

3 Capítulo

Diagnóstico molecular en la hemostasia

Javier Corral de la Calle

PUNTOS CLAVE

- Estamos asistiendo a un cambio significativo en el diagnóstico molecular en hemostasia que permitirá determinar de forma rápida y económica la base molecular de la gran mayoría de desórdenes de la hemostasia.
- La secuenciación masiva es la metodología que sustituirá a los diagnósticos moleculares clásicos (genotipado, secuenciación Sanger, MLPA, transcriptómica, etc.).
- El reto es reducir el grado de incertidumbre de las variantes de significado incierto que se identifican con los métodos de secuenciación masiva, así como la interpretación conjunta de toda la información genética y su relación con los factores ambientales.

INTRODUCCIÓN

Los análisis de hemostasia han evolucionado drásticamente desde el tiempo de coagulación que se realizaba en el inicio del siglo XIX al diagnóstico molecular actual. De hecho, durante los últimos 30 años, hemos asistido a una revolución tanto en el conocimiento de la base molecular de la hemo-

tasia y sus desórdenes como en su abordaje metodológico. Y sobre todo ha sido vertiginosa la traslación de la información básica al diagnóstico y las utilidades terapéuticas derivadas (1).

El proyecto genoma humano nos permitió conocer en detalle todos los genes, incluidos los directamente relacionados con la hemostasia (coagulación y fibrinólisis, plaquetas y endotelio). Más recientemente, las estrategias de análisis masivo del genoma han identificado otros genes modificadores que influyen en fenotipos tanto de sangrado como de trombosis. Conocemos, por tanto, a la mayor parte de los actores con un potencial papel destacado en los desórdenes de la hemostasia.

En cuanto al desarrollo tecnológico, este ha sido tan sorprendente que en unos pocos años se ha conseguido un aumento exponencial de la capacidad de secuenciación, que simultáneamente ha reducido de forma muy significativa su coste (Figura 1). Así, en 2001 la secuenciación del genoma humano tardó varios años en completarse, implicó a 20 grupos y costó más de 100 millones de dólares. Sin embargo, en 2017 un genoma completo se secuenció en unos días, empleando un solo equipo y con un coste inferior a 1.000 €.

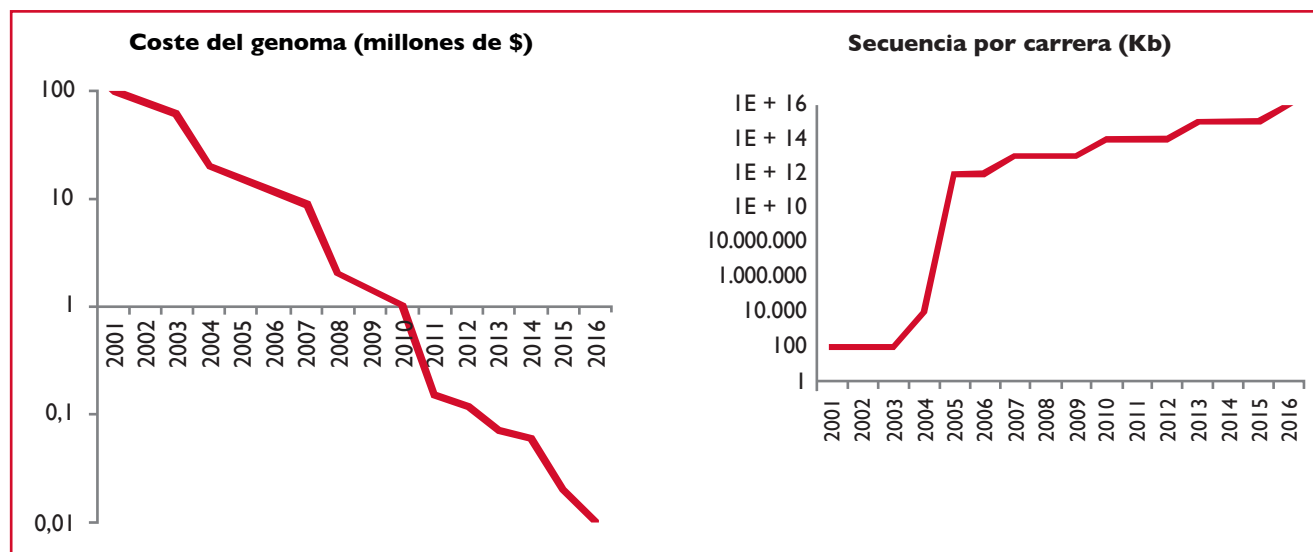


Figura 1. Evolución del coste y capacidad de secuenciación.

