

Trasplante de médula ósea exitoso en un caso de linfocitosis hemofagocítica familiar tipo 3

Sucesfull bone marrow transplantation in a case of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3

Gabriela Caicedo-Herrera^a, Estephania Candelo^a, Manuela Olaya^b,
Paola Pérez^b, Diego Medina^b, Harry Pachajoa^{a,b}

^aCentro de Investigaciones en Anomalías Congénitas y enfermedades Raras, Universidad ICESI. Cali, Colombia.

^bFundación Clínica Valle De Lili. Cali, Colombia.

Recibido: 16 de junio de 2020; Aceptado: 7 de septiembre de 2020

¿Qué se sabe del tema que trata este estudio?

La linfocitosis hemofagocítica (HLH), es un síndrome clínico provocado por una respuesta inadecuada del sistema inmunológico a un desencadenante, puede ser primaria (familiar) o secundaria, pero es muy difícil diferenciar la etiología en presencia de una infección.

¿Qué aporta este estudio a lo ya conocido?

Se demostró que el estudio molecular es una valiosa herramienta en los casos de HLH para determinar su etiología, aún en la presencia de una infección y como el TMO es la una opción curativa en esta entidad.

Resumen

La linfocitosis hemofagocítica (HLH) corresponde a una activación exagerada, primaria o secundaria, del sistema inmunológico. La linfocitosis hemofagocítica familiar tipo 3 (LHF-3) es un desorden del sistema inmune severo, causado por mutaciones en el gen *UNC13D*, el cual codifica para una proteína esencial en la función citotóxica de los linfocitos. **Objetivo:** Describir la relevancia diagnóstica de la secuenciación de nueva generación (NGS) en el enfoque de un paciente con sospecha de LHF y demostrar la efectividad del trasplante de médula ósea como única medida curativa. **Caso Clínico:** Preescolar de 4 años masculino, previamente sano, quien debutó con un síndrome mononucleósico e IgM positiva para virus de Epstein Barr. El paciente evolucionó con hepatoesplenomegalia y deterioro clínico progresivo. Se sospechó un síndrome linfoproliferativo, el cual fue descartado por aspirado de médula ósea, encontrando evidencia de hemofagocitosis activa. El paciente cumplía criterios para síndrome hemofagocítico (por compromiso de médula ósea, pancitopenia, elevación de ferritina e hipertrigliceridemia) y ante la no respuesta al protocolo de primera línea, incluyendo terapia antiviral, se consideró la posibilidad de una etiología primaria. Se completó estudio molecular con NGS que fue positivo para LHF-3. Debido a la evolución clínica se realizó trasplante de médula ósea con resultado exitoso a los 5 años de seguimiento. **Conclusión:** La NGS es una herramienta indispensable en el diagnóstico de la LHF, principalmente cuando la respuesta al tratamiento estándar no es adecuada y facilita la instauración oportuna de las medidas terapéuticas necesarias.

Palabras clave:

Linfocitosis Familiar
Hemofagocítica;
Linfocitosis;
UNC13D;
Secuenciación de Nueva Generación;
Trasplante de Médula Ósea

Correspondencia:
Gabriela Caicedo-Herrera
mgcaicedo@icesi.edu.co

Abstract

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is an exaggerated activation of the immune system which can be either primary (familial) or secondary. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL-3) is a severe immune disorder, caused by mutations in the *UNC13D* gene, which codes for a protein crucial to the cytotoxic function of lymphocytes. **Objective:** To describe the diagnostic relevance of next-generation sequencing in the approach of a patient with suspected FHL and to demonstrate the effectiveness of bone marrow transplantation as the only curative measure. **Clinical Case:** 4-year-old preschool male, previously healthy, who presented with mononucleosis syndrome and positive IgM for Epstein Barr virus, developing hepatosplenomegaly and progressive clinical deterioration. A lymphoproliferative syndrome was suspected, which was ruled out by bone marrow aspiration, finding evidence of active hemophagocytosis. The patient met the criteria for hemophagocytic syndrome (bone marrow aspiration, pancytopenia, elevated ferritin, and hypertriglyceridemia) and, given the lack of response to first-line management, including antiviral treatment, a possible primary etiology was considered. A molecular study was completed with NGS that was positive for FHL-3. Due to the progressive clinical deterioration, a bone marrow transplantation was performed, presenting successful results after the first year had elapsed. **Conclusion:** NGS is an indispensable tool in the diagnosis of FHL, mainly when the response to standard treatment is not adequate and facilitates the timely implementation of the necessary therapeutic measures.

