechatronics



### Objetivos

- ✓ Establecer protocolo para diagnóstico:
  - ✓ Tipo de muestra, condiciones de almacenamiento y envío
  - ✓ Parámetros de análisis: unidades de viscosidad, corrección para Hb
  - ✓ Interpretación de resultados: Rangos de referencia, valores absolutos o relativos...
- ✓ Control externo de calidad:
  - ✓ Semestral
  - ✓ Parámetros + diagnóstico
- ✓ Nuevas utilidades:
  - ✓ Banco de sangre
  - ✓ Estudios correlación genotipo- fenotipo – SCD, enzimopatías
  - ✓ **Curvas de deformabilidad relativas a ppO2**
  - ✓ Formación de microvesículas

### LoRRca Focus Group:

- Paola Bianchi – IRCCS - Italy
- Lydie Da Costa - H Robert Debre - France
- Béatrice Gulbis – ERASME - Belgium
- Maria del Mar Mañú Pereira – H. Vall d’Hebrón - Spain
- Brigitte van Oirschot – UMCU – The Netherlands
- Richard van Wijk – The Netherlands

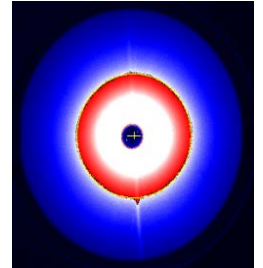
### Mechatronics:

- Jan Buis
- Max Hardeman
- Jan de Zoeten



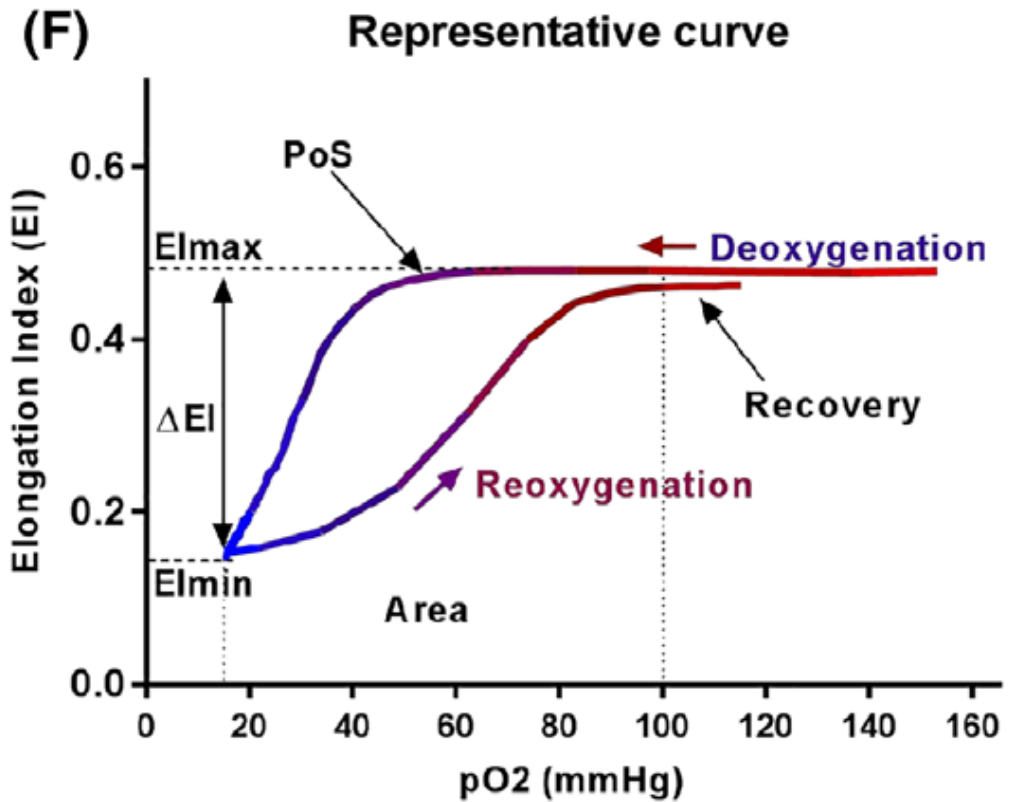
Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer – LORRCA

