

43 Diada Societat Catalana d'Hematologia i Hemoteràpia

State of the Art en Trombosi i Hemostàsia

Estudi de la patologia hemorràgica per Next Generation Sequencing

José Ramón González Porras
Unidad de Trombosis y Hemostasia
Servicio de Hematología-IBSAL-USAL

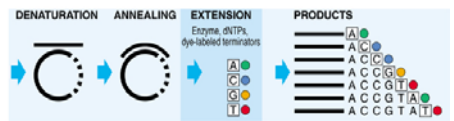
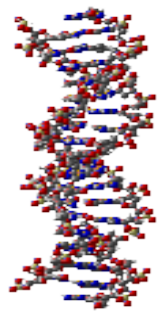
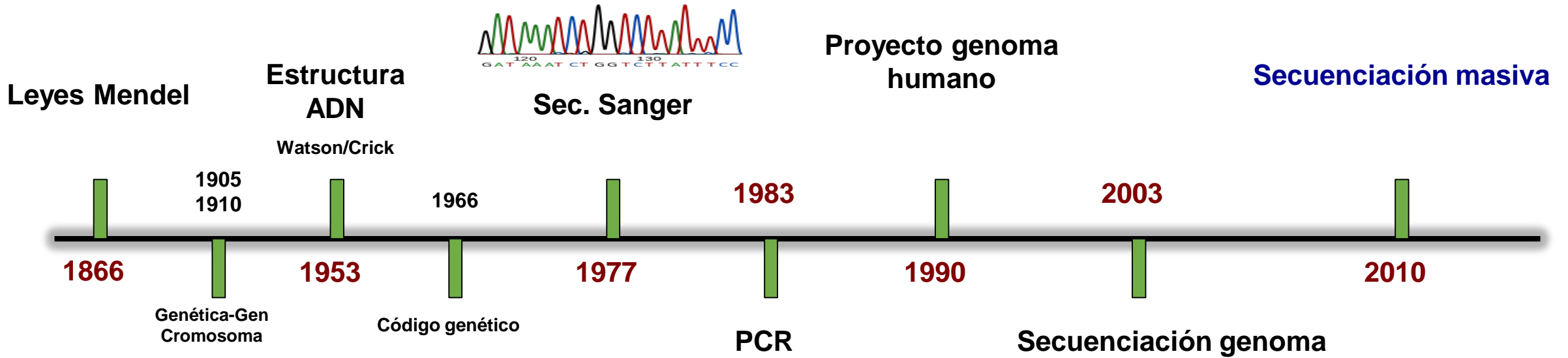


Divendres, 31 de maig de 2019, Barcelona

Learning objectives

- **Conceptos** básicos en **genética** y de las técnicas empleadas para el **diagnóstico molecular** (secuenciación masiva)
- Importancia de la **genética aplicada** a los **trastorno plaquetarios congénitos** (TPC), *Rare bleeding disorders* y en **Hemofilia**

Genética - efemérides



3 billones de nucleótidos
3 billones
\$\$\$\$\$\$

Cambio de terminología



ACMG → VARIANTE

5 - Patogénica (PV)

4 - Probablemente patogénica (LPV)

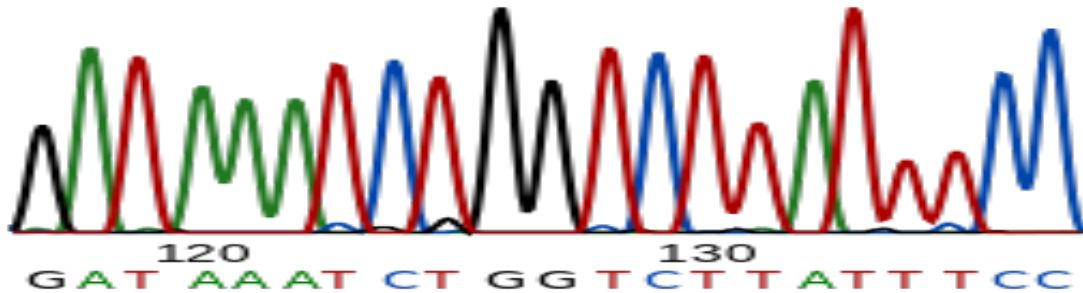
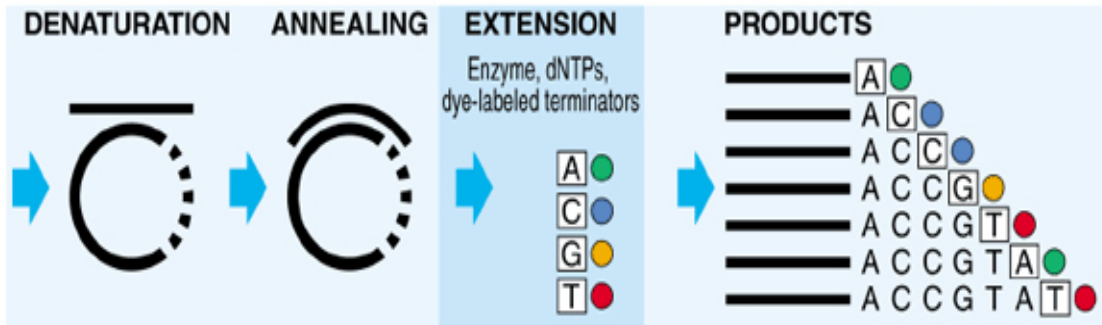
3 - Significado incierto (VUS)

