

Trombocitopenias hereditarias o adquiridas
Congenital and acquired thrombocytopenias

Trombocitopenias hereditarias. Actualización en mecanismos involucrados y diagnóstico

Inherited thrombocytopenias.
Update on pathogenesis and diagnostic approach

Heller PG, Glembotsky AC

Hematología Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.
UBA. CONICET

paulaheller@hotmail.com



SIMPOSIO 3

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 • Número Extraordinario
XII Congreso del Grupo CAHT: 116-121
Septiembre 2016

Palabras clave: Trombocitopenia,
Genes,
Megacariocitopoyesis.

Keywords: Thrombocytopenia,
Genes,
Megakaryopoiesis.

Las trombocitopenias hereditarias (TH) comprenden un grupo amplio y heterogéneo de entidades causadas por mutaciones en reguladores clave del linaje megacariocítico, lo que induce una alteración en la biogénesis plaquetaria⁽¹⁾. La presentación clínica varía desde aquellas patologías graves, que cursan con trombocitopenia marcada y se manifiestan poco tiempo después del nacimiento con sangrado severo, hasta el hallazgo incidental de trombocitopenia en un estudio de laboratorio de rutina en individuos asintomáticos en la edad adulta. Si bien las entidades incluidas dentro de las TH son poco frecuentes o incluso, en algunos casos, extremadamente raras, consideradas en conjunto, las TH constituyen una causa no infrecuente de trombocitopenia, especialmente en el niño, pero también en el adulto. Una de las principales dificultades en esta área consiste en diferenciar las TH de la trombocitopenia in-

mune (PTI), patología más frecuente y reconocida. El diagnóstico erróneo de PTI en pacientes con TH puede traer aparejado el uso de tratamientos ineficaces y potencialmente perjudiciales, como los inmunosupresores e incluso la esplenectomía. En nuestra experiencia, en la Sección Hematología Investigación del Instituto Lanari, 20 de 74 (27%) pacientes con diagnóstico confirmado de TH habían sido diagnosticados previamente como PTI y 18 de ellos habían recibido corticoides, danazol, gammaglobulina o esplenectomía. La historia familiar de trombocitopenia sugiere la etiología genética, siendo útil para orientar la presunción de TH. Sin embargo, hay casos de presentación *de novo* o de herencia autosómica recesiva, en los que no hay otros familiares afectados. En caso de herencia autosómica recesiva, el antecedente de consanguinidad en los padres puede resultar orientador. Por lo expuesto, no es

infrecuente que no existan antecedentes familiares y en estos casos es especialmente difícil llegar al diagnóstico de TH y diferenciarlas de la PTI. Si bien ciertos datos pueden resultar orientativos, no existe un marcador clínico ni de laboratorio que permita diferenciar fehacientemente TH de PTI, lo que dificulta el abordaje de estos pacientes. Por otra parte, el diagnóstico de las TH requiere de metodologías de alta complejidad, disponibles en pocos centros, lo que contribuye al problema.

Etiología molecular

El auge de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) ha significado un avance sustancial en este campo, identificándose nuevos genes causales y ampliando el espectro de entidades comprendidas. Es ahora evidente que, además de la variabilidad clínica, existe una amplia heterogeneidad genética, conociéndose actualmente más de 30 genes causales⁽²⁾. Sin embargo, a pesar de estos

adelantos, la etiología molecular permanece desconocida en alrededor del 50% de los casos, lo que refleja la existencia de otros genes afectados, aún no identificados.

Clasificación de las TH

Dado que el tamaño de las plaquetas es determinado en gran medida durante la formación de las mismas, muchas TH cursan con alteraciones en el tamaño plaquetario y, de hecho, la presencia de macroplaquetas es uno de los indicios que hace sospechar el diagnóstico de TH. Las entidades más frecuentes son las macrotrombocitopenias, aunque hay patologías que cursan con microplaquetas, como el síndrome de Wiskott-Aldrich y otras TH que tienen tamaño normal. El tamaño plaquetario puede, de esta forma, orientar hacia el tipo de TH que presenta el paciente. En la tabla se enumeran las distintas entidades comprendidas en las TH clasificadas según el tamaño plaquetario y los genes causales.