Disponemos de la capacidad de acceder a información genética de forma masiva, fiable, económica y rápida, y esta accesibilidad está revolucionando el diagnóstico molecular. Sin embargo, las nuevas técnicas de diagnóstico molecular también tienen aspectos negativos que deben conocerse, y que se tratan en este capítulo.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Clásicamente, el diagnóstico molecular se ha realizado a través de un estudio genético dirigido con diferentes opciones metodológicas dependiendo del tipo de alteración molecular o del material genético de partida que estemos analizando:

- Las alteraciones genéticas comunes como los polimorfismos protrombóticos (FV Leiden o protrombina G20210A) o alteraciones genéticas muy frecuentes en ciertas patologías (como la inversión del intrón 22 en hemofilia A), o en los casos de estudios familiares de alteraciones genéticas ya identificadas en el probando, el análisis molecular se puede realizar de forma dirigida a la variante genética específica. Los sistemas de genotipado suelen ser rápidos, económicos y muy específicos. Existen paneles de marcadores genéticos relacionados con la hemostasia que permiten un genotipado simultáneo de diferentes alteraciones genéticas (por ejemplo, trombofilias).
- Si el desorden que estamos estudiando puede estar causado por gran variedad de alteraciones genéticas dispersas en un gen, la opción más empleada actualmente es la secuenciación (normalmente de exones y regiones flanqueantes) del gen candidato que define el

fenotipo intermedio (por ejemplo el gen *SERPINC1* en pacientes con deficiencia de antitrombina). Esta aproximación genera una tasa de resultados positivos que no suele superar el 80 % de los casos con un fenotipo intermedio bien caracterizado. Esta metodología es más compleja, cara y especializada, por lo que no está generalizada en todos los hospitales.

- Las grandes anomalías genéticas (grandes deleciones, duplicaciones, inversiones o translocaciones) suelen ser raras en trastornos de la hemostasia, salvo ciertas excepciones. Estas alteraciones requieren métodos más específicos y especializados de detección: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), citogenética, hibridación *in situ* fluorescente (FISH); arrays de CGH (hibridación genómica comparada), etc.
- El estudio del transcriptoma puede aportar información destacada, no solo identificar alteraciones moleculares; también puede ayudar a descifrar el mecanismo molecular implicado y puede llegar a tener implicaciones pronósticas. Este análisis se puede realizar de forma dirigida a ciertos ácidos ribonucleicos (ARN) candidatos (tanto codificantes como no codificantes, como los mi-ARN), a grupos de transcritos, o al conjunto de ARN.
- La metodología de análisis genético masivo (paneles de genes, exoma, genoma completo o ARN-seq) es, sin duda, el futuro en el diagnóstico molecular; también en hemostasia. Estos métodos han identificado nuevas alteraciones y mecanismos moleculares implicados en diferentes patologías. Se trata de aproximaciones cuya máxima eficacia en términos de coste (tanto de tiempo como económico) como de interpretación de resulta-

dos posiblemente sean mayores si se realizan por unidades externas con gran desarrollo tecnológico y alta capacitación bioinformática.

CONTROL DE CALIDAD

Un elemento clave para garantizar un eficaz diagnóstico molecular es optimizar la purificación de los ácidos nucleicos que van a ser analizados (2). En hemostasia, dado que el acceso al tejido que produce muchos elementos es inviable (hígado o endotelio), la mayoría de estudios moleculares se realiza con ADN (la excepción son las plaquetas). En todas las aproximaciones, pero especialmente en las nuevas metodologías de secuenciación masiva, obtener ADN o ARN de calidad y en cantidad suficiente de cada paciente es el principal elemento que se debe tener en cuenta. Es aconsejable realizar una purificación de sangre anticoagulada en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), validar la calidad del ADN y almacenarlo congelado. También es recomendable disponer de material genético (con información analítica y clínica cuanto más completa mejor) de familiares directos de los pacientes, pues facilitarán el estudio molecular masivo.

