

Biología plaquetaria y endotelial

COORDINADORES: J. CESAR. *Madrid*
J. VALLÉS. *Valencia*

Presentación

El simposio del año actual ha perseguido, como es habitual, presentar temas de actualidad, procurando abarcar aspectos básicos y clínicos que sean capaces de atraer a una mayoría de profesionales con interés en este apasionante campo de la hematología. Con la seguridad que la ponencia que expondrá el doctor Gawaz tendrá un contenido atractivo y novedoso, la lectura del tema que presentará la doctora Maribel Díaz-Ricart entusiasma porque, no sólo ha sabido recoger las experiencias personales de su grupo sobre la afectación del endotelio en diferentes patologías, sino que nos recuerda que esa parcela del organismo es un gran desconocido que participa activamente en los procesos que afectan a la salud. La escasez de conocimientos que tenemos actualmente sobre el endotelio vascular y su relación con el medio en el que se ubica, así como la carencia de marcadores que permitan examinar su estado, son el principal lastre para progresar en su estudio. En esta ponencia se exponen los conocimientos de la afectación del endotelio en diferentes patologías. Se analiza cómo el daño endotelial por los productos tóxicos acumulados en los pacientes con insuficiencia renal crónica puede contribuir al desarrollo de aterosclerosis. Cómo la obesidad condiciona un estrés oxidativo que condiciona una disfunción de la célula endotelial con cambios en receptores de adhesión e incremento de la trombogenicidad. Analiza también las alteraciones del endotelio en los estadios iniciales del trasplante hematopoyético, así como en otras patologías como hipertensión o diabetes.

En el aspecto diagnóstico del simposio, el doctor Ribera hace una magnífica introducción sobre las diferentes entidades constitucionales que se caracterizan por una disfunción de las plaquetas. Defectos de receptores, ya para proteínas adhesivas, o para agonistas solubles, alteraciones en la transmisión del mensaje que resultan en una incapacidad secretora o adhesiva, o falta de gránulos conteniendo elementos de apoyo para la actividad plaquetaria, son las principales causas de una patología que se expresa clínicamente en un sangrado mucocutáneo de temprana aparición. La buena recogida de esta expresividad clínica es, como dice en su ponencia, fundamental para sospechar un diagnóstico que debe establecerse con un exhaustivo examen analítico de la función plaquetaria y de la competencia de la hemostasia, para completarse con estudios de biología molecular. Esta ponencia presenta además, por primera vez, un análisis de la situación del diagnóstico de las trombopatías congénitas en España. La dificultad de este procedimiento queda reflejada en sus datos. De los 700 pacientes considerados como portadores de una trombopatía congénita en nuestro país, un 40% carecen de una filiación concreta de la disfunción plaquetaria.

El doctor Pascual Marco cerrará el simposio con un tema eminentemente clínico, de notoria actualidad y que nos va a generar numerosas consultas en los años venideros. Como inicia en su introducción, muchos pacientes van a necesitar terapias que asocien un antitrombótico y un fármaco antiplaquetario. Nuestra experiencia se restringe a combinaciones de un fármaco antivitaminas K (AVK) y ASA, mucho menos una tienopiridina. El reto que viene es el progresivo reemplazo de los fármacos AVK por nuevos antitrombóticos, ya sea una antitrombina oral o un inhibidor del factor Xa. La principal pregunta es si se incrementará el riesgo hemorrágico en un contexto nuevo, la ausencia de antídoto. Esta ponencia analiza la bibliografía disponible y dará la respuesta, con las limitadas evidencias que tenemos, a estos nuevos aspectos.

POSIBLE UTILIDAD DE LA COMBINACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIPLAQUETARIOS Y LOS NUEVOS ANTICOAGULANTES ORALES

P. MARCO, E. MORA, A. MARCO, J. LUCAS

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Hospital General Universitario de Alicante.
Universidad Miguel Hernández. Alicante*

Aunque la fibrilación auricular (FA) constituya la patología cardíaca más prevalente y la principal causa de indicación del tratamiento anticoagulante, algunos pacientes identificados como de alto riesgo para padecer enfermedad isquémica cerebral necesitan la asociación de antiagregantes plaquetarios a los anticoagulantes tipo antivitaminas K para mejorar su eficacia, aunque considerando que también aparecerán mayor número de complicaciones hemorrágicas. Por otro lado, los avances en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos (SCA) permiten mejorar la supervivencia de los pacientes y su calidad de vida.

Hay situaciones clínicas en las que un paciente con FA padece un SCA y deberá recibir tratamiento combinado de una antivitamina K y doble antiagregación, habitualmente ácido acetilsalicílico (AAS) y clopidogrel. Se calcula que aproximadamente un 10% de los pacientes con indicación de anticoagulación a largo plazo pueden precisar una terapia de revascularización cardíaca y, por ende, la asociación de dos antiplaquetarios. Las publicaciones acerca de esta triple terapia suelen corresponder a estudios retrospectivos, con resultados contradictorios⁽¹⁾. Sin embargo, una revisión de la literatura de Rubboli *et al.*⁽²⁾ nos muestra, aunque con datos muy limitados, que la eficacia superaría la seguridad, excepto en pacientes previamente catalogados de alto riesgo de sangrado. No obstante, la mayoría de los pacientes tenían indicación de triple terapia por periodos no superiores a 3 meses, por lo que la comparación de sangrados con otras modalidades de tratamiento no aporta diferencias estadísticamente significativas. En realidad, de la literatura se extrae la conclusión de que los pacientes con más episodios de sangrado corresponden a los de edad avanzada o a los que padecen patología gastrointestinal, y que la indicación debe ser personalizada, tras una adecuada valoración del riesgo⁽³⁾.

La aparición reciente de los nuevos anticoagulantes orales no antivitaminas K (antitrombóticos directos o anti-factor X activado), entre cuyas ventajas está el perfil farmacocinético estable, menor interacción con otros fármacos y no precisar monitorización "frecuente", abre una nueva opción para este grupo de pacientes de riesgo.

El dabigatran es un antitrombótico directo, que ha desarrollado un programa de investigación clínica en cirugía ortopédica de alto riesgo, tromboembolismo venoso, FA y SCA⁽⁴⁾. También está soportado por estudios farmacocinéticos y análisis de las interacciones farmacológicas, especialmente con el AAS y con el clopidogrel. Estos estudios de farmacocinética que asocian dabigatran y AAS o dabigatran y clopidogrel muestran cambios en los parámetros farmacocinéticos, aunque los autores consideran que no tienen significado clínico^(5,6). Conclusiones similares se deducen de estudios de interacción con diclofenaco. En el laboratorio no se ha observado efectos aditivos sobre la función plaquetaria cuando se han asociado ASS, clopidogrel o diclofenaco⁽⁵⁾.

El estudio *PETRO*, un fase II publicado en 2007⁽⁷⁾, es la primera evaluación de dabigatran en pacientes con FA a dosis escaladas, comparado con warfarina. Los pacientes se clasificaron en 10 grupos de tratamiento, en los que se combinaban, en dosis diferentes del fármaco en estudio, con AAS a dosis de 81 mg y/o 325 mg una vez al día, y se comparaban con warfarina sola a INR (cociente internacional normalizado) 2-3. Las hemorragias mayores se observaron en los pacientes que recibían 300 mg de dabigatran 2 veces al día y AAS. En estos pacientes, el comité decidió suspender el AAS. Sin embargo, con las otras dosis de dabigatran no se observó mayor número de sangrados dependientes de la asociación o no de AAS, a pesar que los pacientes que combinaron ambos fármacos mostraban descensos significativos de la excreción de tromboxano B2. Más recientemente, el estudio *RE-DEEM*⁽⁸⁾ estudia el efecto de la asociación de dabigatran a diferentes dosis con AAS y clopidogrel en 1.878 pacientes con SCA durante 6 meses. Los resultados indican que la asociación de los 3 fármacos con dosis crecientes de dabigatran comparado con placebo suponía un incremento de los sangrados, siendo más significativos a dosis más altas de dabigatran (110 y 150 mg 2 veces al día), aunque se observaba una disminución de la actividad de la hemostasia. Los autores concluyen en la necesidad de hacer un ensayo en fase III para analizar el balance eficacia/seguridad.

Por otro lado, en el análisis de subgrupos del estudio *RE-LY*⁽⁹⁾, considerando que el 40% de los pacientes incluidos tenían asociación con ASS, no se observaron diferencias significativas en cuanto a seguridad entre los pacientes que llevaban AAS respecto a los que no; el riesgo de sangrado tampoco era significativamente diferente entre los pacientes con AAS y dabigatran y AAS y warfarina.

Estos resultados podrían trasladarse a los pacientes con FA que precisen una intervención coronaria percutánea.

El rivaroxabán, un inhibidor directo del factor X activado, también ha demostrado no ser inferior a la

enoxaparina en la prevención del tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía ortopédica mayor de prótesis de cadera y rodilla⁽⁵⁾. Este fármaco, al igual que el anterior, tiene un amplio programa de ensayos clínicos: los estudios *RECORD 1, 2, 3 y 4* en cirugía ortopédica mayor de prótesis de cadera y rodilla, *EINSTEIN* (enfermedad tromboembólica venosa), *MAGELLAN* (en pacientes con patologías médicas) o el *ROCKET AF*, un ensayo en fase III en profilaxis del ictus isquémico en pacientes con FA en el que se han incluido más de 14.000 pacientes, en el que los pacientes son aleatorizados a rivaroxabán y warfarina⁽¹⁰⁾. Los resultados definitivos están pendiente de publicación. En 2 publicaciones de Kubitzka *et al.*^(11,12) se estudia la influencia del AAS en la farmacocinética, farmacodinamia, seguridad y tolerancia del rivaroxabán. Este estudio demostró que el AAS no altera los efectos del fármaco sobre la actividad anti-Xa o las pruebas coagulantes. A su vez, demuestran que la agregación plaquetaria y el tiempo de sangrado no se ven afectados por rivaroxabán, no interactúan entre sí ni modifica la acción del AAS. Este ensayo demuestra que no hay una interacción clínicamente relevante y que ambos fármacos pueden administrarse simultáneamente a las dosis programadas. El estudio *ATLAS ACS-TIMI 46*⁽¹³⁾ es un fase II en pacientes con SCA. En él se administran dosis crecientes de rivaroxabán asociado a AAS o a AAS y clopidogrel. El diseño es de doble ciego con dosis escaladas (5-20 mg) de rivaroxabán.