Keywords:

Familial
Hemophagocytic
Lymphohistiocytosis;
UNC13D;
Next-Generation
Sequencing;
Bone Marrow
Transplantation

Introducción

La linfocitosis hemofagocítica (HLH) es la activación desenfrenada de los linfocitos T citotóxicos, las células asesinas naturales (NK) y macrófagos¹. Puede ser primario (familiar) o secundario a diferentes etiologías tales como: infecciones, malignidad, desórdenes reumatológicos e inmunodeficiencias. Sin embargo, en ausencia de antecedentes familiares o una prueba molecular es muy difícil diferenciar la una de la otra².

La linfocitosis hemofagocítica familiar (LHF) es un desorden autosómico recesivo que se presenta aproximadamente en 1 por cada 100.000 niños³. Es causado por mutaciones en genes que participan en la función de las células NK y la función citotóxica de linfocitos TCD8+ (PRF1, *UNC13D*, STX11 y STXBP2)³⁻⁴. Se caracteriza por fiebre persistente, hepato-esplenomegalia, ferritina elevada, citopenias, alteración de la citotoxicidad de las células NK y hemofagocitosis⁵. La LHF tipo 3 (MIM: 608898) es la segunda forma genética más frecuente (30%-40%). La cual es causada por mutaciones del gen *UNC13D*, que codifica para la proteína Munc13-4, que interfiere en la maduración de las vesículas durante la exocitosis y participa en la regulación de la secreción de gránulos citolíticos¹.

El curso de la LHF es rápidamente progresivo y fatal en algunos casos, a menos que un tratamiento adecuado sea instaurado. Se recomienda el trasplante de médula ósea a todos los pacientes con historia familiar o diagnóstico molecular de LHF y a los pacientes con enfermedad secundaria severa refractaria al manejo tradicional, es decir, con síntomas clínicos persistentes por 8 semanas del inicio del manejo⁶⁻⁷.

El diagnóstico del síndrome hemofagocítico es un verdadero desafío, debido a que los signos y síntomas son compatibles con otras enfermedades comunes y suele confundirse frecuentemente. Es muy importante definir si la condición es de etiología primaria o secundaria, ante la presencia de una infección viral que puede ser el desencadenante de la LHF. En el presente reporte de caso se pretende exponer las dudas al momento del diagnóstico y esclarecer cuándo sospechar una etiología primaria. Además, determinar la importancia y pertinencia de la secuenciación de siguiente generación (NGS) en este tipo de patologías y cómo el trasplante de médula ósea es una opción curativa para esta entidad. El objetivo de este reporte es describir la relevancia diagnóstica de la secuenciación de nueva generación en el enfoque de un paciente con sospecha de LHF y demostrar la efectividad del trasplante de médula ósea como opción curativa.

Caso Clínico

Preescolar de 4 años, masculino, originario del suroccidente colombiano, sin consanguinidad paterna, pero con ancestros de la misma localidad, sin antecedentes familiares de importancia (que sugieran inmunodeficiencias primarias o síndromes de desregulación). Fue admitido en el servicio de urgencias en hospital local por un cuadro febril y adenopatías cervicales de dos semanas de evolución, para lo cual recibió manejo ambulatorio para faringoamigdalitis; persistió con fiebre y con aparición de adenopatías de mayor tamaño. Se hospitalizó para iniciar estudios y administración de antibiótico endovenoso.