Tamaño plaquetario	Trombocitopenias Hereditarias	Gen afectado	
Macroplaquetas	Síndrome de Bernard Soulier (SBS)		
	Bialélico	GPIBA, GPIBB, GP9	
	Monoalélico	GPIBA	
	Di George/Síndrome Velocardiofacial (VC)	GPIBB	
	Síndrome von Willebrand tipo plaquetario (PT-vWD)	GPIBA	
	Desorden relacionado a MYH9 (DR-MYH9)	MYH9	
	Trombocitopenia relacionada a ACTN1	ACTN1	
	Desorden relacionado a la filamina (DR -FLNA)	FLNA	
	Trombocitopenia relacionada a ITGA2B/ITGB3	ITGA2B/ITGB3	
	Trombocitopenia asociada a sitosterolemia (STSL)	ABCG5, ABCG8	
	Enfermedad relacionada a GATA1 (DR-GATA1)	GATA1	
	Trombocitopenia Paris-Trousseau (TCPT)	FLI-1	
	Síndrome de las plaquetas grises (SPG)	Bialélico	NBEAL2
		Monoalélico	GFI1B
		Síndrome relacionado a (TUBB1-RT)	TUBB1
Tamaño normal	Trombocitopenia amegacariocítica congénita (CAMT)	MPL	
	Trombocitopenia Ausencia de radio (TAR)	RBM8A	
	Trombocitopenia con sinostosis radio-ulnar (CITRUS)	HOXA11.MECOM	
	Trombocitopenia relacionada a ANKRD26	ANKRD26	
	Desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia	RUNX1	
	Trombocitopenia por mutación de ETV6	ETV6	
Microplaquetas	Síndrome de Wiskott Aldrich	WAS	
	Trombocitopenia ligada al X	WAS	

Otros genes causales de TH recientemente identificados son: SRC- TRPM7- SLFN14-FYB- DIAPH1.

Alteración funcional plaquetaria asociada a la trombocitopenia

Varios de los genes mutados en las TH, además de estar involucrados en la megacario/trombopoyesis, cumplen roles en la función plaquetaria. Por este motivo, algunas patologías presentan también alteración en la función plaquetaria que contribuye al sangrado. A continuación se enumeran algunos ejemplos:

- Desorden plaquetario familiar asociado a LMA: defecto en gránulos densos y alteración en la capacidad de activación de la GPIIb/IIIa.
- Síndrome de plaquetas grises: deficiencia marcada en gránulos α .
- Síndrome de von Willebrand plaquetario y 2B: agregación con bajas dosis de ristocetina, agregación espontánea.
- Síndrome de Bernard-Soulier, ausencia o disminución marcada de respuesta a ristocetina.

Manifestaciones asociadas a la trombocitopenia

Las TH pueden afectar exclusivamente las plaquetas o, si el gen afectado modula otros procesos, cursar con otras manifestaciones hematológicas, sistémicas o malformaciones congénitas. La presencia de estas manifestaciones asociadas a la trombocitopenia en las formas sindrómicas suele ser útil para orientar el diagnóstico etiológico. Sin embargo, la mutación de un mismo gen puede dar lugar a formas sindrómicas o no sindrómicas, como por ejemplo la enfermedad relacionada al gen *MYH9*, que puede cursar con trombocitopenia aislada o estar asociada a hipoacusia, nefropatía y cataratas. Por otra parte, las manifestaciones asociadas a la trombocitopenia pueden presentarse durante la evolución y no estar presentes al momento de la detección de la trombocitopenia, como por ejemplo el desarrollo de leucemia en un paciente con desorden plaquetario familiar y predisposición a leucemia mieloide aguda (DPF/LMA). De lo expuesto se desprende que un adecuado diagnóstico etiológico del tipo de TH que presenta el paciente es fundamental para determinar el pronóstico, la evolución a largo plazo y, en algunos casos, detectar y tratar precozmente las manifestaciones asociadas.