Incluye 3.491 pacientes, estabilizados tras un SCA, en los que, además de las dosis del fármaco en estudio /placebo, a criterio del investigador a los pacientes se les añade AAS solo o AAS y clopidogrel. La seguridad fue evaluada por los sangrados clínicamente significativos (escala de riesgo TIMI) y la eficacia por la muerte cardiovascular, infarto de miocardio, ictus isquémico y nuevos episodios isquémicos que requieran revascularización coronaria. Los resultados muestran que rivaroxabán es mejor que placebo en eficacia y, respecto al sangrado, se presenta de forma dosis dependiente. Los autores concluyen que es preciso realizar un nuevo estudio (está en fase de reclutamiento), con dosis bajas de rivaroxabán asociado a antiagregación doble o sencilla. También se está desarrollando un nuevo estudio en pacientes que padecen FA y SCA, asociando rivaroxabán y antiagregantes plaquetarios.

Hay publicaciones que analizan el efecto aditivo de naproxeno, AAS a dosis altas y clopidogrel cuando se asocia a rivaroxabán. En todos los casos se observa que rivaroxabán solo no modifica las pruebas de función plaquetaria. El naproxeno no tiene efectos clínicamente relevantes cuando se asocia a rivaroxabán, al igual que la asociación de AAS o clopidogrel. Y las alteraciones de función plaquetaria inducidas en los pacientes en tratamiento con AAS, naproxeno o clopidogrel no se potencian por rivaroxabán^(10,11).

El apixaban también está desarrollando un amplio programa de estudios clínicos en cirugía ortopédica mayor de prótesis de rodilla (*ADVANCE-1* y *ADVANCE-2*, fase III). En este último ensayo, apixaban fue superior a enoxaparina a dosis de 40 mg al día en la prevención del tromboembolismo venoso tras prótesis de rodilla⁽⁴⁾. El estudio *ADOPT* (fase III) en prevención del tromboembolismo venoso en pacientes de enfermedades médicas, o en el tratamiento de la trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar están en la actualidad en desarrollo.

El estudio *AVERROES* un fase III en pacientes con FA, apixaban comparado con AAS, en pacientes que no podían recibir antivitaminas K; fue parado prematuramente dada la superioridad del fármaco⁽⁴⁾. También está en desarrollo el estudio *AROSTOTLE*, un fase III en pacientes con FA, comparando apixaban con warfarina, cuyos resultados se esperaban en abril de 2011.

El estudio *APPRAISE*⁽¹⁴⁾, un fase II cuyo objetivo es la prevención de eventos isquémicos en pacientes con SCA, incluye a 1.715 pacientes y los resultados globales indican que se observa un sangrado dosis dependiente de apixaban y una tendencia a en la reducción de accidentes isquémicos. Es un estudio doble ciego, controlado con placebo, con dosis escaladas de apixaban (2,5 mg 2 veces al día; 10 mg 1 vez al día; 10 mg 2 veces al día; y 20 mg 1 vez al día), todos los pacientes recibieron AAS y el 76% clopidogrel. La valoración de seguridad se realizó según la International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Los autores indican que la asociación de apixaban a la terapia antiplaquetaria mostraba un incremento del sangrado dosis dependiente del fármaco en estudio. Respecto a la eficacia, los resultados indican una tendencia a la mejoría, pero no significativa respecto a los eventos isquémicos. En los pacientes que recibieron una doble terapia antiplaquetaria se vio un claro incremento de sangrado clínicamente significativo y fue menos aparente en aquellos pacientes que sólo estaban con AAS. Paradójicamente, los pacientes que sólo llevaban apixaban y AAS tuvieron un mejor grado de eficacia que aquellos que estaban con apixaban, AAS y clopidogrel (los autores, no obstante, aconsejan tomar estos resultados con precaución y se debe esperar a los resultados de los estudios por subgrupos). La dosis de apixaban de 10 mg diarios parece la más adecuada en un subgrupo especial de pacientes de alto riesgo de eventos isquémicos, en los que sea además necesario asociar terapia antiplaquetaria.

En la actualidad se está desarrollando el estudio *APPRAISE-2*, un fase III en pacientes con SCA.

En conclusión, la asociación de los nuevos anticoagulantes orales con la terapia antiplaquetaria debe ser completada con nuevos ensayos clínicos en fase III, que permitan optimizar la dosis del fármaco a fin de mejorar su perfil de seguridad, manteniendo o mejorando,

si cabe, su eficacia en pacientes seleccionados con alto riesgo de padecer nuevos episodios isquémicos.

En el futuro, en que aparecerán nuevos y más potentes fármacos antiplaquetarios, será preciso desarrollar nuevos estudios en los que podamos extraer conclusiones acerca de cómo combinar los anticoagulantes con los antiplaquetarios, reconociendo que las dosis pueden cambiar con la práctica diaria y que también puede depender de la técnica de revascularización empleada en cada caso, por lo que hay que adaptarla al riesgo de sangrado de cada paciente de forma individual.

Referencias bibliográficas

1. Orford JL, Fasseas P, Melby S, et al. Safety and efficacy of aspirin, clopidogrel, and warfarin after coronary stent placement with indication of anticoagulation. *Am Heart J* 2004; 147: 463-7.
2. Rubboli A, Di Pasquale G. Triple therapy of warfarin, aspirin, and thienopyridine for patients treated with vitamin K antagonist undergoing stenting. A review of evidence. *Inter Emerg Med* 2007; 2: 177-81.
3. Holmes D, Kereiakes D, Kleiman N, et al. Combining antiplatelet and anticoagulant therapies. *JACC* 2009; 2: 95-109.
4. Schirmer S, Baumhäkel M, Neuberger H, Hohnloser S, et al. Novel anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 2067-76.
5. Walenga JM, Adiguzel C. Drug and dietary interactions of the new and emerging oral anticoagulants. *Int J Clin Pract* 2010; 64: 956-67.
6. Nutescu E, Chuatrisorn I, Hellkenbart E. Drug and dietary interactions of warfarin and novel oral anticoagulants: an update. *J Thromb Thrombolysis* 2011; 31: 326-43.
7. Ezekowitz M, Reilly P, Nehmiz G, et al. Dabigatran with or without concomitant aspirin compared with warfarin alone in patients with non valvular atrial fibrillation (PETRO Study). *Am J Cardiol* 2007; 100: 1419-26.
8. Oldgren J, Budaj A, Granger C, et al. Dabigatran vs placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: a randomized, double-blind, phase II trial. *Eur Heart J* 2011; DOI: 10.1093/eurheartj/ehr113.
9. Connolly S, Ezekowitz M, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; 361: 1139-51.
10. ROCKET AF Study Investigators. Rivaroxaban once daily, oral, direct factor Xa inhibition compared with vitamin K antagonism for prevention of stroke. An Embolism Trial in Atrial Fibrillation: rationale and design of the ROCKET AF study. *Am Heart J* 2010; 159: 340-7.
11. Kubitz D, Becka M, Mueck W, Zuehlsdorf M. Safety, tolerability, pharmacodynamics and pharmacokinetics of Rivaroxaban, an oral direct anti factor Xa inhibitor, are not affected by aspirin. *J Clin Pharmacol* 2006; 46: 981-90.
12. Kubitz D, Becka M, Mueck W, Zuehlsdorf M. Rivaroxaban, an oral direct anti factor Xa inhibitor, has no clinical relevant interaction with naproxen. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63: 469-76.
13. Mega JL, Braunwald E, Mohanavelu S, et al. Rivaroxaban versus placebo in patients with acute coronary syndromes (ATLAS ACS-TIMI 46): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 2009; 607: 345-53.
14. APPRAISE Steering Committee and Investigators. Apixaban, an oral, direct selective factor Xa inhibitor, in combination with antiplatelets therapy after acute coronary syndrome: results of the apixaban for prevention of acute ischemic and safety events (APPRAISE) trial. *Circulation* 2009; 119: 2877-85.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL COMO ALTERACIÓN COMÚN EN MÚLTIPLES SITUACIONES PATOLÓGICAS

M. DÍAZ-RICART, E. CARRERAS, A. CASES, A.M. GALÁN, R. GOMIS, M. HERAS, G. ESCOLAR

Hospital Clínic. Barcelona

El endotelio es el órgano de mayor tamaño del organismo, cuya función no se limita a la contención de la sangre, ya que mantiene el flujo sanguíneo a nivel venoso y arterial, modula el tono vascular, regula el paso de células y fluidos entre la sangre y los tejidos interviniendo en los fenómenos inflamatorios de cualquier origen, controla las propiedades hemostáticas de la sangre y participa en la generación de nuevos vasos sanguíneos. Todas estas propiedades son heterogéneas y variables en función de la localización anatómica y el momento en el que se analicen⁽¹⁾.