Durante la hospitalización presentó distensión abdominal, ictericia y hepato-esplenomegalia asociado a pancitopenia. Se realizó aspirado de médula ósea en el cual se descarta infiltración neoplásica, con representación de las tres líneas celulares y se documentó la presencia de hemofagocitosis. Se hace diagnóstico de síndrome hemofagocítico por compromiso de médula ósea, elevación de ferritina, hipertrigliceridemia, cuadro clínico sugestivo de infección por virus Epstein Barr (VEB) e IgM positiva. Inició manejo con dexametasona, etopósido y ciclosporina A según protocolo HLH 2004, sin embargo, el paciente se deterioró clínicamente (día 15 de hospitalización), con alto riesgo de falla ventilatoria, trombocitopenia y alteraciones de coagulación graves por lo que fue derivado a nuestra institución.

El paciente ingresó con ictericia generalizada, adenopatías cervicales bilaterales, hepato-esplenomegalia y ascitis marcada. Los exámenes de laboratorio mostraron panhipogamaglobulinemia, pancitopenia (Hb 8,6 g/del, plaquetas 70.000/ μ g/L, linfocitos 2.310 células/ μ g/L y neutrófilos 120), ferritina elevada (10.637 ng/mL, VN: 4-67 ng/mL), hipertrigliceridemia (397,9 mg/Dl, VN: 0-200 mg/mL) y fibrinógeno consumido (70 mg/dL) e IgM positiva para VEB. La expresión de perforinas por citometría de flujo estaba dentro de los parámetros normales y la actividad citotóxica de las NK no se tomó debido al tratamiento inmunosupresor. Por refractariedad al tratamiento y la edad del paciente se consideró la posibilidad de una etiología primaria y no secundaria a infección, para lo cual se complementó el estudio con prueba molecular tipo panel NGS que incluyó los genes PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2 para descartar LHF de etiología primaria. Se decidió continuar con el manejo para síndrome hemofagocítico según el protocolo HLH-2004 hasta completar 8 semanas y se adicionó al manejo valganciclovir, por

pruebas de PCR en líquido cefalorraquídeo y sangre positivas (31.650 copias/mL) para VEB.

El paciente completó la inducción del protocolo HLH-2004 con remisión parcial del cuadro clínico y negativización de las cargas virales para VEB. Posteriormente, evolucionó con deterioro clínico progresivo, persistencia de niveles elevados de ferritina y alteración de la función hepática, por lo que se decidió realizar trasplante de médula ósea como tratamiento curativo.

El paciente recibió régimen de acondicionamiento con Timoglobulina 5mg/kilo dosis acumulada días -9-8-7 Ciclofosfamida 14,5mg/kilo/dosis días -6 y -5, Busulfan 4,8 mg/kg/día -4, Fludarabina: 30mg/metro/dosis días -6 a -2 radioterapia TLI 750CGY día -1, y Rituximab 375mg/metro dosis días-8 y -1. El día 84 de hospitalización, recibió infusión de progenitores hematopoyéticos (Fuente: Sangre periférica, Donante: Padre Haploidentico HLA 5:10, Dosis de Células CD34: 17,8 x10E6/Kg). Recibió profilaxis antimicrobiana y antiviral de acuerdo a lineamientos institucionales. En el seguimiento post-trasplante no presentó reactivación de citomegalovirus ni Epstein barr. Presentó injerto plaquetario y de neutrofilos el día +16. El último quimerismo en linfocitos T fue del 70% y el total de 60% a los 16 meses post-trasplante. Como profilaxis de EICH recibió ciclofosfamida 50mg/kilo/días +3 y +4, Tacrolimus iniciada el día +4 para mantener niveles entre 5-12ng/dl, metotrexate 7,5mg/metro/dosis días +5,+7,+11,+15 con rescate con folinato de calcio. El día +12 presentó deterioro clínico marcado asociado a hepatomegalia, ascitis y elevación de transaminasas (ALT 886.1 - AST 1098), se sospechó enfermedad veno-oclusiva hepática por lo cual se suspendió tacrolimus y metotrexate y se inició micofenolato asociado a bolos de metilprednisolona con lo que presentó mejoría clínica marcada. Se dio de alta el día

Tabla 1. Criterios diagnósticos de linfohistiocitosis hemofagocítica⁵ y hallazgos presentes en nuestro paciente