2 - Prob. benigna

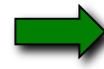
1 - Benigna

Diagnóstico molecular clásico

Secuenciación convencional = SANGER

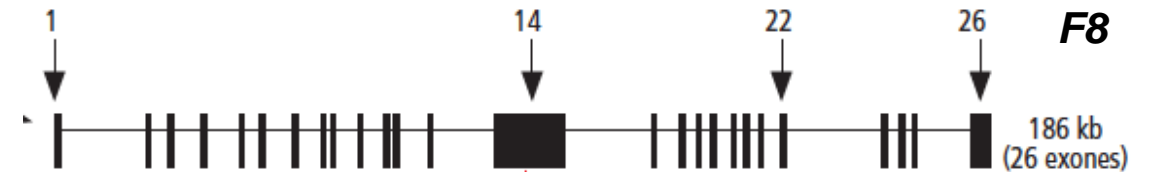


Otros: *microArrays* / *GWAS* / *Linkage Analysis*



Gen candidato

Variante recurrente: FVL / Protrombina

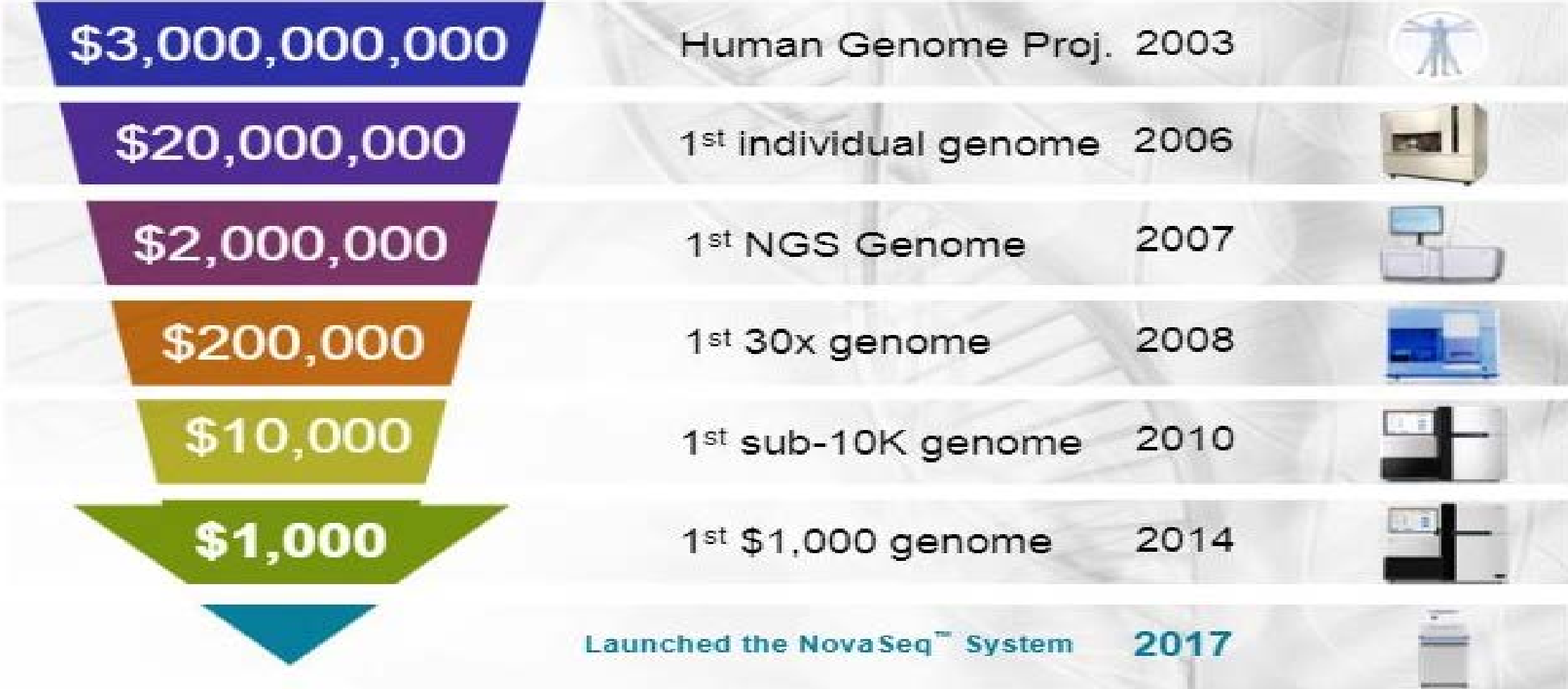


Limitaciones → Tiempo + coste → ↓ Dco

- Tamaño gen
- Múltiples exones
- Trastornos con clínica parecida
- Múltiples genes candidatos



Secuenciación genoma - Coste



Lu JT et al. N Engl J Med. 2014
Van Dijk EL et al. Trends Genet. 2014
Levy SE et al. Annu Rev Genomics Hum Genet 2016

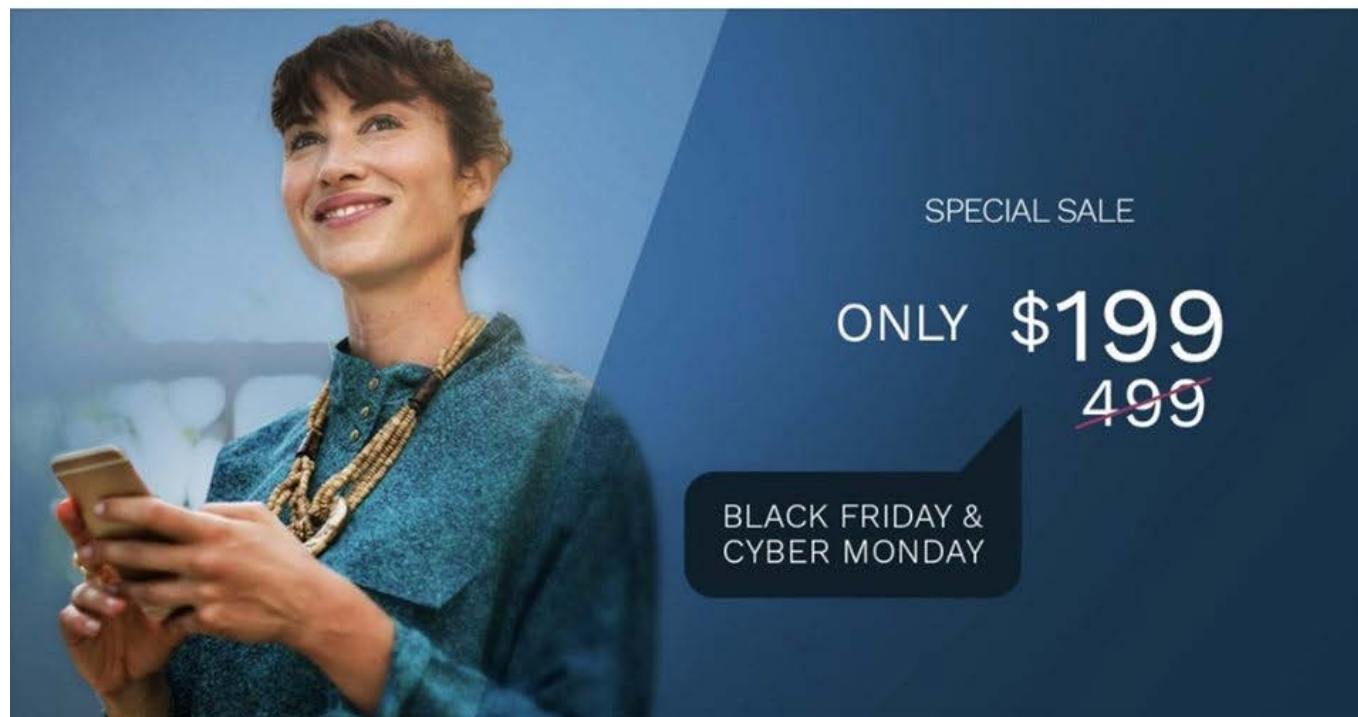


Dante Labs

Sponsored • 



Having 100% of your DNA sequenced gives you an unparalleled access to your health, your family traits and predispositions.

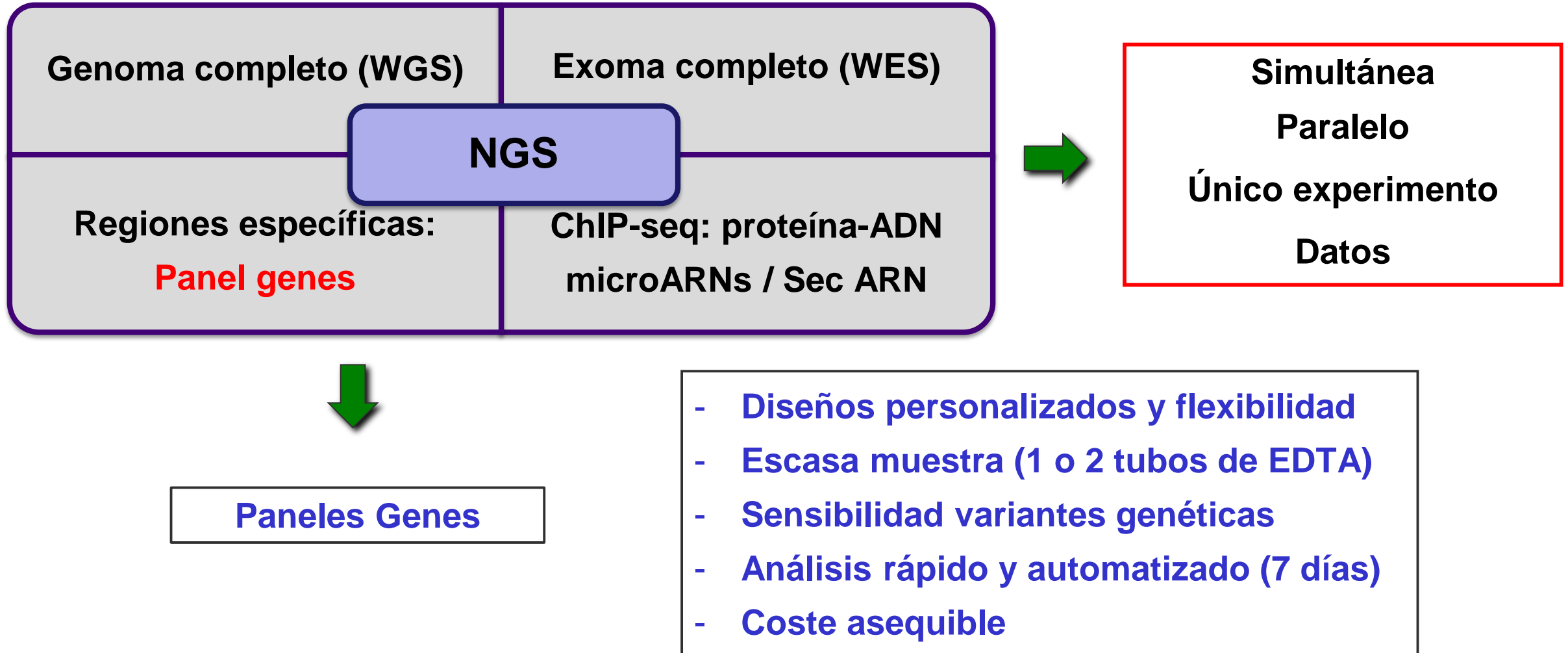


US.DANTELABS.COM

\$199 Full DNA Analysis. This Black Friday we are making history

[Learn More](#)