A continuación se detallan algunas de las manifestaciones asociadas a la trombocitopenia en las TH:

- hipoacusia, cataratas y nefropatía en la enfermedad relacionada al gen *MYH9*

- manifestaciones hematológicas: patología roja (trombocitopenia por mutación de *GATA-1*, sitosterolemia); mielofibrosis (síndrome de plaquetas grises); aplasia medular (trombocitopenia amegacariocítica congénita)
- predisposición a mielodisplasia y leucemia aguda en el DPF/LMA, trombocitopenia relacionada al gen *ANKRD26*, y a mutación de *ETV6*.
- malformaciones esqueléticas en el síndrome de trombocitopenia y ausencia de radio (TAR) y en la sinostosis radioulnar (CITRUS).
- malformaciones congénitas en el síndrome de Jacobsen.
- inmunodeficiencia y eczema en el síndrome de Wiskott-Aldrich.

La mayoría de las TH son desórdenes autosómicos dominantes caracterizados por trombocitopenia leve a moderada, escaso sangrado y ausencia de afección de otros sistemas (es decir formas no sindrómicas).

Diagnóstico

El abordaje diagnóstico convencional se basa en un algoritmo diagnóstico propuesto por el Grupo Italiano de Estudio de las Plaquetas⁽³⁾, orientado según el tamaño plaquetario, que consta de diferentes etapas con niveles de complejidad creciente. El empleo del mismo permite elaborar una presunción diagnóstica para luego realizar el estudio molecular del o de los gen/es candidato/s dirigido a confirmar el diagnóstico presuntivo.

Estudios de primer nivel:

- recuento de plaquetas: la presencia de macroplaquetas puede llevar a la subestimación del recuento plaquetario en los contadores hematológicos, en cuyo caso el recuento en cámara de Neubauer es el método de referencia.
- volumen plaquetario medio (VPM) en contadores hematológicos, facilita la orientación diagnóstica, aunque suele ser subestimado en las macrotrombocitopenias. En laboratorios especializados, la medición del diámetro plaquetario medio (DPM) utilizando *software* específico, puede ser de utilidad.
- frotis periférico: puede orientar el diagnóstico en caso de observarse plaquetas grises, pálidas, (síndrome de plaquetas grises), inclusiones tipo Döhle en los neutrófilos (desorden relacionado al gen *MYH9*), anomalías de la serie roja (trombocitopenia por mutación de *GATA-1*).

- agregación plaquetaria: útil en los casos de trombocitopatía asociada. Estudios de citometría de flujo (PAC-1, mepacrine), en casos selectos.
- glicoproteínas de membrana plaquetaria por citometría de flujo: de utilidad en las trombocitopenias que cursan con alteración en:
 - GPIb-IX: síndrome de Bernard-Soulier clásico o monoalélico. Cabe destacar que otras macrotrombocitopenias hereditarias pueden presentar una disminución leve a moderada en la expresión de GPIb-IX, como el desorden *MYH9*.
 - GPIIb/IIIa: trombocitopenias por mutaciones que causan un aumento de función de la GPIIb o la GPIIIa.