Criterios diagnósticos para HLH	Paciente reportado
Fiebre \geq 7 días	Sí
Esplenomegalia	Sí
Citopenias (2 o más líneas)	Pancitopenia (Hb 8,6 g/dL, plaquetas 70.000/ μ g/L, leucocitos 2.310/ μ g/L)
Hipertrigliceridemia (\geq 265 mg/dL) y/o hipofibrinogenemia (\leq 150 mg/dL)	Máximo nivel triglicéridos (1.199 mg/dL) Mínimo nivel fibrinógeno (70 mg/dL)
Hemofagocitosis en médula ósea, bazo o nódulo linfoide	Presente
Actividad de NK ausente o disminuida	Normal
CD 25 soluble \geq 2,400 U/mL	No analizado
Ferritina \geq 500 ng/mL	Máximo nivel ferritina (44.287 ng/mL)

**HLH: Linfohistiocitosis hemofagocítica. NK: Células "Natural killers".

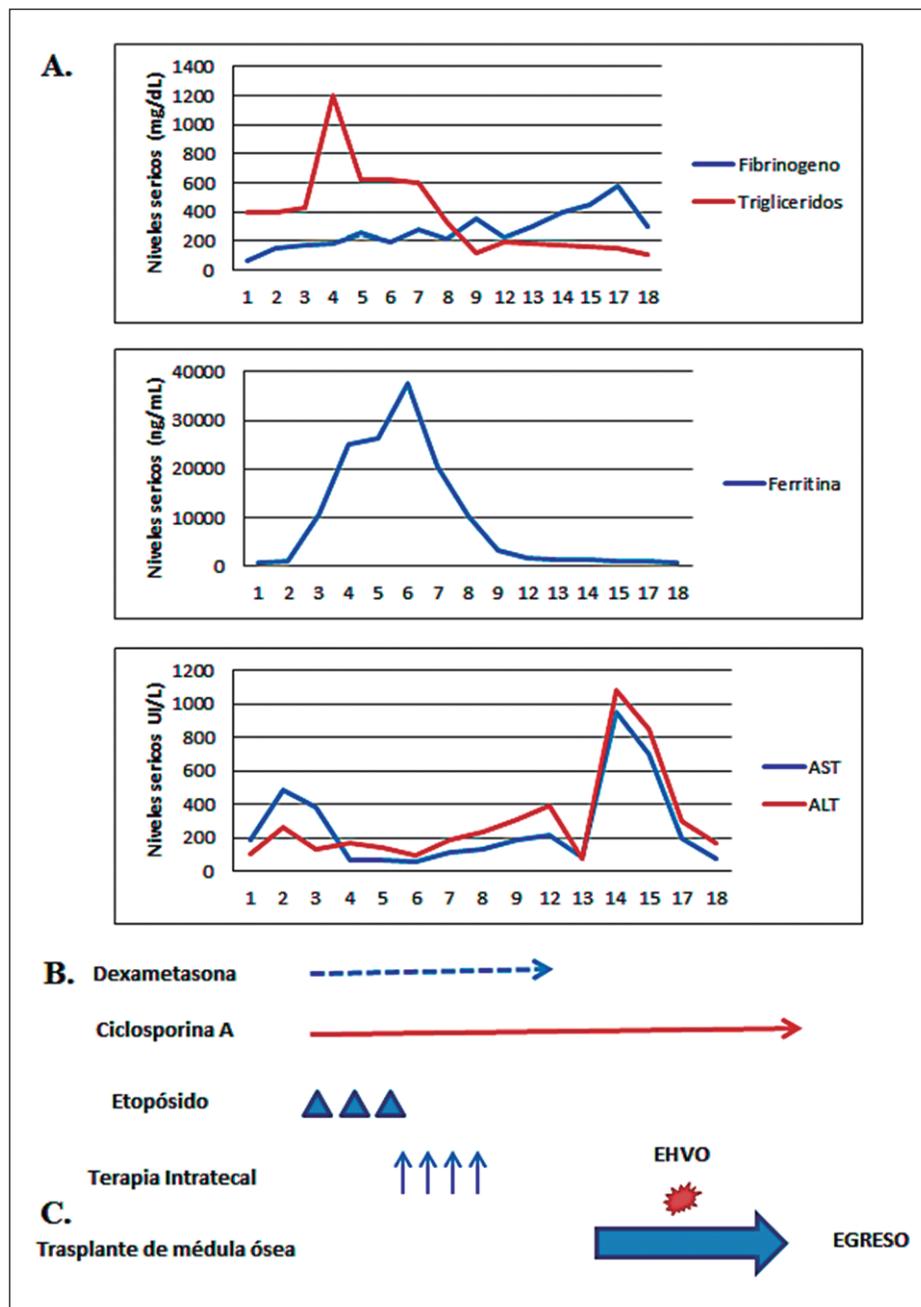


Figura 1. Evolución clínica del paciente durante la hospitalización. Representación esquemática de algunos criterios de linfohistiocitosis hemofagocítica **(A)** (niveles séricos de fibrinógeno, triglicéridos, ferritina) con su respuesta al protocolo HLH-2004 **(B)** instaurado hasta la semana 8 de hospitalización. Desde la semana 9, el paciente presentó deterioro clínico progresivo y evidencia de falla hepática (transaminasas elevadas) por lo que se realizó TMO con donante haploidéntico en la semana 12, como única medida curativa **(C)**. Durante la semana 14 y 15 presentó hepatomegalia, ascitis y elevación de transaminasas, se sospechó enfermedad veno-oclusiva hepática (EHVO), complicación que fue manejada con éxito y permitió el egreso del paciente 4 semanas después.

+29 clínicamente estable y con recuperación hematológica. Como complicación tardía presentó EICH crónico leve en piel e hígado tratado con esteroides y dosis bajas de metotrexate con buena evolución. La evolución clínica del paciente y el esquema de tratamiento recibido se muestra en la Figura 1.