NGS: revolución diagnóstico molecular



Plataformas NGS disponibles

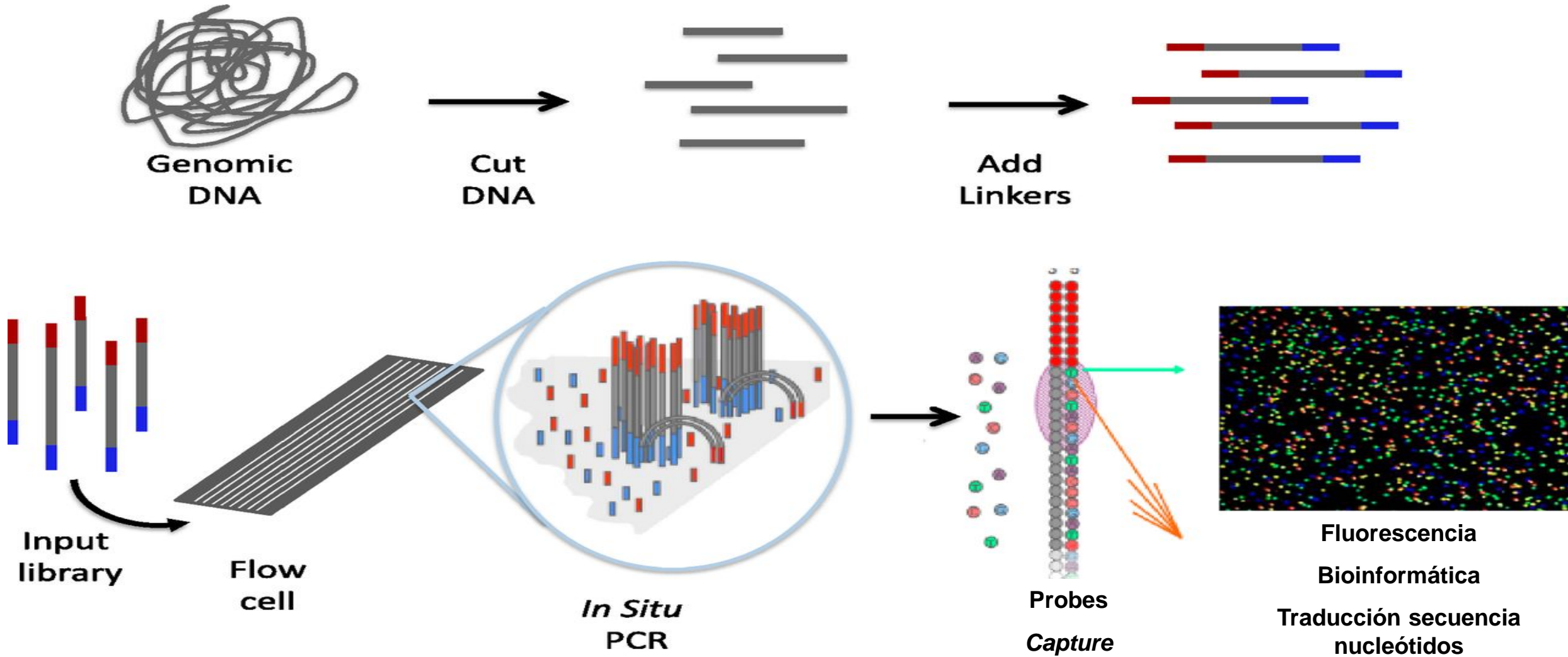
Mecanismo de acción	Gen implicado
Factores transcripcionales	<i>CYCS, FLI1, GATA1, GFI1B, HOXA11, MECOM, MKL1, MPL, RBM8A, RUNX1, STIM1, ETV6, FYB, GATA2, THPO</i>
Receptores de agonistas	<i>P2RY12, TBXA2R, ADRA2A, GP6, CD36, ITGA2, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, ITGA2B, ITGB3, F2RL3</i>
Secreción de gránulos	<i>NBEAL2, PLAUI, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, LYST, MLPH, BLOC1S3, BLOC1S6, DTNBP1, AP3B1, AP3D1, VIPAS39, VPS33B, RAB27A, MYO5A, PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2, SLFN14</i>
Proteínas del citoesqueleto y estructurales	<i>ACTN1, WAS, MYH9, MYH10, FLNA, ANKRD26, ANKRD18A, DIAPH1, MASTL, TUBB1, PRKACG, ABCG5, ABCG8</i>
Síntesis enzimática y señalización	<i>FERMT3, GNAI3, GNAQ, GNAS, PLA2G7, TBXAS1, PTGS1, ORAI1, PLCB2, PLCB3, RGS2, RASGRP2, TRPM7</i>
Otros	<i>ADAMTS13, ANO6, ARPC1B, EPHB2, VWF, MAP3K9, GNE, MPIG6B, PF4, PIGO, SRC, TBX1, THBD, TPM4</i>

Mecanismo de acción	Gen implicado
Vía intrínseca	<i>KLKB1, F12, F13A1, F13B, F11, F8, F9</i>
Vía extrínseca	<i>F2, F3, F5, F7</i>
Carboxilación Vitamina K dependiente	<i>GGCX, VKORC1, F10</i>
Síntesis combinada de factores	<i>MCFD2, LMAN1</i>
Síntesis de fibrinógeno	<i>FGA, FGB, FGG</i>

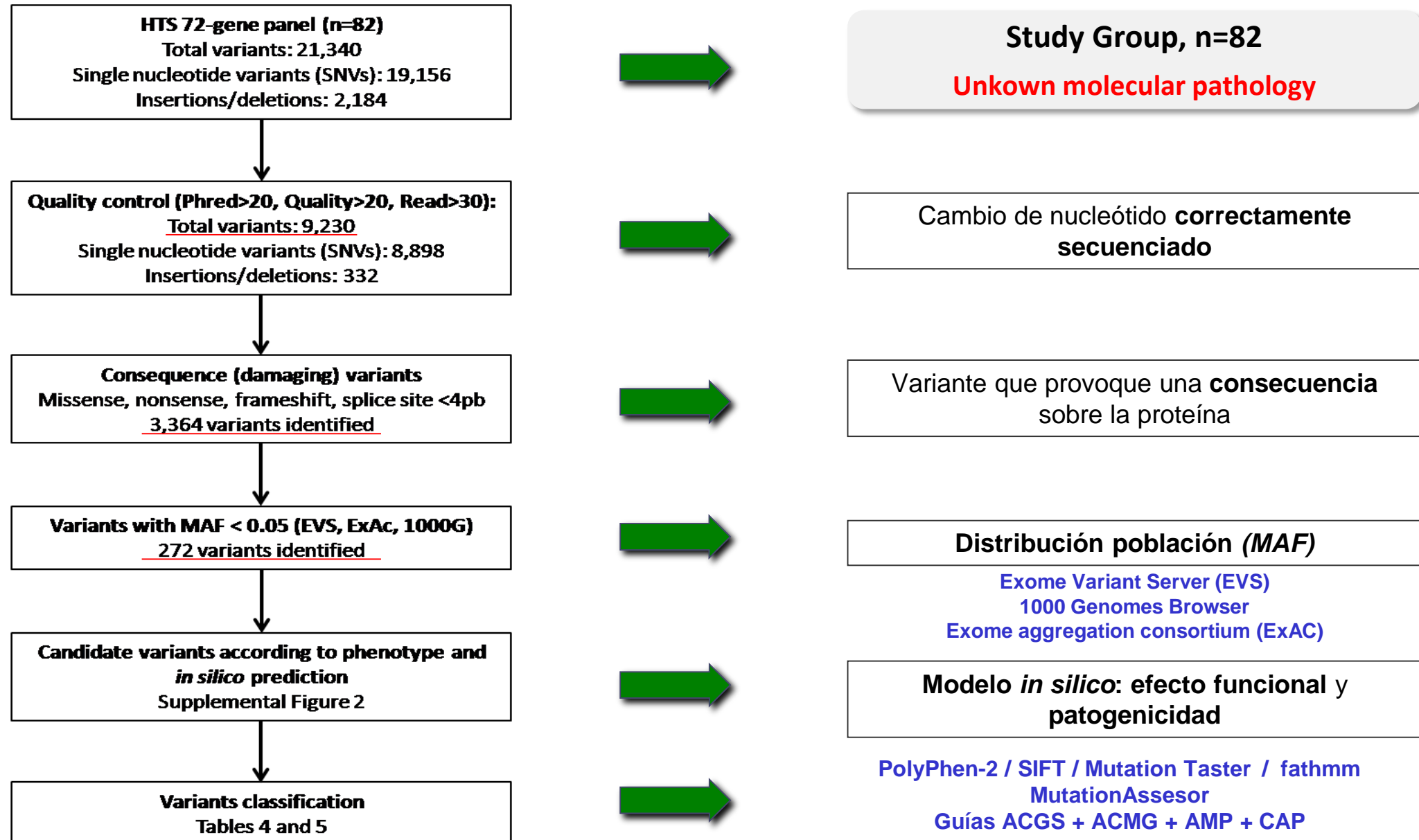
> 300 pacientes
Trastorno plaquetario congénito
Rare bleeding disorders
Hemofilia A y B