El endotelio está implicado en la mayoría de las enfermedades, ya sea como determinante principal de la fisiopatología o como víctima colateral. A pesar de ello, es difícil trasladar el conocimiento adquirido en el laboratorio a la práctica médica. El endotelio no es susceptible de ser abordado a través de las maniobras tradicionales de diagnóstico, como la inspección, la palpación, la percusión y la auscultación. Y, desde un punto de vista de laboratorio, no existen todavía biomarcadores exclusivos que permitan el diagnóstico del daño endotelial. Pero, por todo ello, el endotelio presenta un potencial enorme, aún sin explotar, como diana terapéutica.

Heterogeneidad del endotelio

Una de las dificultades a la hora de trasladar los conocimientos generados desde el laboratorio a la cabecera del paciente reside en la concepción errónea de que todas las células endoteliales son iguales. Tanto la búsqueda de un marcador universal como la definición del endotelio suponen un reto en la actualidad. Algunas de las características ultraestructurales adscritas al endotelio no se encuentran en todas las células endoteliales. Hay pocos marcadores, si hay alguno, que sean específicos y que estén uniformemente expresados en el endotelio. Desde el punto de vista funcional, se puede hablar de división de funciones del endotelio dependiendo de su localización anatómica. Por lo tanto, para entender los procesos fisiopatológicos que ocurren en el endotelio deben tenerse en cuenta distintos aspectos:

el fenotipo de las células endoteliales dependiendo de la localización de las mismas, los condicionantes microambientales (extracelulares) y epigenéticos, así como aquellas diferencias fenotípicas condicionadas por la evolución⁽²⁾.

Activación y disfunción del endotelio

Los términos usados más frecuentemente para definir alteraciones del funcionalismo endotelial son “activación endotelial” y “disfunción endotelial”, cuya definición ha ido evolucionando a lo largo de los años. El endotelio funcional siempre está “activo”, ya que tiene unas tareas determinadas y es capaz de responder a estímulos diversos. Hablamos de “activación endotelial” cuando un estímulo es intenso y/o prolongado en el tiempo e induce la expresión temporal de un fenotipo proinflamatorio y/o procoagulante en la célula endotelial⁽³⁾. En cambio, la “disfunción endotelial” implica cambios funcionales (hemostáticos, adhesividad y migración leucocitaria, tono vasomotor, pérdida de la función de barrera, cambios en la apoptosis celular) y estructurales (vacuolización nuclear, edema y fragmentación citoplasmática, desnudación y pérdida de adhesión a la matriz extracelular) en el endotelio⁽⁴⁾. Esta es una condición que precede al desarrollo de aterosclerosis.

Marcadores de daño endotelial

Considerando que la disfunción endotelial puede ser un indicador temprano de enfermedad cardiovascular subclínica, la medida de marcadores específicos en el laboratorio ayudaría a mejorar su diagnóstico. Actualmente, no existe un marcador universal de disfunción endotelial y, en general, los laboratorios han optado por la medida de distintos parámetros relacionados con la activación y el daño endoteliales, como los niveles plasmáticos de receptores de adhesión solubles –como VCAM-1 soluble–, la determinación del factor de Von Willebrand (FVW) en plasma y el análisis de células endoteliales circulantes (CEC) y de progenitores endoteliales circulantes (PEC) en sangre. Un número elevado de CEC sería indicativo de la pérdida de capacidad adhesiva de las células endoteliales, ya sea por apoptosis o necrosis de las mismas. Por otro lado, el significado de determinados niveles de PEC es más especulativo, pero su presencia en sangre podría indicar una mayor o menor capacidad regenerativa del endotelio. La mayor dificultad de estas determinaciones reside en encontrar las características precisas de cada una de estas poblaciones para hacer un análisis fidedigno y reproducible.

Disfunción endotelial en la insuficiencia renal crónica

Un ejemplo claro de disfunción endotelial ocurre en la insuficiencia renal crónica terminal (IRCT). El endotelio de los pacientes con IRCT está en continua exposición a los tóxicos urémicos. La mortalidad en los pacientes sometidos a diálisis es superior a la de la población normal, siendo en un 50% debida a complicaciones cardiovasculares. La prevalencia de enfermedad cardiovascular en la IRCT es entre 10 y 30 veces superior a la de la población normal⁽⁵⁾. De hecho, existe una aceleración de la progresión de la aterosclerosis en la población de enfermos con IRCT, responsable de que las complicaciones tromboticas aparezcan prematuramente en comparación con la población normal⁽⁶⁾, siendo difícil atribuir esta situación únicamente a la mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos como hipertensión arterial, diabetes, hiperlipemia o tabaquismo.

La etiopatogenia del cuadro de aterotrombosis acelerado en la IRCT es compleja. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* reconocen la coexistencia de un alto grado de disfunción endotelial, un estado inflamatorio crónico y de estrés oxidativo en los pacientes urémicos. En el desarrollo de estos procesos patológicos intervienen factores humorales tóxicos, debidos al fallo renal, y factores derivados de la activación celular debidos a las terapias sustitutivas.

Utilizando un modelo de cultivo de células endoteliales expuestas a medio urémico, se ha podido caracterizar la disfunción endotelial. Estas células presentan un crecimiento acelerado, con alteraciones morfológicas y un incremento de células en fase S + G2M^(6, 7). Su adherencia al subendotelio es inferior cuando son expuestas a condiciones de flujo⁽⁶⁾, hecho confirmado por una mayor presencia de células endoteliales circulantes⁽⁸⁾. Además, las células expuestas al medio urémico generan una matriz extracelular más trombogénica debido, en parte, a una mayor presencia de factor tisular y FVW^(6,9). Aunque la exposición de células endoteliales en cultivo a suero urémico induce una mayor actividad MAP cinasa⁽⁷⁾, no se detectan marcadores de apoptosis en estas células. Además, estudios inmunocitoquímicos han evidenciado aumentos en los receptores de adhesión ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 en la superficie de estas células, característicos de procesos inflamatorios⁽⁹⁾.

Este estado de inflamación crónica concurre con la existencia de estrés oxidativo en estos pacientes, que podría ser en gran parte responsable de la lesión citotóxica que sufre el endotelio de estos pacientes⁽¹⁰⁾, ya que la generación de radicales libres y

de productos oxidados en la uremia supera la habilidad de los antioxidantes intra- y extracelulares.

La utilización de técnicas proteómicas⁽¹¹⁾ nos ha permitido detectar incrementos en la expresión de proteínas de carácter proinflamatorio, como dos componentes del proteasoma, la citocina HMGB1 y la proteína enzimática aldosa reductasa, así como de una proteína antiinflamatoria, como la superóxido dismutasa. Asimismo, la exposición de las células endoteliales al medio urémico genera una respuesta de adaptación con una mayor expresión de proteínas antioxidantes y antiapoptóticas, como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la peroxiredoxina. Es interesante destacar que algunas de estas proteínas están directa o indirectamente relacionadas con el factor nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*: NFκB)⁽¹¹⁾, que juega un papel crucial en el desarrollo de procesos inflamatorios, inmunológicos y de estrés oxidativo.

Activación y daño endotelial en la obesidad

La obesidad es una situación de inflamación sistémica crónica que conduce a estrés oxidativo, disfunción endotelial y vasculopatía. Es un factor de riesgo mayor de morbilidad y mortalidad cardiovascular aterotrombótica⁽¹²⁾. La obesidad está estrechamente relacionada con la dislipidemia, la hipertensión, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus, condiciones todas ellas que se asocian con daño endotelial.

En individuos obesos existen alteraciones en los patrones de citocinas y adipocinas proinflamatorias y protrombóticas circulantes⁽¹³⁾. Estudios *in vitro*, exponiendo células endoteliales al medio secretado (secretoma) por el tejido adiposo de localización subcutánea y visceral de individuos obesos, así como al secretoma de las fracciones celulares adipocíticas y estromales de cada localización, han permitido caracterizar un fenotipo de activación y daño endoteliales en la obesidad y determinar la contribución de las distintas fracciones del tejido adiposo⁽¹⁴⁾. En general, observamos un incremento en la proliferación de las células en cultivo, con una alteración en la morfología de las mismas, un aumento en la expresión de receptores de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en la superficie celular y una mayor trombogenicidad de la matriz extracelular, generada posiblemente debido a una mayor expresión del FVW. Estos cambios, relacionados con la activación de las proteínas p38 MAPK, Erk42/44 y el factor de transcripción NFκB, fueron mucho más evidentes en células expuestas al secretoma del tejido adiposo visceral, en especial a los componentes secretados por la fracción estromal.

Lesión endotelial y trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es una estrategia terapéutica de elección no sólo en determinadas hemopatías, sino también en otras patologías no hematológicas. A pesar de ello, este tratamiento se asocia a una elevada morbimortalidad atribuible a complicaciones de diversa índole. Existen complicaciones que aparecen en la fase inicial del trasplante y que parecen tener un origen endotelial común.

A través de estudios *in vivo* e *in vitro*, hemos podido demostrar que existe activación y daño endoteliales en asociación con el TPH tanto alogénico como autólogo^(15,16), cuya magnitud está en relación directa con la intensidad del tratamiento de acondicionamiento y se hace además evidente durante la fase del implante del injerto. La activación del endotelio durante el TPH se traduce en una reacción inflamatoria en ambos tipos de trasplante, con un aumento de los receptores de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en la superficie celular, junto con un fenotipo protrombótico en el alogénico con una mayor expresión del FVW en la matriz extracelular⁽¹⁵⁾. Utilizando un modelo de célula endotelial microvascular, pudimos evidenciar que el TPH autólogo también conlleva un riesgo protrombótico posiblemente asociado a una mayor expresión del factor tisular en la matriz extracelular generada por estas células⁽¹⁷⁾. Es interesante destacar el papel protector del defibrotide, derivado del ácido desoxirribonucleico, cuyo efecto parece estar mediado a través de la inhibición de las vías dependientes de p38 MAPK y la proteína de estrés Akt⁽¹⁷⁾.