El paciente continuó en manejo ambulatorio con infusiones de inmunoglobulinas inicialmente cada 2 semanas y después cada 28 días. En la última visita, 5 años posterior al trasplante, se evidenció un reconstitución inmune completa (humoral y celular). Se decidió continuar manejo multidisciplinario de manera

ambulatoria y visitas trimestrales con el servicio de inmunología, hematología pediátrica y genética clínica.

El panel NGS reportó una mutación homocigota en el exón 31 del gen UNC13D c.3049G>A (p.Glu1017.Lys) que confirmó el diagnóstico de LHF-3. El hallazgo se confirmó utilizando un secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Mediante secuenciación Sanger se realizó confirmación de la variante encontrada en la NGS. Se realizó análisis bioinformático utilizando diferentes herramientas tales como: PolyPhen-2, Mu-

tationTaster y SIFT, las cuales clasificaron la variante como “causante de enfermedad” y “dañino”. Adicionalmente se encontró un Dann Score de 0.999. Con lo anterior se clasificó la variante como “probablemente patogénico” según las pautas del American College of Medical Genetics and Genomics (PM1, PM2, PM3, PP3)⁸⁻⁹.

Discusión

El paciente reportado es un preescolar masculino previamente sano con cuadro febril prolongado refractario al tratamiento, siendo la mononucleosis infecciosa la principal sospecha diagnóstica. Sin embargo, esta patología generalmente es autolimitada y de curso benigno¹⁰, debido al deterioro progresivo se sospecha la posibilidad de malignidad. Después de estudios complementarios se encontró que el paciente cumplía con 6 de los 8 criterios para HLH (tabla 1). Además, en pacientes con HLH los síntomas frecuentemente son desencadenados por infecciones virales¹¹. Por décadas se ha reportado la asociación entre VEB y el síndrome hemofagocítico, sin embargo, la incidencia real de VEB-HLH es difícil de determinar debido a que los hallazgos son similares con otras entidades inflamatorias¹².