ENFERMEDADES MONOGÉNICAS

Engloban enfermedades habitualmente raras y de abordaje molecular relativamente sencillo, ya que el mayor peso patogénico se concentra en un solo gen. Pueden tener carácter dominante o recesivo, por lo que la identificación de alteraciones genéticas relacionadas con la enfermedad se encontrará en uno (heterocigoto) o en los dos alelos (homocigoto o heterocigoto compuesto). En la mayoría de las enfermedades monogénicas, tanto hemorrágicas como trombóticas (Tabla I), existen genes candidatos cuya secuencia (restringida a exones y regiones codificantes) revela la alteración responsable en el 60-95 % de los casos con diagnóstico analítico. Es importante destacar que existen ejemplos de fenotipos clínicos o intermediarios que pueden tener una base molecular monogénica pero pueden ser diferentes los genes implicados, como ocurre en la deficiencia de fibrinógeno o en el síndrome de Hermansky-Pudlak (Tabla I). En la mayoría de las enfermedades el gen candidato es el que codifica una proteína implicada directamente (ejemplo, *PROC* en la deficiencia de proteína C), pero existen desórdenes de la hemostasia en los que el defecto molecular se localiza en otros genes implicados en modificaciones postraduccionales (N-glicosilación y deficiencia de antitrombina o gamma carboxilación en los defectos combinados de proteínas vitamina K dependientes) o en procesos implicados en el plegamiento

y tráfico intracelular (como chaperones en la deficiencia combinada de FV y FVIII) (3-5). Los nuevos métodos de secuenciación masiva están aumentando exponencialmente este listado, especialmente en el capítulo de desórdenes congénitos plaquetarios (Tabla I).

También se han identificado genes moduladores implicados en la heterogeneidad fenotípica y clínica de los desórdenes implicados (6). Por esta razón, incluso en patologías monogénicas, un abordaje no dirigido va cobrando cada vez mayor protagonismo dado que puede aportar una información genética global que explique con mayor precisión las observaciones de laboratorio y clínicas de cada paciente, en un intento de conseguir una verdadera medicina personalizada.

ENFERMEDADES COMPLEJAS

En este grupo de enfermedades se incluye la mayoría de los casos con trombosis, y quizás los trastornos hemorrágicos sin causa (o fenotipo intermediario) conocida. La base molecular de las enfermedades complejas es poligénica y multifactorial, con un conjunto de alteraciones genéticas de bajo peso patogénico que interaccionan entre sí y con factores ambientales. Los polimorfismos protrombóticos FV Leiden, protrombina G20210A o el grupo ABO son excelentes ejemplos para la trombosis venosa (7), y posiblemente existan muchos más con menor peso como han demostrado los estudios de GWAS (*Genome-wide Association Study*) (8). Aunque hay sistemas de genotipado dirigido para las alteraciones moleculares con mayor peso validado, su identificación aislada tiene escasa utilidad clínica. La esperanza en este campo reside en conocer toda la variabilidad genética de cada persona y contar con algoritmos predictores capaces de definir el riesgo individual. Desgraciadamente estamos todavía lejos de conseguir integrar toda la información y desarrollar sistemas de predicción fiables. Y una de las razones es que nos hemos enfocado en la identificación de elementos protrombóticos, sin apenas dedicar esfuerzo a la identificación de variaciones genéticas protectoras, que sin duda también existen y contribuyen al riesgo de cada persona de sufrir una enfermedad compleja e incluso monogénica (9). En hemostasia este aspecto es clave, pues el desequilibrio hemostático es tanto causa de patologías como potencial herramienta de corrección de otras, como ha demostrado el beneficio antihemorrágico de la depleción de antitrombina en hemofilia (10) o los polimorfismos protrombóticos (11) y la protección antitrombótica de la deficiencia de factor XI (FXI) (12). Por último, a la hora de definir el riesgo de cada perfil genético hay que integrar el peso que tienen (tanto positivo como negativo) los factores ambientales y desencadenantes (Figura 2).