Disfunción endotelial en otras patologías

Existen evidencias que indican la presencia de disfunción endotelial en otras patologías denominadas cardiometabólicas, como la diabetes y la hipertensión. Pero también se ha demostrado la existencia de un estado inflamatorio, así como un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares, en la depresión⁽¹⁸⁾. Los pacientes con depresión presentan niveles incrementados en circulación de citocinas inflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) y la proteína C reactiva (PCR)⁽¹⁹⁾. Es conocido que la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) actúa como agente proinflamatorio e inmunorregulador en diferentes condiciones clínicas. Aunque son necesarios más estudios, existen evidencias generadas *in vivo* e *in vitro* que demuestran una asociación entre el tratamiento con inhibidores de la recaptación de serotonina y una disminución del estado inflamatorio, así como del riesgo cardiovascular, en pacientes depresivos. Por todo ello, se especula que en la depresión pudiera existir un componente de disfunción endotelial.

Consideraciones finales

La evolución de las investigaciones realizadas utilizando modelos celulares nos ha llevado a la caracterización de las alteraciones fisiológicas y bioquímicas de la disfunción endotelial en distintas situaciones patológicas. Ahora bien, queda por determinar aquellos mecanismos que desde la recepción de un estímulo "tóxico" conducen al desarrollo de la disfunción. Este estímulo tóxico podría ser detectado por receptores encargados de la "defensa" celular, como los receptores *toll like* (TLR) y los inflamasomas. Ambos sistemas tienen en común la activación del factor de transcripción NFκB y la producción de citocinas proinflamatorias.

Por otro lado, no debemos olvidar que la mayoría de las situaciones patológicas en las que se produce disfunción endotelial son situaciones complejas cuyo fenotipo proviene de la combinación de factores tanto ambientales como genéticos. Por lo tanto, no puede descartarse un cierto grado de inestabilidad epigenética en situaciones patológicas crónicas en las que tanto el componente inflamatorio como el de estrés oxidativo, entre otros factores, generan un ambiente propicio para ocasionar alteraciones en la regulación de la expresión de algunos genes⁽²⁰⁾. La exposición permanente del endotelio a la presencia de moléculas tóxicas, elementos proinflamatorios y productos de la oxidación podría tener un impacto directo en la organización de la cromatina o en aquellos elementos que la regulan, como son las histonas y otros elementos no codificantes (micro-ARN, si-ARN).

La disfunción endotelial es un factor patofisiológico común en múltiples patologías, en especial en aquellas denominadas cardiometabólicas, y constituye una condición que precede a la enfermedad cardiovascular. Aunque las causas que conllevan al desarrollo de disfunción endotelial en cada una de las patologías pueden ser diferentes, los mecanismos moleculares parecen ser en gran parte coincidentes. El hecho de que la disfunción endotelial sea un evento precoz le confiere potencial valor pronóstico de enfermedad cardiovascular y ofrece una diana terapéutica para el desarrollo de fármacos diseñados para prevenir su desarrollo.

El conocimiento de los mecanismos moleculares básicos abrirá nuevas posibilidades terapéuticas para, si no prevenir, al menos contrarrestar las consecuencias de un estado inflamatorio crónico, como es el que sucede en la insuficiencia renal crónica y otras patologías cardiometabólicas, así como en situaciones de inflamación aguda, como ocurre en asociación a procedimientos terapéuticos como el TPH.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración en estos estudios de los doctores Marta Palomo, Felicia Hanzu, Irene López-Vílchez, Caro-

lina Caballo, Patricia Molina, Marc Pino y Alba Carmona. Los estudios descritos han sido parcialmente financiados por la ayudas PI08/0156, CP04-00112, PS09/00664 (Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social), la German José Carreras Leukaemia Foundation (R 07/41v) y SAF 2009-10365 (Ministerio de Ciencia y Tecnología).

Referencias bibliográficas

1. Aird WC. The endothelium: a primer'. UpToDate 13.1; 2005 (<http://www.uptodateonline.com>).
2. Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacological reports* 2008; 60: 139-43.
3. Pober JS, Gimbrone MA Jr. Expression of Ia-like antigens by human vascular endothelial cells is inducible in vitro: demonstration by monoclonal antibody binding and immunoprecipitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 6641-5.
4. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-91.
5. Levey AS, Eknoyan G. Cardiovascular disease in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 828-33.
6. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, Aznar-Salatti J, López-Pedret J, et al. Uremic medium disturbs the hemostatic balance of cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1099-105.
7. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Petriz J, Ordinas A, Escolar G. Uremic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis on endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1079-85.
8. Koc M, Bihorac A, Segal MS. Circulating endothelial cells as potential markers of the state of the endothelium in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 704-12.
9. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, López-Pedret J, Arranz O, et al. Uremic medium causes expression, redistribution and shedding of adhesion molecules in cultured endothelial cells. *Haematologica* 2002; 87: 1053-61.
10. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62: 1524-38.
11. Carbo C, Díaz-Ricart M, Fuste B, Fusté B, Cases A, Carrascal M, et al. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. *Am J Kidney Dis* 2008; 5: 603-12.
12. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 939-49.
13. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome. A new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059-62.
14. Hanzu FA, Palomo M, Kalko SG, Parrizas M, Garaulet M, Escolar G, et al. Translational evidence of endothelial damage in obese individuals: inflammatory and prothrombotic responses. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (6): 1236-45.
15. Palomo M, Díaz-Ricart M, Carbo C, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Escolar G, et al. The release of soluble factors contributing to endothelial activation and damage after hematopoietic stem cell transplantation is not limited to the allogeneic setting and involves several pathogenic mechanisms. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 537-46.
16. Palomo M, Díaz-Ricart M, Carbo C, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Martine C, et al. Endothelial dysfunction after hematopoietic stem cell transplantation: role of the conditioning regimen and the type of transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 985-93.
17. Palomo M, Díaz-Ricart M, Rovira M, Escolar G, Carreras E. Defibrotide prevents the activation of macrovascular and microvascular endothelia caused by soluble factors released to

- blood by autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 497-506.
18. León-Ponte M, Ahern GP, O'Connell PJ. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood* 2007; 109: 3139-46.
 19. Miller GE, Stetler CA, Carney RM, Freedland KE, Banks WA. Clinical depression and inflammatory risk markers for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2002; 90: 1279-83.
 20. Stenvinkel P, Ekström TJ. Epigenetics and the uremic phenotype: a matter of balance. *Contrib Nephrol* 2008; 161: 55-62.

SITUACIÓN DIAGNÓSTICA ACTUAL EN TROMBOPATÍAS CONGÉNITAS

I. SÁNCHEZ GUIU, M.L. LOZANO, A.I. ANTÓN, V. VICENTE, J. RIVERA

Centro Regional de Hemodonación.

Unidad de Hematología y Oncología Médica.

Facultad de Medicina. Universidad de Murcia

Trombopatías congénitas: tipos y aproximación al diagnóstico

Tanto la hemostasia primaria, el mecanismo fisiológico de defensa de la integridad vascular, como la formación de un trombo patológico son procesos dinámicos que conllevan una serie coordinada de eventos que implican a las plaquetas: a) adhesión de una monocapa de plaquetas al subendotelio expuesto (fase de iniciación); b) reclutamiento de nuevas plaquetas de la circulación, activación y agregación de las mismas merced a la liberación local de agonistas plaquetarios (fase de extensión); c) estabilización del tampón plaquetario mediante una segunda ola de señales de activación por contacto plaquetario estrecho y formación de la red de fibrina (fase de estabilización); y d) control negativo de la activación plaquetaria incontrolada y del crecimiento del trombo mediante diferentes proteínas⁽¹⁾. Para desempeñar su función, las plaquetas emplean distintos tipos de receptores altamente especializados, incluyendo glicoproteínas (GPs) adhesivas no integrinas (complejo GPIb/IX/V), integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, etc.), receptores de agonistas solubles (receptores de trombina -PAR-1 y PAR-4-, de tromboxano A_2 -TXA₂-, de epinefrina -ADRA2A-, de ADP -P₂Y₁, P₂Y₁₂-, etc.), receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas (GPVI, receptores Fc, PECAM-1) y una miscelánea de otros. La interacción de estos receptores con sus ligandos induce eventos de señalización intraplaquetaria de dentro a fuera (*inside-out*) y de fuera a dentro (*outside-in*), que favorecen la activación y conducen a la agregación plaquetaria⁽¹⁾. Adicionalmente, las plaquetas emplean en este proceso su flexible citoesqueleto, que les per-

mite el cambio dramático de su morfología, y un sistema de gránulos α y δ que liberan proteínas hemostáticas (factor de Von Willebrand -FVW-, fibrinógeno -Fg-, selectina-P, etc.), nucleótidos (ADP y ATP) y calcio, que actúan de forma autocrina y paracrina potenciando la activación plaquetaria⁽²⁾.

Las anomalías hereditarias en cualquiera de estos elementos de la fisiología plaquetaria, trombopatías congénitas, comprometen la capacidad hemostática de las plaquetas y favorecen el sangrado. Según el elemento afectado, las trombopatías se suelen clasificar en diferentes grupos: 1) defectos de receptores de proteínas adhesivas; 2) defectos de receptores para los agonistas solubles; 3) defectos de transmisión de señales de activación; 4) defectos de gránulos; y 5) otros defectos. La sintomatología hemorrágica de los pacientes con trombopatías congénitas es la típica de los trastornos de hemostasia primaria (petequias, epistaxis, gingivorragias, menorragias) y su severidad es muy variable, no sólo en función del tipo de trastorno, sino también entre pacientes con la misma patología. Algunas trombopatías, las denominadas sindrómicas, se asocian también a otras alteraciones clínicas más o menos severas (alteraciones auditivas, albinismo, inmunodeficiencia, etc.). El manejo clínico incluye tanto medidas educativas, el uso de fármacos hemostáticos (desmopresina, antifibrinolíticos, FVIIr) en situaciones de sangrado moderado o ante maniobras clínicas de moderado riesgo hemorrágico, transfusiones de plaquetas en situaciones de sangrado relevante o alto riesgo hemorrágico y, en casos muy severos, el trasplante de progenitores hematopoyéticos se puede contemplar como opción curativa. En un congreso reciente de nuestra Sociedad Española de Trombosis y Hemorragia (SETH) hemos revisado en detalle las características de los diferentes tipos de trombopatías^(3,4).