Total = 110 genes

Captura de secuencia



Datos / Análisis bioinformático



Tipos de Trastornos Plaq Cong

Trombocitopatías Hereditarias

Gránulos Densos:
LYST → S. Chediak-Higashi
HPS, AP3B1, BLOC1S3, PLDN, DTNBP1 → S. Hermansky-Pudlak
MYO5A, RAB27A, MLPH → S. Griscelli

Combinado: **PRF1, UNC13D, STX11, STXBP** → LHL

CONTENIDO Y SECRECIÓN GRÁNULOS
AGREGACIÓN

FERMT3 → LADIII
RASGRP2 → TG-Like

Gránulos alfa:
VPS33B → ARC
PLAU → S. Quebec
NBEAL2 → SPG
SLFN14 → TP - AD

ITGA2B, ITGB3 → T. Glanzmann

Enzimas:
TBXAS1
PTGS1 → COX

ACTIVACIÓN Y SEÑALIZACIÓN

TMEM16F
ABCA1
 Scott

TBXA2R → Def Receptor TXA₂

GP6 → Defecto Inducción Colágeno

P2RY12 → Defecto Receptor ADP

GNAS1, GNAQ, RGS2
 → Defecto Prot G

Trombocitopenias Hereditarias

Factores Transcripción:
 Prolocorin → **OCG1**
 Sd Plaqueta Gris → **GFI1B**
 Tromb. y disritropocitosis → **RUNX1**
 Tromb. y disritropocitosis → **GATA1**
 Paris-Trousseau Jacobsen → **FLI1**
 Tromb. Ausencia Radio → **RBM8A**
 S. Stormorken → **STIM1**
 TAR → **RBM8A**
 ATRUS → **HOXA11 / MECOM**
 TCH4 → **CYCS**
 Proteína de unión a FYN → **FYB**
 ETS translocation variant 6 → **ETV6**

FORMACIÓN Y NÚMERO

Citoesqueleto:
 Wiskott-Aldrich → **WAS**
 Cadena Pesada Miosina → **MYH9**
 Diaphanous Related Formin 1 → **DIAPH1**
 Tubulina 1 → **TUBB1**
 Filamina A → **FLNA**
 Microtúbulo asociado serin-threonina → **MASTL**
 Dominio 26 Ankirina → **ANKRD26**
 α-actinina → **ACTN1**
 Proteína quinasa → **PRKACG**
 Sitosterolemia → **ABCG5/8**

R- TPO → **MPL / THPO**
 Tromb. Amegacariocítica Cong.