Tabla I
Genes implicados en los principales desórdenes de la hemostasia

		Gen candidato
Coagulopatías		
Deficiencia FII		F2
Deficiencia FV		F5
Deficiencia FVII		F7
Deficiencia FVIII		F8
Deficiencia FIX		F9
Deficiencia FX		F10
Deficiencia FXI		F11
Deficiencia FXIII		F13
Deficiencia FvW		FvW
Deficiencia FV y FVIII		LMAN1/MCFD2
Deficiencia PVKD		GGCX/VKORC1
Deficiencia fibrinógeno		FGA/FGB/FGG
Trombofilias		
Deficiencia antitrombina		SERPINC1
Deficiencia proteína S		PROS1
Deficiencia proteína C		PROC
Disfunción protrombina		F2
Desórdenes plaquetarios		
<i>Trombopenia</i>		
Tamaño plaqueta normal		C-MPL/ HOXA11/ MECOM/ ETV6/ CYCS/ RBM8A/ RUNX1/ ANKRD26/ SLFN14
Tamaño plaqueta grande		GPIBA/ GPIBB/ GP9/ ITGA2B/ ITGB3/ TBX1/ FLI1/ GATA1/ GF11B/ NBEAL2/ MYH9/ ABCG5/ ABCG8/ FLNA/ SCR/ TUBB1/ ACTN1/ DIAPH1 / PRKACG
Tamaño plaqueta pequeño		WAS/ FYB
<i>Trombocitopatías</i>		
Defecto receptor	Síndrome Bernard-Soulier/enfermedad de tipo plaquetario	GPIBA /GP9 /GPIBB
	Trombastenia de Glanzman	ITGA2B/ ITGB3
	Receptor ADP (adenosín difosfato)	P2Y12
	Receptor TxA2	TBXA2R
	Receptor colágeno	GP6
Defecto gránulos	Síndrome de plaqueta gris	NBEAL2/ GF11B
	Síndrome de Quebec	PLAU
	Síndrome de Hermansky-Pudlak	HPS 1-10
	Síndrome de Chediak-Higashi	LYST
	Síndrome de Griscelli	RAB27/ MYO5A/ MLPH
Otras	Trasmisión señal	PTGS1/ TBXAS1/ PLA2G4A GNAS/ GNAQ/ GNAZ/ GNAI1 RASGRP2
	Actividad procoagulante	ANO6/ STIM1/ ORA1