Por su heterogeneidad clínica y de laboratorio, el diagnóstico de los pacientes con trastornos plaquetarios congénitos es difícil y requiere una experiencia clínica y de laboratorio que suele estar restringida a centros especializados. Además, no existen guías bien establecidas para el diagnóstico y manejo de estos pacientes, y sólo en algunos países como Reino Unido algunos grupos de expertos han elaborado estrategias diagnósticas para estas patologías⁽⁵⁾. Sin embargo, el diagnóstico correcto de los pacientes con trombopatías congénitas es relevante no sólo para su clasificación, sino también para su correcto manejo clínico, especialmente ante situaciones de riesgo hemorrágico. En el reciente IV Curso de formación continuada de trombosis y hemostasia organizado por la SETH, detallamos nuestra visión, basada en la literatura y en nuestra propia experiencia, del abordaje diagnóstico de los enfermos con sospecha de padecer una trombopatía congénita⁽⁶⁾. Básicamente, este diagnóstico incluye en primer lugar una exhaustiva historia clínica, una caracterización

biológica de sus plaquetas usando apropiadamente la amplia y diversa batería de pruebas de función plaquetaria disponibles actualmente⁽⁷⁾ y, finalmente, el estudio molecular para identificar la(s) alteración(es) molecular(es) subyacente(s), si conocemos el gen o genes diana^(8,9).

Aunque algunas son patologías conocidas desde hace más de un siglo, sigue habiendo en la actualidad importantes lagunas en cuanto a incidencia, diagnóstico y manejo clínico de las trombopatías congénitas. Esta presentación pretende ilustrar la situación en España de estos pacientes, basándonos en los datos de una encuesta distribuida a hospitales de todo el país, y mostrar nuestra experiencia en la caracterización funcional y molecular de enfermos con sospecha de trombopatías congénitas.

Incidencia y diagnóstico de pacientes con trombopatías congénitas: perspectiva en España

La incidencia real de trastornos plaquetarios congénitos en nuestro país, como en la mayoría de los países, es desconocida. Algunas fuentes como la Federación Mundial de Hemofilia refieren para España unos 20 casos de patologías severas, como síndrome de Bernard-Soulier (SBS) o tromboastenia de Glanzmann (TG), y en la literatura científica se han descrito hasta la fecha menos de 15 pacientes españoles con este tipo de alteraciones. Por otra parte, según nuestra información, no existe un registro oficialmente reconocido de estos enfermos, ni tampoco centros de referencia para su diagnóstico y/o seguimiento clínico. Esta situación no es muy distinta en la mayoría de los países desarrollados, que también carecen de estos centros; en nuestro entorno sólo Francia cuenta con una red estatal de centros de referencia y competencia para el diagnóstico e investigación de trastornos plaquetarios congénitos, coordinada científicamente por el profesor A.T. Nurden⁽¹⁰⁾, y de un registro oficial de pacientes con estas patologías (<http://www.maladies-plaquettes.org/>).

Nuestro servicio ha tenido históricamente un gran interés en la fisiopatología de las plaquetas y, tras más de 20 años de trabajo en este campo, disponemos de



Figura 1. Centros que han respondido la encuesta sobre *Diagnóstico y manejo de pacientes con trastornos plaquetarios congénitos*.

la experiencia y los medios técnicos necesarios para la caracterización funcional y molecular de pacientes con trombopatías congénitas. Este interés se ha reflejado recientemente en 2 acciones concretas: 1) promover, en el seno del Grupo de Trabajo de Biología y Patología Hemorrágica de la SETH, un proyecto de *Caracterización funcional y molecular de pacientes con trombopatías congénitas*, con el que pretendemos facilitar a la comunidad médico-científica española el diagnóstico y estudio de estos enfermos y fomentar la investigación básica y clínica de estas patologías en nuestro país (http://www.seth.es/grupos/activos/ByP_Hemorragica.asp); y 2) realizar una encuesta entre compañeros hematólogos de toda España (Figura 1), intentando tener una perspectiva más aproximada sobre la incidencia nacional de los trastornos plaquetarios congénitos y de la situación actual en relación con el diagnóstico clínico-biológico y molecular de estos pacientes.

La encuesta *Diagnóstico y manejo de pacientes con trastornos plaquetarios congénitos* incluyó 13 preguntas relativas a la frecuencia, procedencia y clasificación de pacientes con trombopatías congénitas en sus centros, herramientas para el diagnóstico biológico y molecular y opinión respecto a la necesidad de disponer de centros de referencia para el diagnóstico biológico y molecular y el seguimiento clínico de este tipo de enfermos. La encuesta fue distribuida entre octubre de 2010 y marzo de 2011, tanto de forma generalizada a través de las listas de correo electrónico de los socios de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y la SETH, como por envío personalizado a los jefes de servicio de hematología, o personas delegadas, de 60 hospitales de 41 ciudades con represen-

tación de todas las comunidades autónomas, así como a 5 centros en 3 ciudades de Portugal. Completaron y nos remitieron la encuesta un total de 37 (57%) centros de 25 ciudades de 16 comunidades autónomas y 1 centro portugués. La inmensa mayoría (> 95%) de las respuestas obtenidas fue contestación al envío de la encuesta de forma personalizada.

Los datos más destacables de las repuestas obtenidas en estas encuestas son:

- a) Un 80% de los centros evalúa y realiza seguimiento clínico de pacientes con sospecha de trombotopatía congénita, generalmente remitidos de atención primaria (80%).
- b) Estos pacientes se evalúan clínicamente en consultas de hematología general o coagulación. Sólo el 15-25% de los centros disponen de consultas específicas de hemostasia primaria o patología plaquetaria.
- c) Sólo el 50% de los centros realiza una valoración cuantitativa (escalas de sangrado propias o propuestas en la literatura) de la clínica hemorrágica de los pacientes con sospecha de trombotopatía congénita.
- d) Para el diagnóstico biológico de estos enfermos:
 - El 100% de los centros cuenta con laboratorio de coagulación y hematimetría.
 - Un 43% emplea el tiempo de sangrado, pese a ser una técnica no recomendada actualmente⁽⁷⁾.
 - Un 90% usa el sistema PFA-100, pese a la recomendación experta⁽¹¹⁾ de un uso opcional en estos enfermos.
 - La agregación plaquetaria en PRP se usa en un 62% de los centros y la agregación plaquetaria en sangre total en el 35%.
 - Un 35% de los centros disponen de citometría de flujo para el estudio de estos enfermos.
 - Otras técnicas (ensayos bioquímicos, microscopia electrónica) están disponibles en menos del 20% de los centros.
- e) Sólo el 31% de los centros aborda el diagnóstico molecular de estos enfermos y, mayoritariamente, en un centro externo (hospital o centro de investigación).
- f) El 81 y el 92% de los encuestados opinan que es necesaria la creación de centros de referencia para el diagnóstico clínico-biológico y molecular, respectivamente, de los pacientes con sospecha de trombotopatía congénita. Sin embargo, sólo el 50% creen necesario disponer de centros de referencia para el seguimiento clínico de estos enfermos.
- g) Como era esperable, la casuística de pacientes con sospecha de trombotopatías congénitas en España desvelada por esta encuesta es muy superior a la descrita en la literatura. Así, sólo los 37 servicios que han respondido a la encuesta refieren más de 701 pacientes con sospecha de alteraciones plaquetarias hereditarias, distribuidos en:

- Trombocitopenias hereditarias: 159.
- SBS: 41.
- TG: 58.
- Déficit de gránulos (síndrome de Hermansky-Pudlak –SHP–, síndrome de Chediak-Higashi –SCH– y otros): 158.
- Trombotopatías no filiadas: 285.

Obviamente, la información obtenida en estas encuestas no puede interpretarse como la realidad inequívoca de la situación española en relación con la prevalencia y el abordaje diagnóstico de los pacientes con trombotopatías congénitas, pero creemos que ofrece una perspectiva bien aproximada.

Caracterización biológica y molecular de casos españoles de trombotopatías congénitas: nuestra experiencia

Pese a la rareza de las trombotopatías congénitas más relevantes, nosotros hemos acumulado una casuística de unos 50 pacientes con sospecha de estas patologías, de nuestra propia clínica o remitidos por compañeros de otros hospitales de España con quienes mantenemos colaboración en este ámbito. Entre esta casuística, hasta ahora hemos confirmado el diagnóstico funcional y molecular de 4 casos de SBS, 7 casos de TG, 2 con SCH, y 1 con SHP. En el resto de los pacientes, el estudio clínico biológico descartó defectos de receptores de membrana o de otra patología específica y era sugerente de defectos moderados de los gránulos densos o anomalías de señalización. En estos casos, no se ha realizado estudio molecular, salvo en 2 familias con alteraciones fenotípicas de la señalización plaquetaria similares, en las que se ha iniciado experimentalmente un análisis de ligamiento genético⁽⁶⁾.