Estudios de segundo nivel

- inmunofluorescencia para miosina 9: permite identificar agregados de miosina en el citoplasma de los neutrófilos en el desorden *MYH9*, los cuales no siempre se evidencian como cuerpos de Döhle. No existe consenso si este estudio debe realizarse en todas las macrotrombocitopenias hereditarias o sólo en aquéllas con sospecha clínica de *MYH9*. En un estudio efectuado en nuestro laboratorio, se evaluó la utilidad de la inmunofluorescencia para miosina 9 como prueba de chequeo en 38 pacientes con macrotrombocitopenias hereditarias⁽⁴⁾. En la mayoría de los pacientes con resultado positivo (22/23), existía sospecha clínica de *MYH9*-RD previo a efectuar la inmunofluorescencia, ya sea por hallazgo de cuerpos de Döhle, compromiso extrahematológico, ambos o, en ausencia de éstos, el antecedente de un familiar afectado. De los pacientes sin sospecha clínica de *MYH9*, la inmunofluorescencia fue positiva solo en 1, ilustrando el bajo rédito diagnóstico de realizar este estudio en los pacientes sin sospecha de *MYH9*, siempre y cuando se cuente con experiencia para detectar la presencia de cuerpos de Döhle.
- microscopía electrónica de plaquetas: útil para evaluar el contenido de gránulos plaquetarios.
- inmunofluorescencia para trombospondina-1, componente de los gránulos alfa: Esta técnica permite evaluar los gránulos alfa plaquetarios, útil sobre todo en caso de no disponerse de microscopía electrónica.

Estudios de tercer nivel:

- biología molecular de los genes candidato.

Siguiendo este algoritmo, hemos efectuado el diagnóstico etiológico en dos tercios de los pacientes evaluados en nuestro centro⁽⁵⁾.

Se ha propuesto que el estudio mediante NGS de paneles que incluyan todos los genes causales de TH podría resultar costo-efectivo en comparación con la aplicación de todos los pasos secuenciales del algoritmo descrito. Además, dado que el cuadro clínico no siempre es lo suficientemente característico, esta aproximación permitiría detectar mutaciones en genes conocidos en pacientes sin sospecha clínica de determinada entidad. Sin embargo, aún no hay estudios que comparen ambos enfoques para establecer una conclusión al respecto.

Además de permitir realizar el diagnóstico molecular, el uso de NGS en el estudio exómico permitiría identificar nuevos genes causales. El desafío en la utilización de las metodologías NGS radica en la adecuada interpretación de los resultados, especialmente cuando se identifican variantes no descritas y sobre todo en caso de detectarse mutaciones en genes nuevos, ya que diferenciar correctamente polimorfismos o variantes no patogénicas de mutaciones patogénicas puede resultar un desafío.

Mecanismos patogénicos

El mecanismo patogénico principal en las TH consiste en un defecto a nivel de la producción plaquetaria, aunque en algunos casos coexiste una disminución en su sobrevivencia que contribuye a la trombocitopenia, como en el síndrome de Wiskott-Aldrich o la enfermedad de von Willebrand 2B/plaquetaria, que son de patogenia mixta. Excepto en estos dos últimos desórdenes, el estudio de sobrevivencia plaquetaria puede ser útil para distinguir TH de PTI. El estudio de las TH ha aportado información acerca de los mecanismos por los cuales los genes mutados regulan la megacariocito y trombopoyesis y, por otra parte, el descubrimiento de ciertos genes causales ha llevado a la identificación de nuevos reguladores de la producción plaquetaria, proceso sumamente complejo y estrictamente regulado. La megacariocitopoyesis comprende la diferenciación, endomitosis y maduración del megacariocito a partir de la célula madre hematopoyética. Una vez que el megacariocito se encuentra maduro, comienza la fase de trombopoyesis, en la cual se forman prolongaciones proplaque-

tarias a partir del citoplasma del megacariocito, las cuales se bifurcan, ramifican y atraviesan la barrera endotelial para fragmentarse en plaquetas en la luz vascular. Las TH pueden originarse por defectos en las distintas etapas de la producción plaquetaria y en muchas de ellas el defecto principal se encuentra en la fase de trombopoyesis. Existen diversos grupos de moléculas clave en los procesos de megacariocito y trombopoyesis que constituyen blanco de mutaciones en las TH, incluyendo:

- factores de transcripción megacariocíticos, fundamentales en dirigir el programa de expresión génica específico de linaje;
- receptores de citoquinas, como el receptor de trombopoyetina (TPO) MPL;
- receptores para diversas sustancias de la matriz extracelular, GPIb-IX (FVW) y GPIIb/IIIa (fibrinógeno), remarcando la importancia de la interacción del megacariocito con el microambiente medular;
- componentes del citoesqueleto, cuya remodelación es esencial para el correcto desarrollo de las proplaquetas.