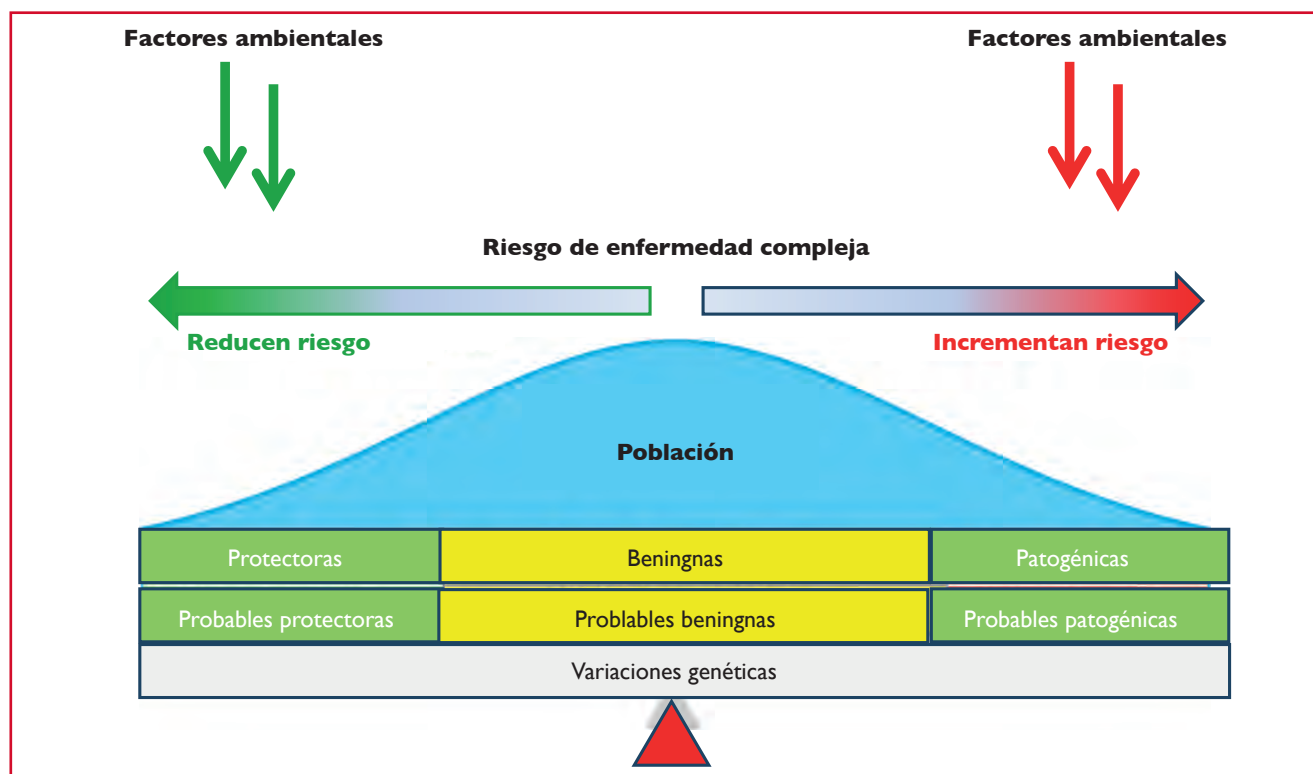


Figura 2. Secuenciación masiva, posibilidades, fortalezas y debilidades.

La comparativa entre los nuevos sistemas de secuenciación y la secuenciación clásica empleada hasta la fecha se muestra en la tabla II.

Las ventajas de la secuenciación masiva indican que estos sistemas serán los que en un futuro más cercano que lejano se empleen para el diagnóstico molecular de todas las enfermedades, incluidos los desórdenes de la hemostasia. De hecho, lo ideal será disponer de la información global del genoma de cada paciente, que se analizará atendiendo a las manifestaciones clínicas o resultados analíticos que se recojan en cada momento. Esta aproximación, que incluso en la actualidad ya no supone un coste desmedido (1.000 €), ahorrará multitud de estudios genéticos.

No obstante conviene destacar las limitaciones de esta prometedora metodología de estudio molecular:

1. En primer lugar, la tasa de errores de secuenciación, aunque se ha mejorado considerablemente, precisa de validación empleando justamente la tecnología de secuenciación clásica.
2. En segundo lugar, existen algunas alteraciones moleculares, cada vez menos, que no son fáciles de identificar con los sistemas de secuenciación masiva.
3. En tercer lugar, y quizás la limitación más importante, los sistemas de secuenciación masiva (hablamos de genoma o exoma) identifican miles de alteraciones

Tabla II
Comparativa entre la secuenciación Sanger y la secuenciación masiva (NGS)

	Sanger	NGS
<i>Estrategia</i>	Reacciones separadas para los distintos exones de un solo gen	Una reacción para el análisis simultáneo de varios genes
<i>Muestras</i>	Clones, amplicones de PCR	Librerías de DAA (o cADN), genoma completo
<i>Longitud de lectura</i>	Kb	Gb
<i>Datos</i>	Una lectura/muestra	Miles-millones de lecturas/muestra
<i>Resolución</i>	Muchas moléculas en la misma lectura	Una molécula por lectura
<i>Ventaja</i>	Elevada precisión	Buena relación coste/beneficio Análisis simultáneo y masivo
<i>Desventaja</i>	Caro y consume tiempo	Análisis de gran cantidad de datos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

moleculares en cada paciente. La gran mayoría de estas alteraciones son benignas y disponemos de herramientas que nos permiten su filtro. Son pocas las alteraciones moleculares en las que se conoce con claridad su efecto patogénico; y sin embargo, una gran cantidad significativa de alteraciones moleculares no sabemos si tienen efecto funcional y si este puede tener consecuencias patológicas: son las variantes de significado incierto. Es necesario desarrollar nuevos sistemas de predicción del efecto de cada mutación que se identifique, y sobre todo, disponer de recursos experimentales que permitan aclarar si una alteración identificada en un paciente es funcional y puede estar implicada (y con qué peso) en el desarrollo de una enfermedad. Los sistemas de edición génica se plantean como interesantes herramientas en este sentido. Pero, no obstante, queda un largo camino que andar para conseguir un avance significativo en este campo.