ADHESIÓN

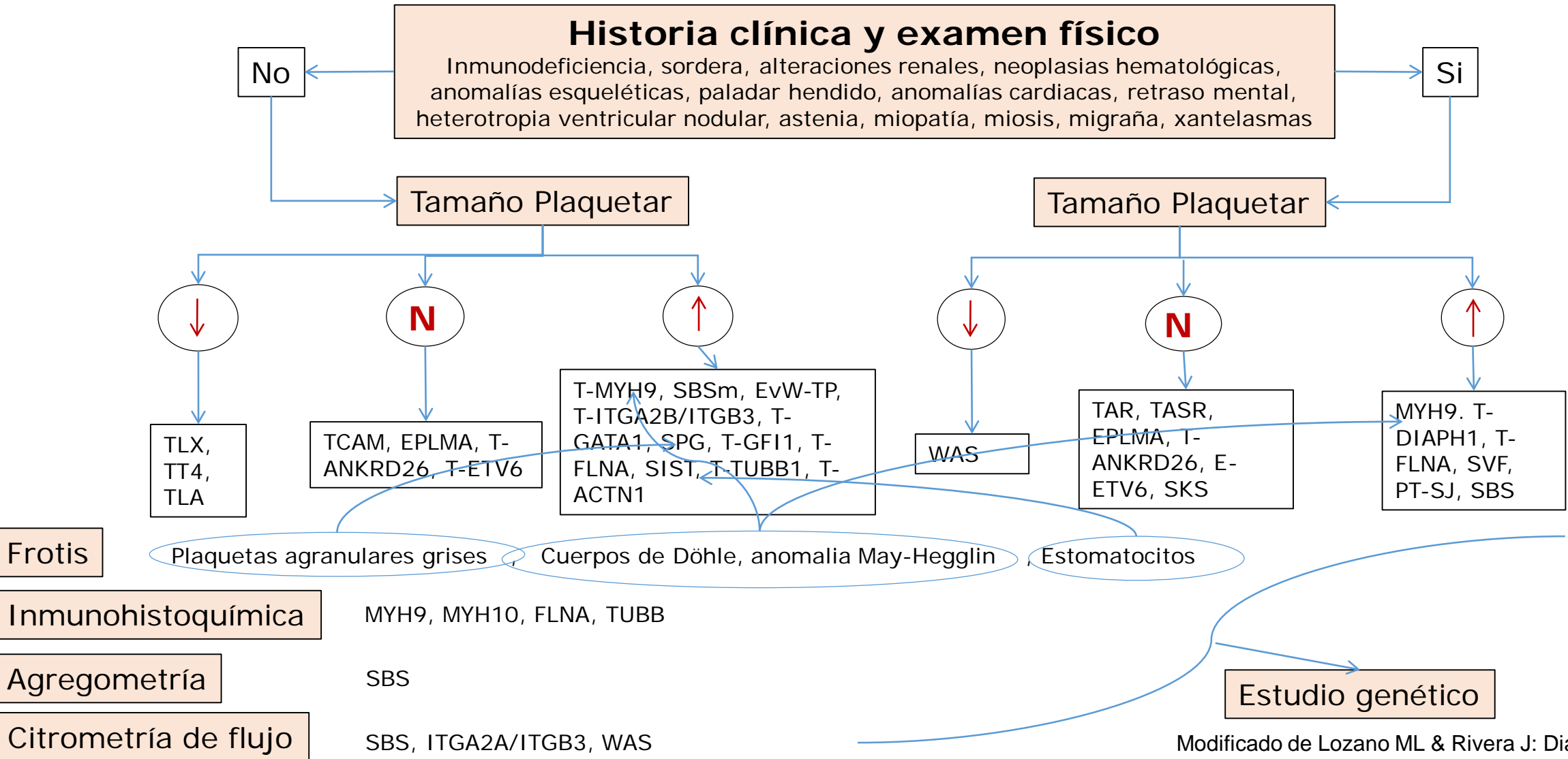
GP1BA
 EVW-TP

GP1BA / GP1BB / GP9
 Sd. Bernard Soulier

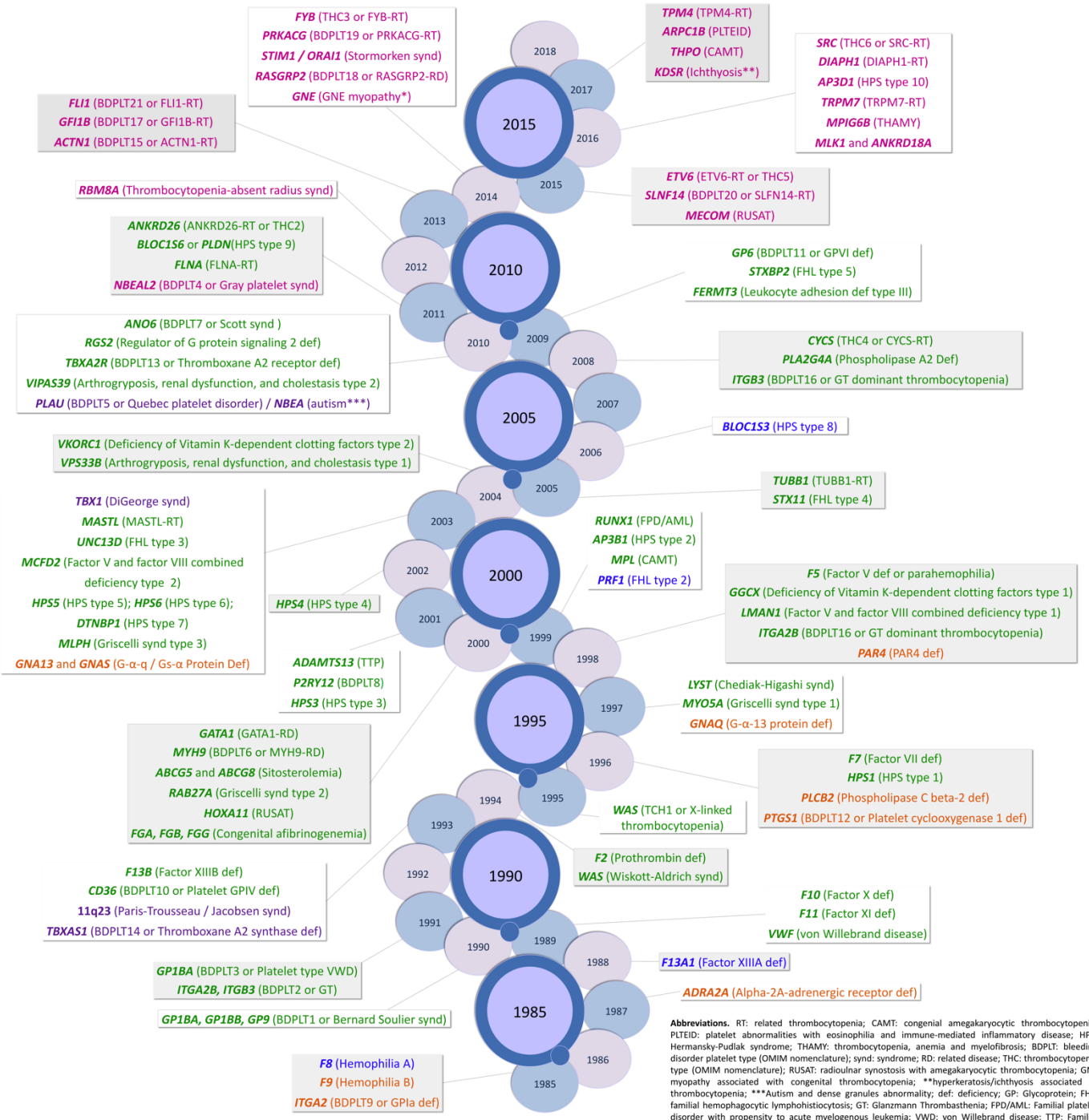
CD36 → R. Trombospondina

ITGA2 → Defecto R. Colágeno

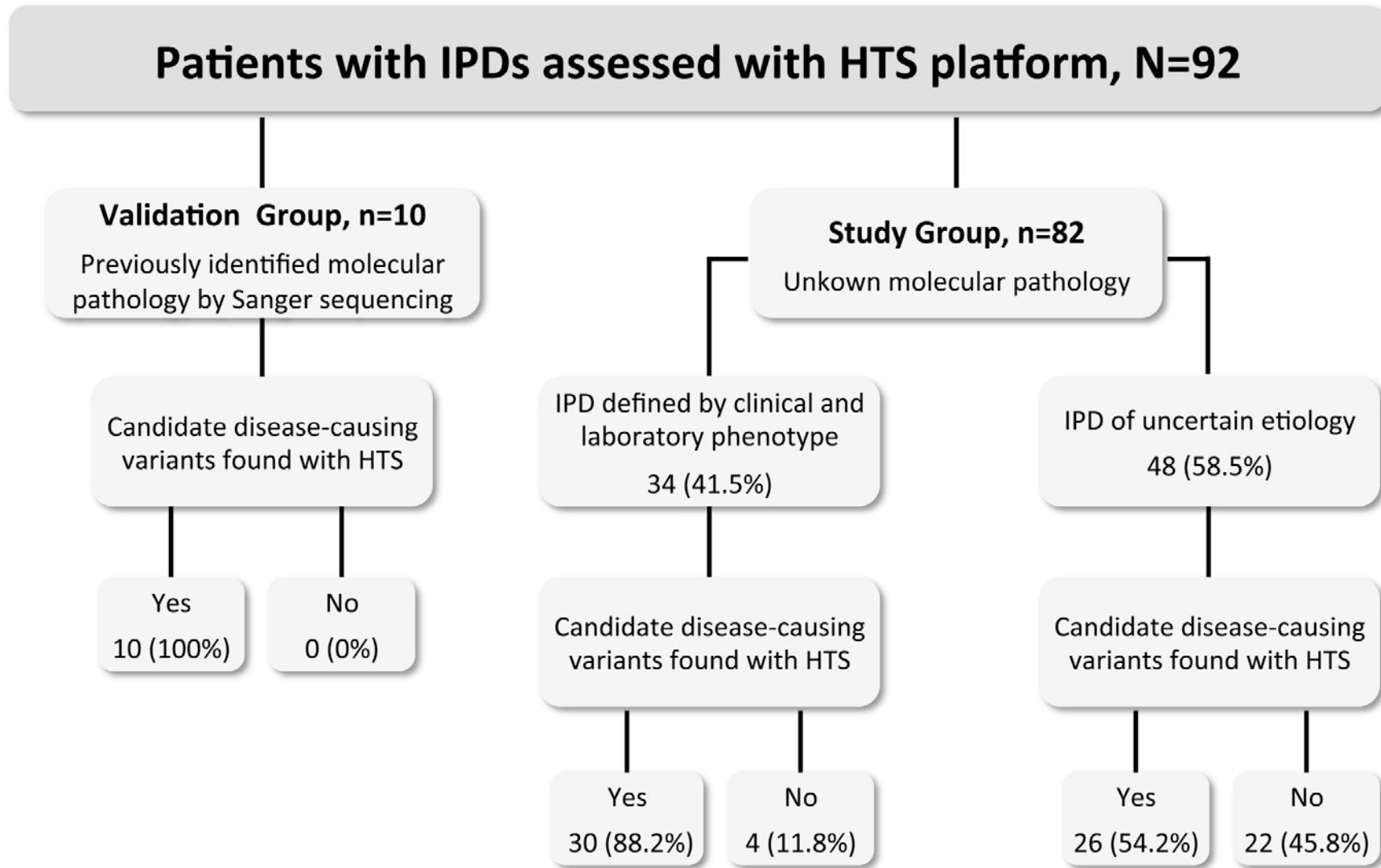
Algoritmo diagnóstico de la trombocitopenia hereditaria



Con la llegada de NGS... Genes descritos en coagulopatías congénitas hemorrágicas