Patogenia del desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia (DPF/LMA) y del síndrome de plaquetas grises (SPG)

El estudio de pacientes con TH es una herramienta útil para disecar los procesos celulares y moleculares que regulan la producción y función plaquetarias. En nuestro laboratorio nos hemos focalizado en el estudio de pacientes con DPF/LMA y SPG.

EL DPF/LMA se caracteriza por trombocitopenia leve a moderada, con tamaño plaquetario normal, disfunción plaquetaria y evolución a SMD/LMA y es causado por la mutación germinal del factor de transcripción RUNX1. En colaboración con otro centro, hemos demostrado que la trombocitopenia en el DPF/LMA es causada por una alteración en las distintas etapas de la producción plaquetaria, incluyendo la formación de colonias megacariocíticas, la maduración y endomitosis de los megacariocitos y la formación de proplaquetas, indicando que el RUNX1 cumple un rol en estadios tempranos y tardíos de la producción plaquetaria⁽⁶⁾. En relación a la disfunción plaquetaria de este desorden, además de confirmar que las plaquetas del DPF/LMA tienen menor contenido de gránulos densos, hemos constatado una deficiencia combinada de gránulos

alfa y un defecto en la capacidad de activación (*inside-out*) de la GPIIb/IIIa, observando también una alteración en el *spreading* y la señalización *outside-in*, señalando que así como para la trombocitopenia, la trombocitopatía se debe a defectos en múltiples aspectos de la función plaquetaria⁽⁷⁾. En megacariocitos y/o plaquetas de estos pacientes hemos observado la disminución de la expresión de diversos genes reguladores de la producción y/o función plaquetaria, incluyendo el receptor de TPO, MPL, el factor de transcripción NF-E2, el receptor de colágeno GPIa, componentes del citoesqueleto y la molécula RAB27B, que regula el tráfico de gránulos, demostrándose que estos genes constituyen blancos moleculares de RUNX1⁽⁶⁻⁹⁾. Estos resultados ilustran que RUNX1 constituye un regulador central de la producción y función plaquetaria.

Por otro lado, el SPG se caracteriza por macrotrombocitopenia, deficiencia marcada a ausencia de gránulos alfa y evolución a mielofibrosis, y es causada por mutación de ambos alelos del gen *NBEAL2*. En estudios de cultivo de megacariocitos en dos hermanos de una familia con SPG hemos demostrado que, al contrario del DPF/LMA, la megacariocitopoyesis en el SPG se encuentra preservada y que la alteración radica en la fase de trombopoyesis⁽¹⁰⁾. Similar resultado fue obtenido en otras dos familias por otros investigadores⁽¹⁰⁾. Se desconoce si el *NBEAL2*, además de participar en la biogénesis de los gránulos alfa, tiene un rol directo en la trombopoyesis o, eventualmente, si la biogénesis granular normal es necesaria para que haya un desarrollo adecuado de proplaquetas. Tanto en médula ósea⁽¹¹⁾ como en cultivo de megacariocitos⁽¹⁰⁾ se objetivó emperipolesis, postulándose que ésta puede ser debida a la localización anormal de la P-selectina (normalmente contenida en los gránulos alfa) en la superficie del megacariocito, lo que llevaría al tráfico de neutrófilos por el interior del megacariocito. La mielofibrosis se debería a la liberación anormal de sustancias profibróticas normalmente contenidas en los gránulos alfa, como TGF β y PDGF, al intersticio medular. Esta complicación puede presentarse durante la evolución de la enfermedad y causar agravamiento de la trombocitopenia.