4. Los análisis moleculares no deben, especialmente a fecha de hoy, inducir a pensar que se deban aban-

donar los métodos de coagulación clásicos o los sistemas analíticos más modernos (inmunológicos, cromogénicos, fluorogénicos, etc.). La correcta y completa caracterización de cualquier desorden obligatoriamente lleva implícito un buen análisis molecular, un estudio funcional bioquímico y una detallada descripción clínica, no solo del paciente, sino también de sus familiares.

5. Y finalmente, hay importantes connotaciones éticas que deben discutirse y, sobre todo, conocerse por parte de los investigadores y médicos que empleen estos nuevos métodos. Al ser sistemas de secuenciación no dirigida, estos métodos identificarán alteraciones genéticas implicadas en otras patologías diferentes de la investigada. La actitud que se ha de tomar ante estos descubrimientos, incluso la forma de abordar el estudio de los resultados de estos métodos, tiene todavía que discutirse en detalle y con sosiego, especialmente en lo referente al consejo genético que deba hacerse al paciente (Figura 3).

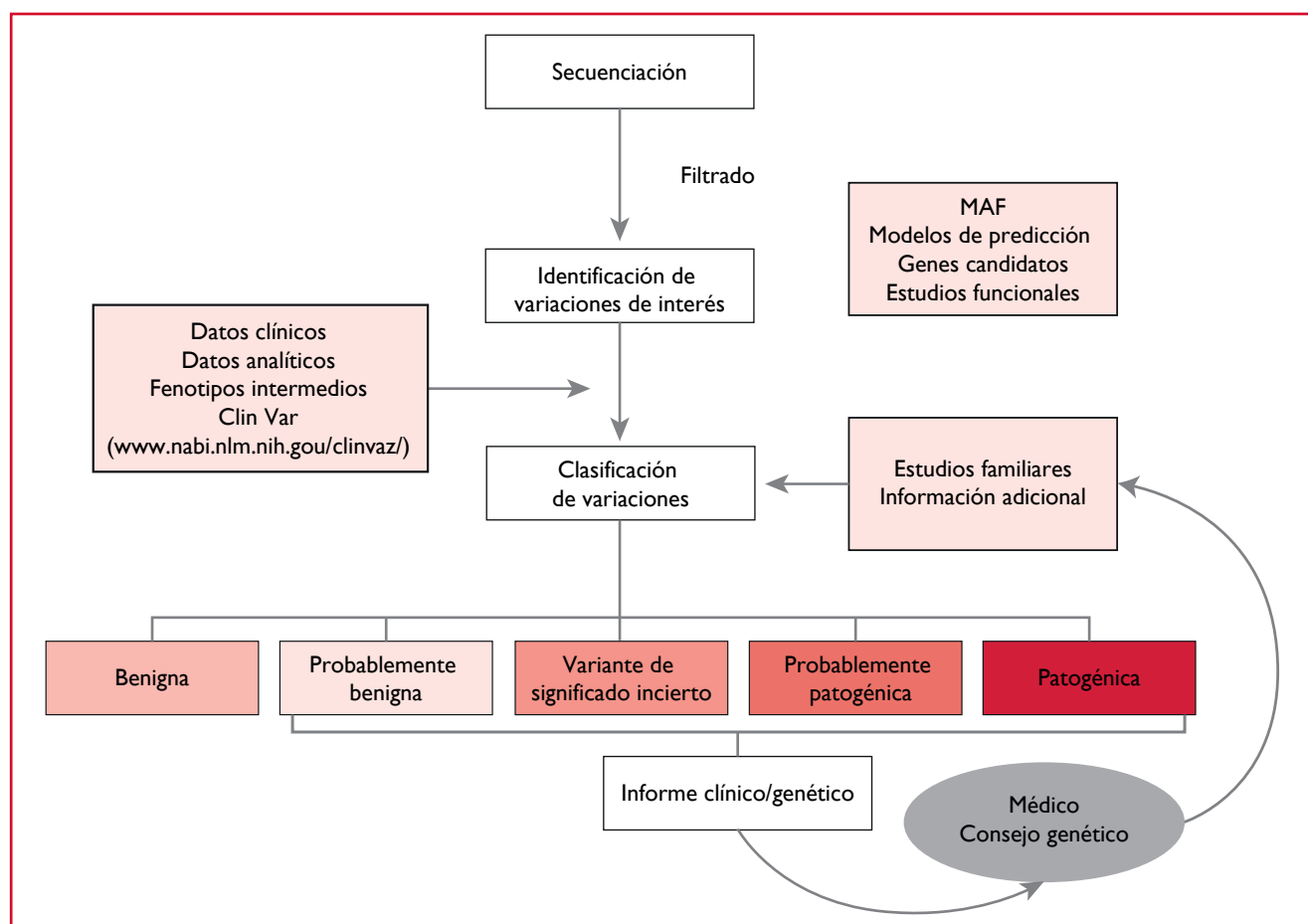


Figura 3. Interpretación de variantes genéticas. Flujo de análisis en el laboratorio clínico.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El microscopio en 1590 era como la tomografía axial computarizada) TAC en 1972 o la PCR en 1985. Sin embargo, todos estos “avances” en su época son habituales en casi todos los hospitales en el momento actual. Algo similar ocurrirá para los métodos de secuenciación masiva. Debemos prepararnos para su implantación, pues es absolutamente seguro tendremos que emplearlos.

Las posibilidades y facilidades que estos métodos aportarán son ciertamente enormes. Sin duda, serán la piedra angular de la medicina personalizada que proporcione a los médicos un conocimiento preciso de la fisiología, un diagnóstico más refinado, una definición precisa del riesgo de una enfermedad, una detección precoz y una mejor monitorización, y la elección de tratamientos ajustados para cada paciente, también en el campo de la hemostasia y sus desórdenes. Pero, no obstante, no podemos caer en el error de considerar que estos estudios serán definitivos y únicos, al menos a corto plazo. Actualmente estos métodos tienen limitaciones que van desde los errores de secuenciación o la detección de ciertas anomalías