Casuística del síndrome de Bernard-Soulier

Hasta la fecha hemos estudiado 10 pacientes con la sospecha de SBS establecida por sus médicos sobre la base de su valoración de la clínica hemorrágica, la presencia de macrotrombocitopenia importante y un estudio de laboratorio muy variable. Tras reevaluar la información clínica y de laboratorio existente, en todos ellos realizamos una valoración biológica normalizada de las plaquetas de estos enfermos, incluyendo al menos: hemograma y frotis, expresión de las principales GPs plaquetarias (Ib/IX, IIb/IIIa, Ia/IIa) por citometría de flujo (en algunos casos con ensayos de unión de ligandos marcados radiactivamente) y *Western blot* y agregación plaquetaria, en los casos en los que la trombocitopenia lo permitió, inducida al menos con ristocetina y TRAP (péptido estimulador del receptor de trombina PAR-1). En algunos casos, también se valo-

Tabla 1. Caracterización funcional y molecular de nuevos pacientes españoles con síndrome de Bernard-Soulier

Estudios		Caso				
		08-005	09-034	09-086	11-061	
Hemograma	Plaquetas ($\times 10^9/L$)	2	4	4	1	
	VPM (frotis, +, ++, +++)	+++	+++	+++	+++	
Agregación plaquetaria	TRAP (25 μM)	nr	42	nr	30	
	Ristocetina (1,25 mg/mL)	nr	3,5	nr	5	
Citometría de flujo	Tamaño plaquetario (FSC; normal < 50)		157	873	213	
	Unión FVW FITC con ristocetina +/+/-/-	nr	nr	Negativo	Negativo	
	Expresión GPs (% PLT positivas/IFM) (Normal > 80/> 100)	Ib α	0/-	1/-	5/60	100/35
		IX	nr	nr	65/89	100/34
		$\beta 3$	100/828	93/620	100/1.485	100/305
αIIb		100/2.559	94/498	100 /922	100/148	
Western blot (+, +/-, -)	Ib α	-	+/-	+/-	+/-	
	IX	+/-	+/-	nr	+/-	
	$\beta 3$	+	nr	+	+	
	αIIb	+	nr	+	+	
Alteración molecular	Ib α	N	Cys209Ser	Gln90_Leu92del	NF	
	IX	Trp71Arg	N	N	NF	
Diagnóstico		SBS	SBS	SBS	¿SBS?	

N: normal; NF: estudio no finalizado; nr: no realizado o no valorable; SBS: síndrome de Bernard-Soulier

ró la posibilidad de que se tratara de formas variantes que expresan un receptor GP Ib/IX no funcional, mediante ensayos de unión inducida con ristocetina de FVW marcado radiactivamente (FVW FITC) y citometría de flujo. De los casos citados, 2 se estudiaron hace unos 20 años y, aunque el estudio biológico era sugestivo de formas variantes de SBS⁽¹²⁾, en aquella época no disponíamos de la infraestructura y experiencia para realizar el estudio molecular y, por lo tanto, no se pudo realizar el estudio genético. En otros 3 casos, nuestro estudio biológico no confirmó la sospecha inicial de SBS, al demostrar una expresión normal de las GPs Ib/IX y una agregación y/o unión de FVW inducida con ristocetina no alterada. Estos casos están aún bajo investigación y la(s) alteración(es) molecular(es) responsable(s) de la macrotrombocitopenia y el fenotipo hemorrágico aún se desconoce(n). En un caso referido a nuestro servicio muy recientemente, el estudio clínico-biológico también sugería inequívocamente el diagnóstico de SBS, pero el estudio molecular está aún en marcha. En los 4 casos restantes, tanto el estudio biológico como el molecular ha confirmado el diagnóstico de SBS. El más antiguo de ellos es un paciente de una familia de etnia gitana en cuya caracte-

rización funcional participamos hace 20 años, y cuyo estudio molecular realizado por el grupo de la doctora González Manchón (CSIC, Madrid) reveló un cambio 89G/A en el gen GPIBB que provoca la sustitución del aminoácido Cys5Tyr en la GP Ib β , impidiendo la formación normal del puente disulfuro Cys5-Cys7 y alterando dramáticamente el procesamiento y tráfico del complejo Ib/IX a la membrana plaquetaria⁽¹³⁾. En los otros 3 estudiados recientemente (Tabla 1), los pacientes son portadores de las mutaciones 673T/A [Cys209Ser] en el gen GPIBA, 316-325del9pb [Gln90_Leu92del], también en GPIBA y 259T/C [Trp71Arg] en el gen de GP9, todas ellas causando inestabilidad conformacional de la proteína afectada. Curiosamente, la alteración molecular Cys209Ser que hemos encontrado en un paciente de Castellón ha sido previamente identificada en otros 2 pacientes españoles no relacionados^(14,15). Por el contrario, la otras 2 mutaciones encontradas, Gln90_Leu92del en GPIBA y Trp71Arg en GP9 son mutaciones nuevas no descritas previamente en pacientes con SBS. De particular interés es el paciente catalán con la mutación Gln90_Leu92del en GPIBA, ya que, a diferencia de los demás casos, este enfermo es portador heterocigoto y la mutación sólo está pre-

sente en uno de sus progenitores. Así, de acuerdo con la creencia bien establecida, esta mutación heterocigota no justificaría por sí sola el fenotipo clínico y de laboratorio que inequívocamente apunta el diagnóstico de SBS. Actualmente, estamos ampliando el estudio molecular familiar, con el fin de averiguar si se trata de un caso de haploinsuficiencia o si el fenotipo está causado por la asociación de mutaciones no detectadas en otros genes.

La incidencia real del SBS en España no se conoce, pero considerando sólo los 3 casos ya descritos en la literatura⁽¹³⁻¹⁵⁾ y los 3 recientemente caracterizados por nosotros, la incidencia sería de 0,15 casos/millón. Dado que la prevalencia genéricamente establecida para esta patología es de 1 caso/millón, nuestros datos sugieren que en nuestro país un porcentaje relevante de pacientes con SBS no completa apropiadamente el estudio biológico y molecular o esta información no se divulga en revistas científicas. La promoción del proyecto de estudio de pacientes con trombopatías congénitas en el seno de la SETH quizás sirva para facilitar el diagnóstico y registro de estos pacientes.

Casuística de la tromboastenia de Glanzmann

Como el SBS, la TG es otra rara y severa patología plaquetaria congénita de incidencia desconocida en España. Según nuestro conocimiento y la búsqueda bibliográfica realizada (en PubMed, con las claves de búsqueda Glanzmann, thrombasthenia, Spain, España) hasta la fecha se han descrito en la literatura 12 pacientes españoles con TG, en 11 de los cuales el grupo de la doctora González-Manchón identificó la alteración molecular responsable en el gen ITGA2B [α IIb] (8 casos) o ITGB3 [β 3] (3 casos). Nuestro grupo realizó la caracterización clínico-biológica de 2 de estos pacientes. Se trata de un varón diagnosticado en la infancia con clínica hemorrágica muy leve, que aún seguimos regularmente en nuestro servicio, que es portador homocigoto de la mutación Arg597Stop en el gen ITGA2B⁽¹⁶⁾, y de una mujer canaria remitida a nuestro servicio con un historial hemorrágico severo y un fenotipo de laboratorio compatible con una forma variante de TG, que resultó ser portadora heterocigota de la mutación Leu718Pro en el gen ITGB3⁽¹⁷⁾. Estudios en modelos celulares demostraron que la mutación Leu718Pro en heterocigosis se traduce en la expresión de una integrina α IIb β 3 mutante constitutivamente activa que causa agrupamiento o *clustering* aberrante de los receptores α IIb β 3 normales y mutados, ocasionando el fenotipo de tromboastenia⁽¹⁷⁾.

Más recientemente hemos tenido la oportunidad de estudiar otros 11 pacientes remitidos por compañeros hematólogos de distintos hospitales (Valencia, Zaragoza, Murcia, Coruña y Córdoba) con la

sospecha diagnóstica de TG. Analizamos su fenotipo plaquetario con un amplio panel de pruebas que incluye: hemograma; frotis; PFA-100, retracción de coágulo; agregación plaquetaria (ácido araquidónico, ADP, epinefrina, fosfatasa ácida resistente a tartrato –TRAP–, ristocetina, colágeno, PMA y ditiotreitol –DTT–); valoración por citometría de flujo de las GPs Iba, IX, Ia, IIb y IIIa; activación y secreción plaquetaria con agonistas (TRAP, PMA y ADP) por citometría de flujo (α IIb/ β 3 activo –PAC-1–, CD62, CD63 y mepacrina); y expresión plaquetaria global de α IIb, β 3 y Iba por *Western blot*. Para el estudio molecular potencial se purificó por métodos convencionales ARN y ADN total de muestras de sangre de los *propositi*. En 2 de estos casos, nuestro estudio biológico descartó el diagnóstico de TG al demostrar expresión normal de las GPs IIb y IIIa, retracción de coágulo normal, un patrón de agregación con respuesta anómala a agonistas débiles como ADP y epinefrina, pero normal a otros agonistas más fuertes como colágeno, ácido araquidónico o TRAP, y niveles normales de gránulos densos (test de captación de mepacrina y de serotonina radiactiva). Con estos datos, el diagnóstico se ha reorientado hacia un trastorno de señalización que aún estamos investigando. En los restantes 9 pacientes, nuestro estudio biológico normalizado sí ha confirmado el diagnóstico de TG (tipo I en 6 pacientes, tipo II en 1 y TG variante en otro) y hemos procedido al estudio molecular. Como muestra la Tabla 2, en 4 casos identificamos las mutaciones responsables en el gen ITGA2B: 1 caso portador de Leu183Pro [641T/C, exón 6]; 2 hermanos con el cambio Cys674Arg [2113T/C, exón 21]; 1 paciente doble heterocigoto para las mutaciones Val951Met [2943G/A, exón 29] y Ala958Thr [2965G/A, exón 29]; y otro doble heterocigoto de Pro848fsdelC [2637delC, exón 26] y Glu507STOP [G1644T, exón17]. Presentan alteraciones moleculares en el gen ITGB3 3 pacientes: 1 portador de las mutaciones Met124Val [448A/G, exón 4], 232STOP [773-774delTG, exón 5] y [33784-33787delTTTGT, intrón 5]; 1 homocigoto para la mutación Tyr190Cys [667A/G, exón 4]; y 1 caso de TG variante homocigoto para el cambio Met118Arg [451T/G, exón 4].