Estudio nacional / Experiencia personal



Genética aplicada a TPC

1- Correlación genotipo – fenotipo: pronóstico / guías de manejo

2- Diagnóstico: confirmatorio / diagnóstico diferencial

3- Riesgos asociados / consejo genético

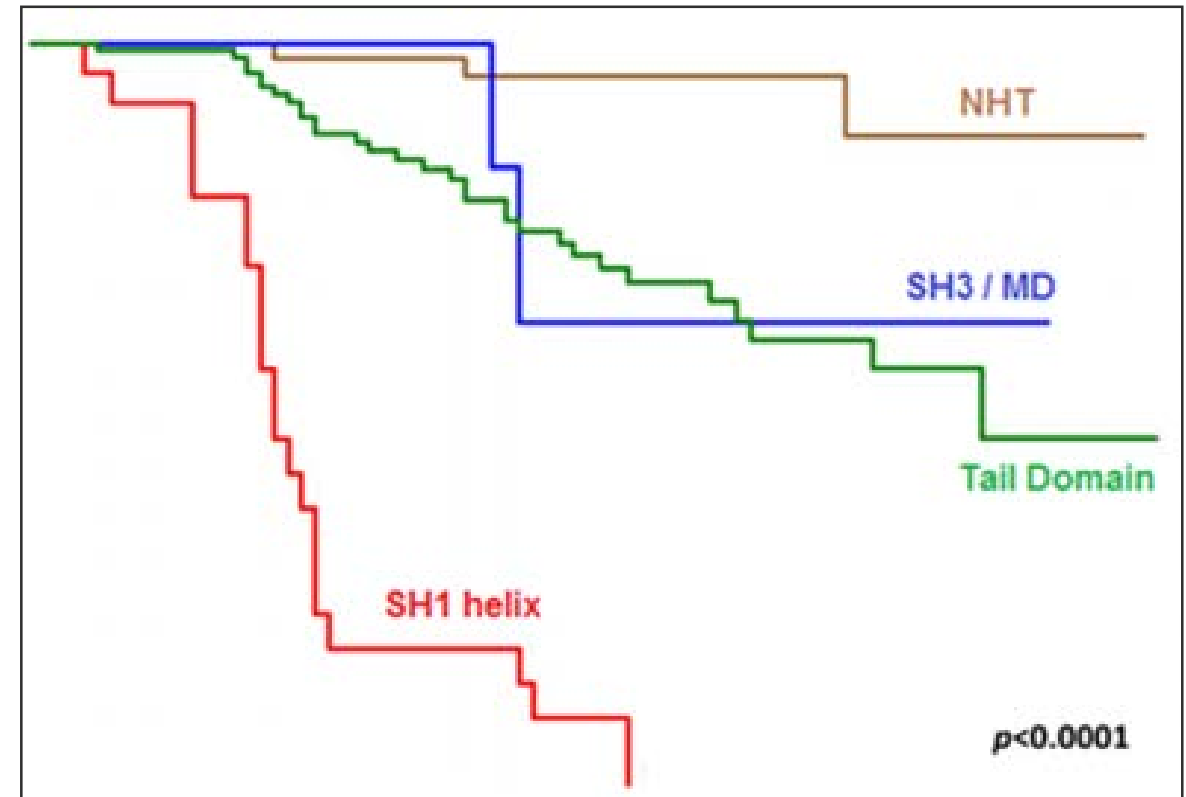
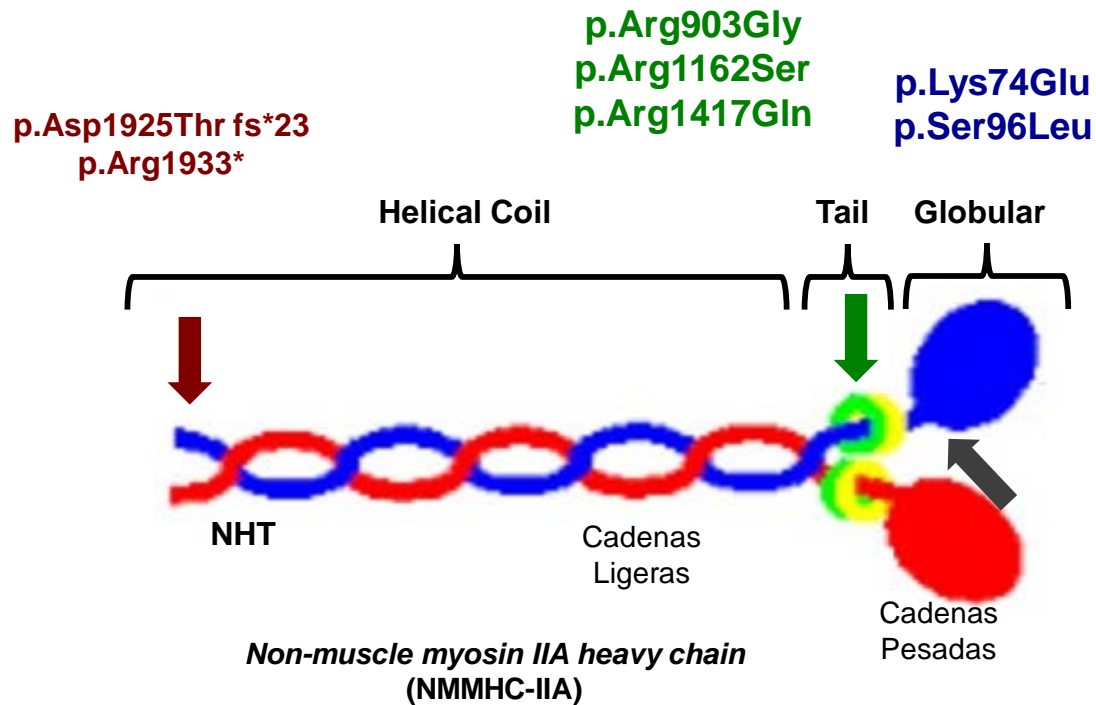
4- Nuevos patrones de herencia

5- Conocimiento científico → nuevos genes / nuevos trastornos

1. Correlación genotipo - fenotipo

- **Enfermedad relacionada con *MYH9*:** Sordera neurosensorial / Catarata / Nefropatía

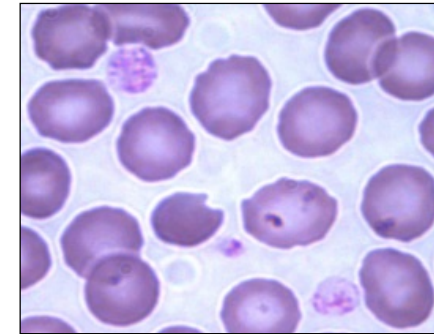
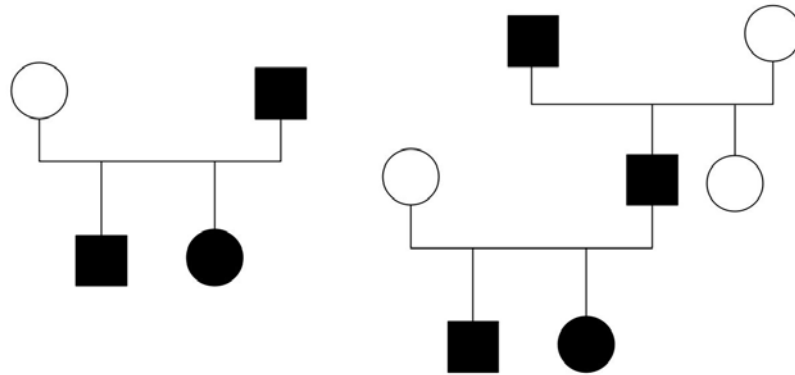
Supervivencia libre de complicación:



2. Diagnóstico diferencial y confirmado

- **Macrotrombocitopenias autosómico dominante → fenotipos solapados**

- **Macrotrombocitopenia AD + sordera neurosensorial → *MYH9-RD***

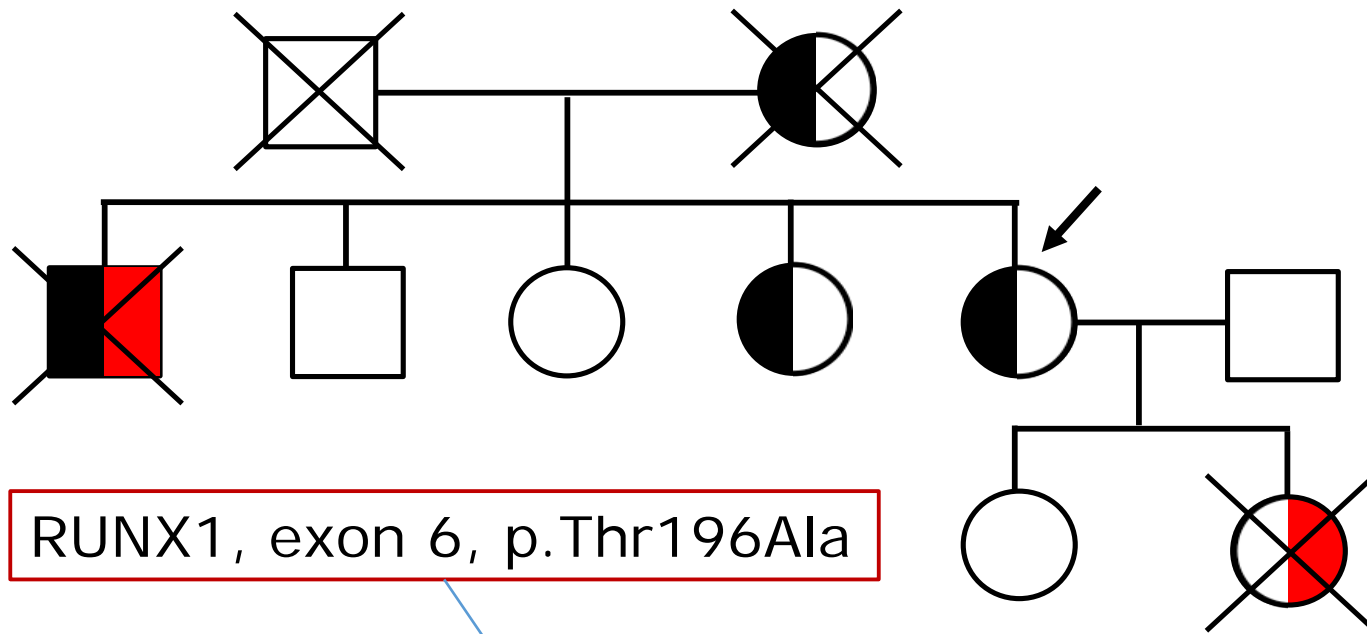


NO
Cuerpos Döhle

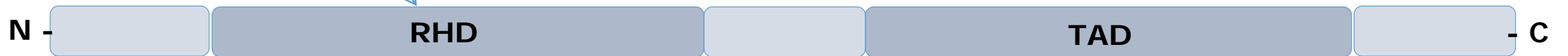
- **Enfermedad relacionada con *DIAPH1* (DIAPH1-RD)**

- R1213* → Proteína DIAPH1 → estabilidad citoesqueleto
- **Neutropenia fluctuante** (+ sordera + MCT AD)

3.- Trombocitopenia leve y antecedentes familiares de neoplasias hematológicas



- Mujer, 46 años
- P = 90 x10⁹/L
- VPM normal
- Herencia AD
- SMD del7q → TPH-DNE
- LMA



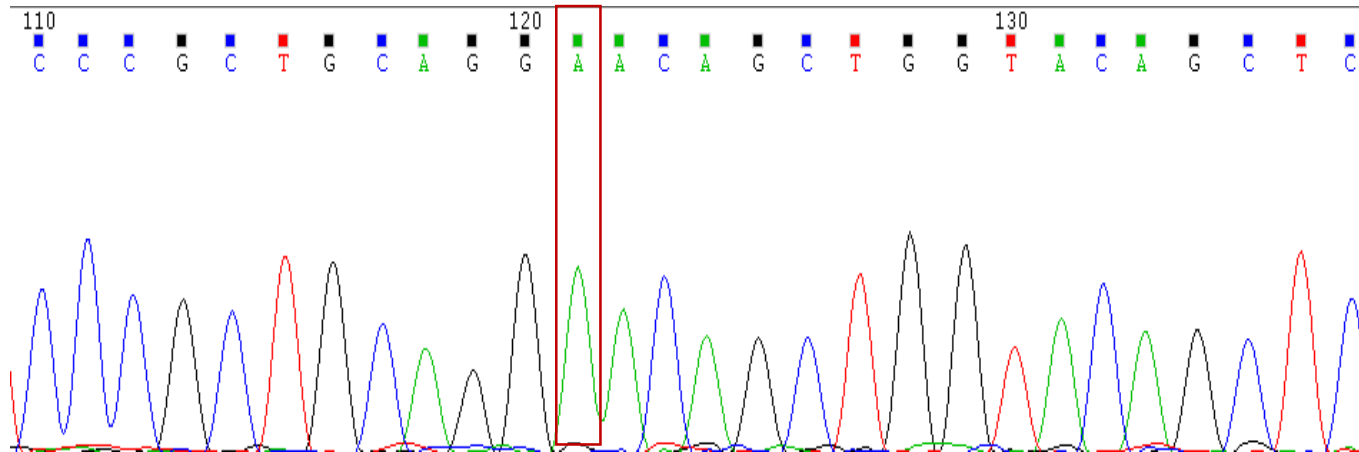
4. Cambios patrón de herencia

Gen (Locus)	Herencia conocida	Nuevo patrón herencia	Referencia
ITGA2B / ITGB3 (14q24)	AR = Trombastenia de Glanzmann (OMIM 273800)	AD = Macrotrombocitopenia (OMIM 187800)	<i>Ghevaert et al. Blood</i> 2008
GP1BA (17p13)	AR = Síndrome Bernard Soulier (SBS) (OMIM 231200)	AD = Variante Bolzano (OMIM 153870)	<i>Savoia et al. Blood</i> 2001 <i>Bastida JM et al. Haematologica</i> 2018
GP1BB (22q11)	AR = SBS (OMIM 231200)	AD = MacroTP (No OMIM)	<i>Sivapalaratnam S et al. Blood</i> 2017 <i>Bastida JM et al. Haematologica</i> 2018
FLI1 (11q23)	AD = del11q Paris-Trosseau (PT) (OMIM 188025)	AD: FLI1-RT (missense) AR: PT-like (missense) (OMIM 617433)	<i>Stockley et al. Blood</i> 2013 <i>Stevenson et al. Blood</i> 2015
GFI1B (9q34)	AD = GFI1B-RT (OMIM 187900)	AR: SPD (storage pool disease)	<i>Ferreira et al. Mol Genet Metab</i> 2017