a los problemas comunes con cualquier otro método analítico (quizás acentuado por la sensibilidad de estos sistemas), como los errores de trazabilidad, calidad técnica, contaminaciones, etc., hasta limitaciones específicas como la ausencia de evidencia patológica para la gran mayoría de alteraciones genéticas que detectan y las implicaciones éticas de los resultados obtenidos, cuya resolución todavía puede llevar algún tiempo. Un estudio molecular de calidad debe estar complementado por un estudio básico de coagulación, una caracterización completa de los fenotipos intermedios asociados y una completa información clínica y familiar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lillicrap D. Molecular testing for disorders of hemostasis. *Int J Lab Hematol* 2013;35:290-6.
2. Huang LH, Lin PH, Tsai KW, et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One* 2017;12:e0184692.
3. Dasi MA, González-Conejero R, Izquierdo S, Padilla J, García JL, García Barberá N, et al. Uniparental disomy causes deficiencies of vitamin K-dependent proteins. *J Thromb Haemost* 2016;14:2410-8.
4. De la Morena-Barrio ME, Martínez-Martínez I, de Cos C, Wypasek E, Roldán V, Undas A, et al. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J Thromb Haemost* 2016;14:1549-60.
5. Peyvandi F, Kunicki T, Lillicrap D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood* 2013;122:3423-31.
6. Westrick RJ, Ginsburg D. Modifier genes for disorders of thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl 1):132-5.
7. Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol* 2014;11:140-56.
8. Germain M, Chasman DI, de Haan H, Tang W, Lindström S, Weng LC, et al. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. *Am J Hum Genet* 2015;96:532-42.
9. Schwartz MLB, Williams MS, Murray MF. Adding Protective Genetic Variants to Clinical Reporting of Genomic Screening Results: Restoring Balance. *JAMA* 2017;317:1527-8.
10. Pasi KJ, Rangarajan S, Georgiev P, Mant T, Creagh MD, Lissitchkov T, et al. Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy. *N Engl J Med* 2017;377:819-28.
11. Corral J, Iniesta JA, González-Conejero R, Villalón M, Vicente V. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001;97:2979-82.
12. Büller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, et al. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med* 2015;372:232-40.