En 3 de los casos no podemos descartar aún la existencia de otras alteraciones moleculares, ya que hemos observado que, si bien las mutaciones referidas se encuentran en homocigosis en el ARNm de los *propositi*, se presentan en heterocigosis en su ADN y no se identifican en uno de los progenitores. Ello sugiere la existencia de otra alteración no identificada que anula la expresión del alelo heredado de unos de los progenitores.

De las 11 mutaciones encontradas en estos enfermos, 5 de ellas ya han sido descritas previamente, de las cuales 2, Met124Val y Cys674Arg, fueron identificadas por la doctora González-Manchón

Tabla 2. Caracterización funcional y molecular de nuevos pacientes españoles con tromboastenia de Glanzmann

		Caso									
Estudios		09-024	09-033	09-096	10-011	10-012	10-015	10-016	11-020	11-034	
Hemograma	Plaquetas ($\times 10^9/L$)	135	280	169	156	159	176	176	152	109	
	VPM	8,9	9,0	9,1	8,9	10,0	10,4	9,3	11,1	10,7	
PFA-100	Colágeno-epinefrina	296	> 300	278	300	> 300	286	> 300	> 300	NR	
	Colágeno-ADP	> 300	> 300	215	278	> 300	> 300	288	> 300	NR	
Retracción de coágulo (+, +/-, -)		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
Agregación plaquetaria	TRAP (25 μM)	17	16	23	19	21	18	18	12	16	
	ADP (10 μM)	0	0	7	2	3	0	0	1	0	
	Epinefrina (5 μM)	8	3,5	4	2	5	2	4	3	3	
	Ristocetina (1,25 mg/mL)	91	76	95	81	32	38	53	87	82	
	Ácido araquidónico (1,6 mM)	0	11	15	11	13	14	5	12	12	
	Colágeno (2 $\mu g/mL$)	4	5	NR	3	4	5	3	16	35	
	DTT (10 mM)	10	3	5,5	3,5	2,5	4	3	2,5	3	
	PMA (100 nM)	7	12	NR	9	17	7	6	11	16	
Citometría de flujo	Mepacrina	+	+	+	+	+	+	+	NR	NR	
	Activación plaquetaria (TRAP -25 μM -)	% CD62	72	76	35,4	57	55	30	78	NR	67
		% CD63	70	77	42	47	63	62	69	NR	7
	Expresión GPs (% PLT+/IFM)	GP1b α	95/193	98/202	9/141	88/189	97/181	98/274	97/ 271	86/914	100/1.036
		$\beta 3$	12/16	18/10	8/13	0/-	0/-	0/-	31/69	1/-	24/16
		αIIb	18/26	0/-	13/39	1/-	0/-	5/42	57/196	0/-	1/-
	Activación GPIIb/IIIa (PAC-1)	ADP	0,4	0,16	NR	0,6	0,6	0,5	0,4	NR	1,8
PMA		0,5	0,20	NR	1,5	1,5	0,5	0,42	NR	1,6	
Western blot (+, +/-, -)	$\beta 3$	-	-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	
	αIIb	-	+/-	-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	
Alteración molecular	$\beta 3$	Met124Val, c. 773-774delTG, g. 33784-87delTTTGT	N	N	Tyr190Cys	N	N	Met118Arg	NF	NF	
	αIIb	N	Leu183Pro	Cys674Arg	N	Pro848fsdelC Glu507Stop	Val951Met Ala958Thr	N	NF	NF	
Diagnóstico		TG II	TG I	TG II	TG I	TG I	TG I	TG variante	TG I	TG I	

nr: no realizado o no valorable; N: Normal; NF: Estudio no finalizado

en pacientes españoles con TG^(18,19). Por el contrario, los cambios Pro848fsdelC y Glu507STOP en el gen ITGA2B, y las mutaciones 232stop, 33784-33787delTTTGT y Tyr190Cys las identificamos por primera vez en pacientes con TG.

En los 2 pacientes restantes de nuestra serie actual, el estudio molecular se ha iniciado recientemente y aún no se han localizado las potenciales alteraciones moleculares responsables. Recientemente nos han propuesto para estudio otros 5 nuevos pacientes con sospecha de TG.

Así, considerando los 11 casos previamente descritos y nuestra actual serie de 7 nuevos pacientes con

diagnóstico molecular confirmado y otros 2 con un estudio biológico compatible, podemos estimar que la incidencia de TG en España es aproximadamente de 0,5 casos/millón, semejante a la estimada en otras poblaciones. Nuestra serie también pone de manifiesto que un laboratorio no especializado puede ocasionalmente llevar al diagnóstico equivocado de TG, y potencialmente a un manejo clínico incorrecto de los enfermos. Nuevamente, queremos resaltar que la promoción del proyecto de estudio de paciente con trombopatías congénitas en el seno de la SETH quizás sirva para facilitar el diagnóstico y registro de pacientes con TG.

Casuística de los trastornos severos de gránulos plaquetarios: síndromes de Hermansky-Pudlak y de Chediak-Higashi

Estas dos trombopatías que afectan a los gránulos densos plaquetarios⁽⁴⁻⁶⁾ se consideran moderadas en cuanto a la disfunción plaquetaria y la sintomatología hemorrágica, sin embargo son cuadros severos en cuanto a otras manifestaciones clínicas (albinismo oculocutáneo, colitis granulomatosa y fibrosis pulmonar en el SHP; infecciones y fase acelerada en el SCH, con alta prevalencia de fallo orgánico y muerte en la primera década de la vida en la variante infantil de la enfermedad). El SHP esta causado por alteraciones moleculares hasta en 8 genes distintos (HPS-1 a HPS-8), que codifican proteínas implicadas en la génesis y tráfico de organelas tipo lisosomas, entre las que se encuentran los gránulos densos de las plaquetas. El SCH se debe a mutaciones en el gen CHS1, que codifica la proteína LYST, reguladora también del tráfico lisosomal.

Fuera de algunas poblaciones cerradas, como Puerto Rico en el caso del SHP tipo I, la incidencia de estos trastornos es posiblemente inferior a otras trombopatías más severas como el SBS o la TG. En España no se conoce su incidencia, pero en la literatura sólo aparecen citados 2 casos españoles de SHP, 1 de ellos caracterizado funcional y molecularmente por nuestro grupo hace algunos años⁽²⁰⁾. Se trataba de un niño de 8 años, actualmente con 21 años y seguido regularmente en nuestra clínica, con albinismo oculocutáneo tirosinasa positivo, retraso mental y tendencia al sangrado moderado ante situaciones de riesgo hemorrágico menor. El estudio de la funcionalidad plaquetaria reflejó niveles normales de las principales GPs, PFA-100 moderadamente prolongado para el cartucho de Col-Epi, agregación plaquetaria reducida a dosis bajas de ADP, colágeno, epinefrina y ácido araquidónico y captación muy disminuida de ¹⁴C-serotonina. Mediante microscopía electrónica de montaje total se constató la ausencia de gránulos densos en sus plaquetas. La secuenciación del gen HPS-1 demostró la presencia en heterocigosis de 2 mutaciones, InsCys974fs en el exón 11, de herencia materna, y el cambio adquirido Arg131Stop en el exón 5, que no ha sido identificado en otros pacientes con HPS⁽²⁰⁾.

Actualmente estamos desarrollando el estudio molecular de otros 2 pacientes con un fenotipo clínico-biológico compatible con el diagnóstico de HPS, así que la incidencia de esta patología en España podría estar en torno a 0,1 casos.

El SCH es incluso más raro (< 500 casos en todo el mundo) y, según nuestro conocimiento, hasta la fecha se han descrito 37 pacientes portadores de 36 mutaciones distintas en el gen CHS1 (16 mutaciones puntuales, 15 deleciones y 5 inserciones). Más del 70% de los pacientes presentan la forma grave de SCH “forma infantil”, que cursa con una fase acelerada, infecciones

de repetición, sangrado y fallo orgánico, y una minoría exhiben formas “adolescente” o “adulta”, clínicamente más leves. Se ha observado una cierta correlación genotipo-fenotipo en esta enfermedad, de forma que las mutaciones que causan un codón *stop* prematuro (*nonsense* o *frameshift*) se dan en pacientes con la forma infantil o grave de CHS, mientras que las mutaciones de sentido erróneo o *missense* se han observado exclusivamente en pacientes con las formas adolescente o adulta.