Nuevo trastorno plaquetetario congénito

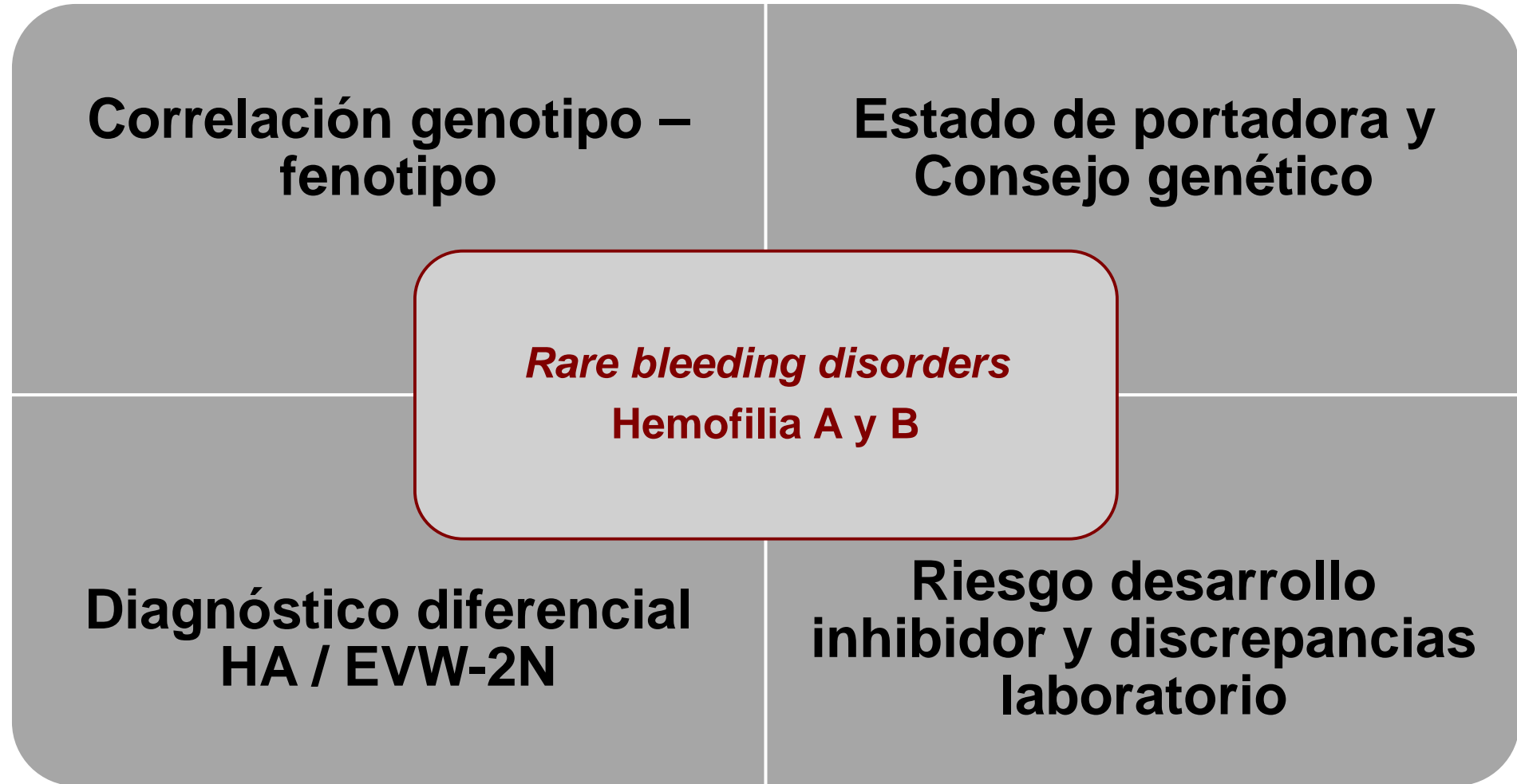
- Niño 9 años (asiático), consanguinidad
- Epistaxis + gingivorragias → UCI
- Sospecha Trombastenia Glanzmann (Agregación patológica + discordante CMF)
- Secuenciación masiva (Panel genes):

RASGRP2 exón 10; Ser381Phe

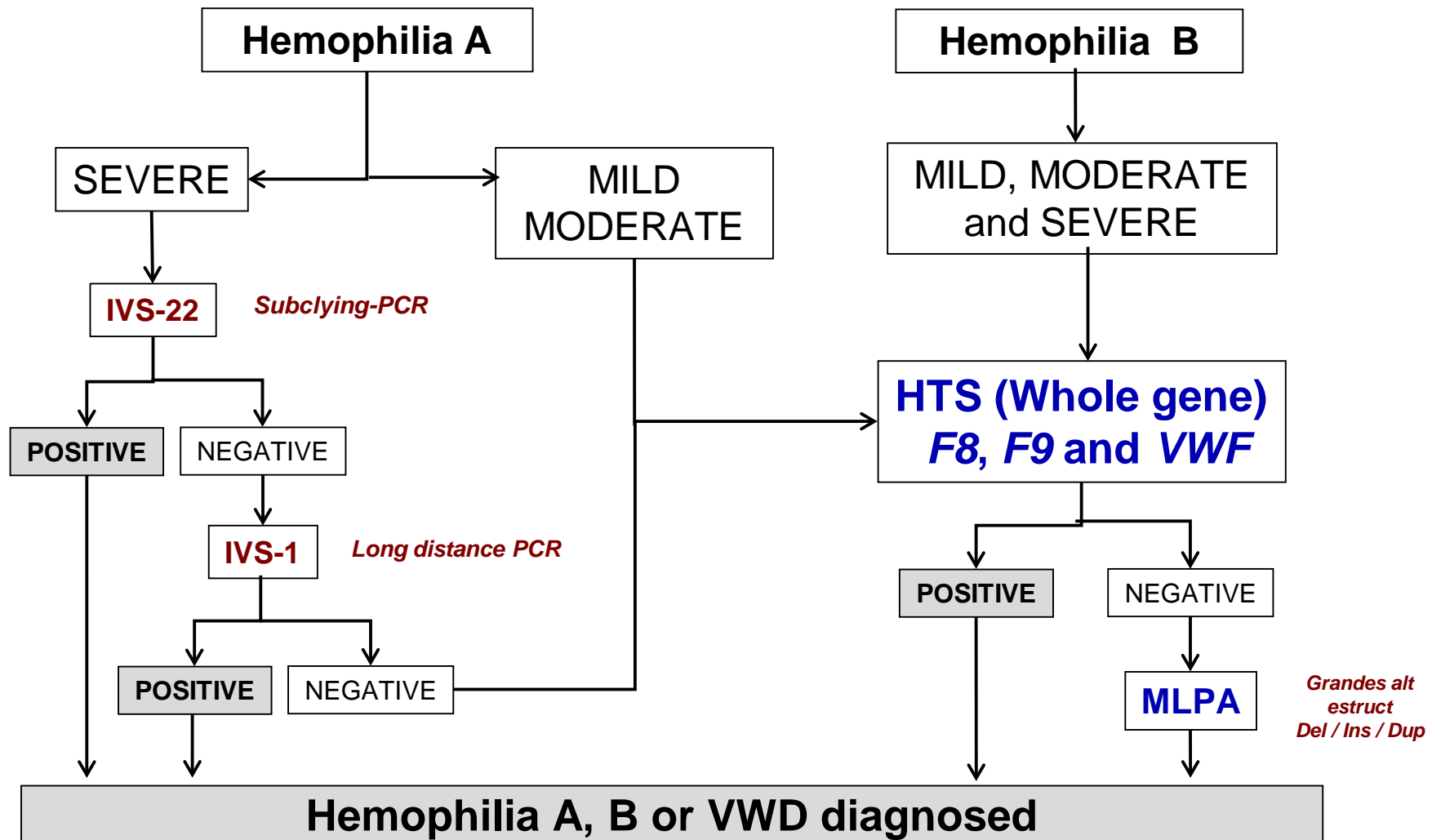


**Trombastenia
Glanzmann – like
(2º caso)**

Genética aplicada a coagulopatías



Algoritmo diagnóstico en hemofilia



Limitaciones / retos de NGS

- Clínica diaria
- Centros de referencia

Coste

**Patogenicidad
causalidad**

- Definición
- Relación
- Resultado neg

- Inversiones
- Translocaciones
- Cromosómicas
- Grandes In, Del
(>200pb)

**Alteraciones
estructurales**

**Bases de datos
Sistemas
bioinformáticos**

- Registros internacionales
- *Next-Generation*
- Modelos *in silico*

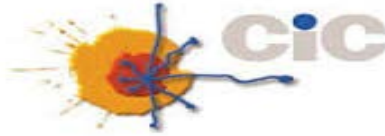
**Modelos
celulares y/o
animales**

- iPSC
- Knock-out / in
- Transgénesis
- CRISPR/Cas9

Conclusiones

- El conocimiento de las **alteraciones genéticas** de las **coagulopatías congénitas** es fundamental para nuestros **pacientes: mejor diagnóstico, seguimiento, pronóstico, tratamientos**
- La **secuenciación masiva** facilita su identificación
 - Es medicina de precisión

Agradecimientos



- Sara González
- Irene Rodríguez
- Raquel Hernández
- M^a Ángeles Sanz
- Carmen Gutiérrez
- Dra. María Díez-Campelo

- Jesús M Hernández-Sánchez
- Kamila Janusz
- Dra. Rocío Benito
- Dr. JM Hernández-Rivas



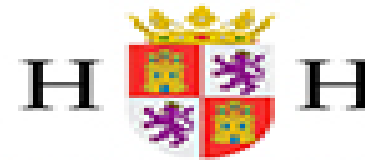
Dra. María L Lozano

Dr. José Rivera

Verónica Palma-Barqueros

José Padilla

Dr. Vicente Vicente



Grupo de Trombosis y Hemostasia CyL



Grupo español de patología hemorrágica

Financiación



GRS 1370/A/16



PI14/01956
PI17/010966