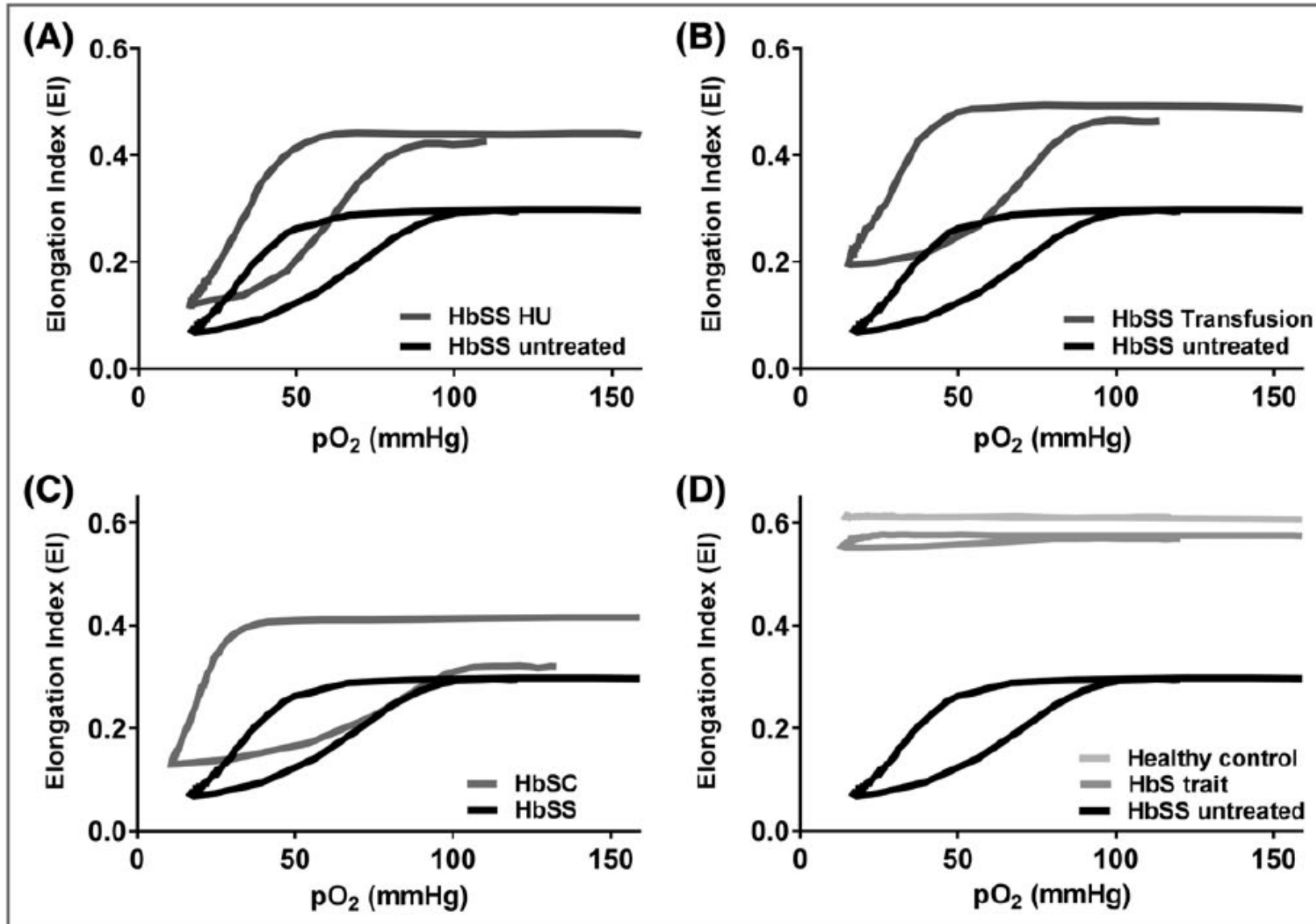
- ❖ Deformabilidad
- ❖ Osmoscan
- ❖ Agregación
- ❖ OxygenScan – R. van Wijk



Copyright © 2014 RR Mechatronics

Deformabilidad eritrocitaria bajo condiciones controladas de pO2







## INTEGRA-SCD: Integrative diagnosis of SCD patients for personalized medicine

### Primary objective:

To assess the prognostic value of LoRRca as biomarker providing information of SCD patients severity

### Endpoint:

Cohort A\_ Newborns diagnosed as SCD by NBS: Time to 1<sup>st</sup> event

Cohort B and C\_ Pediatric and adult SCD Patients: Frequency of events

### Secondary / Exploratory objectives:

To investigate the correlation between LoRRca parameters and SCD patients genetic and phenotypic characterization

### Endpoints:

Intra and inter variation of Oxygenscan parameters in correlation with:

- i.) Genotype and genetic modulators ( 20 genes aprox)
- ii.) Clinical course (number of acute events, acute splenic sequestration, cerebro vascular accident, transcranial doppler)
- iii.) Treatments (hydroxiurea, splenectomy, transfusion)



# Vall d'Hebrón Campus

## HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRÓN (HUVH)

### SERVEI D'HEMATOLOGIA CLÍNICA

#### UNITAT D'ERITROPATOLOGIA I DIAGNÒSTIC INTEGRAT

- David Beneítez (VHIO)
- Ana Ortuño
- Adoración Blanco
- Barbara Tazón (VHIO)

### SERVEI D'ONCOLOGIA I HEMATOLOGIA PEDIÀTRIQVES

- Cristina Diaz de Heredia (VHIR)
- Pablo Velasco (VHIR)
- Thais Murciano
- Mari Luz Uría
- Maribel Benítez
- Laura Murillo
- Laura Alonso

## INSTITUT D'INVESTIGACIÓ VALL D'HEBRÓN (VHIR)

### RECERCA TRANSLACIONAL EN CÀNCER EN LA INFÀNCIA I L'ADOLESCÈNCIA

#### RECERCA EN ANÈMIES MINORITÀRIES

- María del Mar Mañú Pereira
- Victoria Gutiérrez Valle
- Valeria Rizzuto