En la linfocitosis hemofagocítica familiar (LHF) se han identificado 4 genes implicados PRF1, UNC13D, STX11 y STXBP2 causantes de LHF 2, 3, 4 y 5 respectivamente¹⁻². La edad de presentación de la enfermedad se da durante la primera década de la vida, causada principalmente por mutaciones en PRF1 y UNC13D¹³. En el presente caso, se evidenció la presencia de infección por VEB por lo que se sospechó etiología primaria, debido a la edad, el género, cuadro clínico persistente a pesar del manejo estándar y la alta probabilidad de consanguinidad parental. El paciente es portador de una mutación homocigota (c.3049G>A) en el gen UNC13D, que codifica para la proteína Munc13-4¹. Se trata de una mutación con cambio de sentido localizada en el exón 31 que provoca la sustitución de ácido glutámico por lisina en una región altamente conservada del dominio C2B de la proteína y que se predice patogénica validada por diferentes predictores bioinformáticos. Adicionalmente, fue identificada en el 2011 en heterocigosis compuesta en un paciente caucásico con diagnóstico de linfocitosis hemofagocítica¹⁴. En nuestro paciente se encontró en homocigosis y es la primera vez reportada en este estado.

La LHF primaria y secundaria pueden ser rápidamente fatales y requieren de un manejo temprano que consiste en un tratamiento inmunomodulador progresivo dependiendo de la severidad de cuadro con la combinación de dexametasona, ciclosporina A

y etoposido, según el protocolo HLH 2004⁶. Nuestro paciente recibió el esquema propuesto, sin embargo, el cuadro clínico persistió y esto junto la sospecha de LHF llevó a considerar el trasplante de médula ósea.

Dependiendo del tipo de donante y el régimen de acondicionamiento el trasplante alogénico de médula ósea parece proporcionar la mejor medida curativa en casos de LHF o HLH severa persistente, con una supervivencia reportada a largo plazo de 50%-70%¹⁴. Se ha reportado un caso de una niña de 20 meses con diagnóstico de LHF-3 por mutación heterocigota en el gen UNC13D desencadenada por infección por VEB quien fue tratada con TMO exitoso¹⁵, similar a lo descrito en nuestro paciente. La paciente egresó a la semana 18 desde el inicio de los síntomas, con resolución completa del cuadro hemofagocítico. El último control de nuestro paciente fue a los 5 años del trasplante, se encontró un paciente asintomático con buena calidad de vida, sin requerimiento de inmunosupresores, con reconstitución inmune completa y tiene el esquema de vacunación completo para la edad.

Conclusiones

El estudio molecular es una valiosa herramienta en los casos de HLH para determinar su etiología, aún en la presencia de una infección concomitante, si la sospecha clínica lo amerita, como en el caso reportado. El trasplante de médula ósea se propone como la única alternativa de tratamiento en casos de LHF, en este caso tipo 3 y que hasta el momento ha tenido un curso exitoso.

Responsabilidades Éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Sieni E, Cetica V, Hackmann Y, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: when rare diseases shed light on immune system functioning. *Front Immunol*. 2014;5:167.
2. Al-Samkari H, Berliner N. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2018;13(1):27-49.
3. Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic syndromes-an update. *Blood Rev*, 2014;28:135-42.
4. Gholam C, Grigoriadou S, Gilmour KC, Gaspar HB. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in the genetic basis, diagnosis and management. *Clin. Exp. Immunol*. 2011;163:271-83.
5. Gupta S, Weitzman S. Primary and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical features, pathogenesis and therapy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010;6(1):137-54.
6. Henter JI, Horne A, Aricó M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):124-31.
7. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115. 2003;461-73.
8. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*. 2015;31(5):761-3.
9. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
10. Luzuriaga K, Sullivan J. Infectious mononucleosis. *N Engl J Med*. 2010;362:1993-2000.
11. Ishii E, Ohga S, Imashuku S, et al. Review of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in children with focus on Japanese experiences. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53:209-23.
12. Lehmborg K, Ochi F, Nichols KE, Ishii E. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Associated with Malignancies and with Epstein-Barr Virus. *Histiocytic Disorders*, 2017; 215-31.
13. Trizzino A, zur Stadt U, Ueda I, Histiocyte Society HLH Study Group. Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis due to perforin mutations. *J Med Genet* 2008;45:15-21.
14. Aricó M, Janka G, Fischer A, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL study group of the histiocyte society. *Leukemia*. 1996;10:197-203
15. Olaya M, Alsina L, de Sevilla MF, Catalá A, López-Ramos MG, Martín Mateos MA. Epstein-Barr virus infection triggering a haemophagocytic syndrome. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2014;42:627-9.