El estudio de la patogenia de las TH es de utilidad, no sólo para contribuir a esclarecer los mecanismos que regulan la producción y función plaquetarias normales, sino también para incentivar el desarrollo

de herramientas terapéuticas dirigidas a las alteraciones presentes en cada entidad.

En conclusión, a pesar de los avances realizados en los últimos años, las TH continúan siendo enfermedades subdiagnosticadas y aún restan muchos interrogantes por responder. La caracterización de estas entidades y el diagnóstico etiológico correcto son importantes para realizar un adecuado seguimiento, definir el pronóstico, proveer consejo genético e instituir el tratamiento apropiado.

Declaración de conflictos de interés:

Las autoras declaran que no poseen conflictos de interés.

Bibliografía

1. Savoia A. Molecular basis of inherited thrombocytopenias: an update. *Curr Opin Hematol.* 2016 Jul 18. DOI:10.1097/MOH.0000000000000269.
2. Pecci A, Balduini CL. Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol.* 2014;165:179-92.
3. Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F et al. Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica.* 2003;88:582-92.
4. Marin Oyarzún CP, Glembotsky AC, Marta RF, Goette NP, Bonaccorso S, Brodsky A, Donato H, Gomez S, Negro F, Ponzinibbio C, Rapetti C, Rosso D, Veber E, Pecci A, Molinas FC, Heller PG. Utilidad de la inmunofluorescencia para la miosina 9 en el *screening* de pacientes con macrotrombocitopenia hereditaria. XI Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis 2014. *Acta Bioquímica Latinoamericana.* 2014; suplemento 1, pag. 31.
5. Glembotsky AC, Marta RF, Pecci A et al. International collaboration as a tool for diagnosis of patients with inherited thrombocytopenia in the setting of a developing country. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1653-61.
6. Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, Balayn N, Gilles L, Rameau P, Nurden P, Alessi MC, Debili N, Vainchenker W, Heller PG, Favier R, Raslova H. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood.* 2012;120:2708-18.
7. Glembotsky AC, Bluteau D, Espasandin YR, Goette NP, Marta RF, Marin Oyarzún CP, Korin L, Lev PR, Laguens RP, Molinas FC, Raslova H, Heller PG. Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with familial platelet disorder with a predisposition to acute myelogenous leukemia: potential role for candidate RUNX1 targets. *J Thromb Haemost.* 2014;12:761-72.
8. Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, Cummings CL, Pirola CJ, Marta RF, Kornblihtt LI, Drachman JG, Molinas FC. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood.* 2005;105:4664-70.
9. Glembotsky AC, Goette NP, Marta RF, Marin Oyarzún CP, Molinas FC, Raslova H, Heller PG. Disminución de la glicoproteína (GP) IaIIa, receptor de colágeno, en el Desorden Plaquetario Familiar con Predisposición a Leucemia Mieloide Aguda (DPF/LMA). XI Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis. *Acta Bioquímica Latinoamericana.* 2014;suplemento 1,pag 28.
10. Di Buduo CA, Alberelli MA, Glembotsky AC, Podda G, Lev PR, Cattaneo M, Landolfi R, Heller PG, Balduini A, De Candia E. Abnormal proplatelet formation and emperipoiesis in cultured human megakaryocytes from gray platelet syndrome patients. *Sci Rep.* 2016;6:23213.
11. Larocca LM, Heller PG, Podda G, Pujol-Moix N, Glembotsky AC, Pecci A, Alberelli MA, Balduini CL, Landolfi R, Cattaneo M, De Candia E. Megakaryocytic emperipoiesis and platelet function abnormalities in five patients with gray platelet syndrome. *Platelets.* 2015;26:751-7.