Pese a su rareza, también hemos tenido la oportunidad de caracterizar funcional y molecularmente 2 casos de SCH. Uno de ellos⁽²¹⁾ fue un niño de 3 años de origen marroquí cuyos padres eran primos hermanos, que debutó en la fase acelerada de la enfermedad con fiebre, distensión y dolor abdominal. El *propositus* tenía una piel clara, cabello de color gris metalizado, hepatoesplenomegalia, pancitopenia y, en el frotis de sangre periférica, se observaron gránulos gigantes en neutrófilos. El aspirado medular constató grandes cuerpos de inclusión en células mieloides que reaccionan con peroxidasa y el estudio ultraestructural mostró estructuras lamelares y en forma de anillo. El estudio de la función hemostática evidenció prolongación de los tiempos de obturación con PFA-100, agregación defectuosa a agonistas débiles, reducción de la captación de ¹⁴C-serotonina y de mepacrina y ausencia de externalización a la superficie plaquetaria de CD63 sugerente de déficit de lisosomas y gránulos densos. La sospecha de diagnóstico de SCH se confirmó en el análisis molecular del ARN del *propositus* que reveló la presencia en homocigosis de la mutación *missense* Gly3752Arg (11362 G>A en exón 51) que afecta al sexto dominio WD altamente conservado de la proteína. El modelado de la proteína mutada y el análisis de su potencial electrostático, como *software* específicos (ModWeb y método de Poisson-Boltzmann implementado en Swiss-PdbViewer 4.01), indica que la sustitución del pequeño aminoácido hidrofóbico y neutro glicina por uno de mayor tamaño y carácter básico como arginina ocasiona la reorientación en el dominio β -*propeller* de la proteína LYST y una redistribución de la carga, convirtiéndose en una zona más básica y una modificación relevante del potencial electrostático (datos no publicados). Este paciente es especialmente interesante en el conocimiento de esta enfermedad, pues representa el primer caso de SCH infantil que se presenta con una mutación *missense*.

El segundo caso de SCH que hemos tenido la oportunidad de estudiar nos fue remitido recientemente desde Galicia y se trata una adolescente de 19 años que a los 6 consultó por una infección respiratoria del tacto superior. A la exploración presentaba palidez y pelo gris metalizado sin visceromegalias. En el frotis se observaron gránulos gigantes en los granulocitos. El menor de sus dos hermanos también se diagnosti-

có de SCH en base al frotis de sangre periférica y su pigmentación. En nuestra caracterización funcional confirmamos la granulación atípica en los neutrófilos en los dos hermanos, disminución de gránulos densos en las plaquetas por microscopía electrónica (montaje total) y un déficit significativo en la captación de ^{14}C -serotonina y mepacrina, compatible con la sospecha de SCH. El estudio molecular del gen CHS1 ha revelado que los dos hermanos son homocigotos para la mutación Cys258Arg (961T>C en exón 5), que afecta al ARM/HEAT, dominio de la proteína LYST. Los padres también son primos hermanos y se encuentran completamente asintomáticos, siendo portadores heterocigotos de esta mutación, que no ha sido descrita previamente en pacientes con SCH.

Casuística de otros trastornos plaquetarios

Además de los casos descritos arriba, esporádicamente nos remiten pacientes con tendencia hemorrágica moderada, con o sin otra sintomatología asociada, y sospecha de disfunción plaquetaria al haberse descartado otras patologías hemorrágicas como la enfermedad de von Willebrand (EvW). En algunos de estos pacientes, la entrevista clínica inicial desveló un trastorno plaquetario adquirido generalmente por toma de medicación no informada previamente, lo que refuerza la importancia de esta fase de cribado en el diagnóstico inicial.

En esta miscelánea de pacientes, recientemente estudiamos una familia con un posible trastorno del gen MYH9, al presentar el *propositus*, un niño de 1 año, macrotrombocitopenia e hipoacusia. Estas características estaban presentes también en su hermana y su padre, ambos portadores de audífonos, y también había antecedentes familiares de cataratas, todo ello apoyando la sospecha clínica de un cuadro MYH9 tipo Fechtner o Sebastián⁽²²⁾. Nuestro estudio biológico confirmó la macrotrombocitopenia moderada con macrodismorfia plaquetaria, si bien no se apreciaba claramente granulación atípica clara ni cuerpos de inclusión leucocitarios. La valoración estándar de la función plaquetaria no mostró alteraciones significativas (PFA-100, patrón de agregación, GPs plaquetarias, captación de mepacrina y externalización de CD62 y CD63 normales). La secuenciación del cADN con oligonucleótidos específicos de los exones del gen MYH9 no ha revelado ninguna mutación en la porción codificante de este gen y, por tanto, no apoya el diagnóstico de un síndrome MYH9 en esta familia. No obstante, no podemos descartar la presencia de mutaciones en regiones intrónicas flanqueantes que altere la expresión normal del gen, o la existencia de alteraciones moleculares en otros genes que den lugar al fenotipo clínico de estos pacientes.

Para terminar, en nuestra casuística de pacientes tenemos tipificados varios pacientes con alteración de la señalización intraplaquetaria, que parece ser una forma relativamente común de disfunción plaquetaria entre los pacientes con sintomatología hemorrágica moderada de carácter hereditario. En estos pacientes, el estudio analítico muestra comúnmente recuento y morfología plaquetaria normal, PFA-100 normal o discretamente alargado para el cartucho de Col-Epi y niveles normales de las principales GPs plaquetarias. La captación de ^{14}C -serotonina y/o mepacrina y la microscopía electrónica plaquetaria son normales, excluyendo un defecto granular. Sin embargo, la disfunción plaquetaria se refleja en un patrón de agregación reducida con dosis bajas de múltiples agonistas y en valores disminuidos de múltiples parámetros de activación en respuesta a agonistas, como externalización de CD62, generación de TxA₂, movilización de calcio, fosforilación general de proteínas en tirosina o la fosforilación selectiva de proteínas como VASP en respuesta a ADP o EPI. En uno de estos casos⁽²³⁾, estas anomalías de señalización parecen relacionadas con un déficit del 50% en los niveles de G α_i , una proteína G inhibidora de la generación de AMPc acoplada a receptores como ADRA2A, receptor de epinefrina, y P₂Y₁₂, uno de los receptores plaquetarios de ADP que es diana de tianopiridinas como el clopidogrel.

La identificación de la(s) alteración(es) molecular(es) subyacente(s) en estos casos de trastornos de señalización no puede abordarse de forma convencional, puesto que el estudio de laboratorio es en general inespecífico y no señala cuál es la proteína (gen) que puede estar alterada entre los muchos candidatos posibles. De modo experimental, en 2 familias de nuestra casuística de trastornos de señalización hemos abordado un estudio molecular con la aproximación metodológica del análisis de ligamiento genético. Este método se basa en el análisis de la transmisión de marcadores polimórficos del ADN distribuidos por todo el genoma en los miembros disponibles de la familia en estudio, para identificar alelos que cosegregan con la enfermedad y que los familiares no afectados no presentan. Mediante *software* específico se determina, con distintos modelos de herencia, la probabilidad de ligamiento entre la enfermedad y los alelos marcadores. Ello permite la localización de regiones cromosómicas que albergan genes potencialmente implicados en el desarrollo de la enfermedad, cuyas secuencias se analizan y comparan en los familiares afectados y no afectados. Aplicando esta metodológica en estas 2 familias, hemos identificado señales de ligamiento genético significativo (LOD \geq 2,5) con el fenotipo de sangrado en varios cromosomas y, en particular, en las regiones 5q13.2-q13.31 (LOD = 2,5; marcadores rs1200485 a rs4704233) y 22q13.31 (LOD = 2,9; marcadores rs714022 a rs2017931). Entre los 21 genes co-

nocidos y 2 micro-ARNs que albergan estas zonas se encuentran genes como (p190RhoGEF), implicado en los procesos de reorganización de actina, y los genes CERK y COL4A3BP, asociados con el transporte de ceramidas y su transformación a esfingolípidos sustrato de la fosfolipasa A₂. Estos genes pueden tener relevancia en la fisiología plaquetaria y, llamativamente, zonas cromosómicas próximas contienen genes responsables de trastornos plaquetarios conocidos, como MYH9 (22q12-13, síndrome de May-Hegglin) o GP1BB (22q11, SBS). No obstante, la implicación real de estos genes candidatos en la disfunción plaquetaria en estas 2 familias está aún bajo investigación.

Conclusiones

La patología plaquetaria congénita es muy heterogénea en cuanto a sus manifestaciones clínicas, alteraciones funcionales y base molecular. Su incidencia real en España, como en el resto del mundo, no es conocida por la escasez y dificultad de estudios epidemiológicos en este campo. No obstante, se estima que la prevalencia de trastornos plaquetarios es globalmente igual o superior a otras patologías hemorrágicas como la EvW, si bien las trombopatías más severas como el SBS o la TG son patologías raras. Para tener una perspectiva aproximada de la realidad española respecto de la incidencia y gestión del diagnóstico de pacientes con trombopatías congénitas, hemos realizado una encuesta a servicios de hematología de hospitales de toda España. De las respuestas proporcionadas por 37 servicios se deduce que esta patología es más frecuente en España de lo que se referencia en la literatura, que el diagnóstico molecular es un objetivo pendiente y que existe gran interés en la disponibilidad de centros de referencia para el diagnóstico clínico-biológico y molecular de estos enfermos. Una colaboración estrecha con otros centros nos ha permitido recientemente la caracterización biológica y molecular de nuevos casos españoles de trombopatías clínicamente relevantes (SBS, TG, SHP y SCH), identificando nuevas mutaciones no descritas previamente en enfermos con estas patologías.

Agradecimientos

Damos las gracias a la SEHH y a la SETH por su ayuda en la difusión de la encuestas sobre trombopatías congénitas. También a la SETH por su apoyo a la puesta en marcha del proyecto sobre estudio de pacientes con trombopatías en el seno del Grupo de Trabajo de Patología Hemorrágica. Queremos agradecer la colaboración de todos los compañeros hematólogos que amablemente han contestado y nos han enviado la encuesta. Asimismo, agradecemos muy especial-

mente a los doctores F. Velasco, A. Cid, F. Candel, M. Lozano, M.F. López, J.L. Fuster, J.F. Lucía, N. Bermejo, R.M. Fisac, C. Pascual, J.M. Rodríguez, J.M. Couselo, A. Galea y M. Maicas, por enviarnos información clínica y muestras de sangre de pacientes. Nuestro grupo de investigación está financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias-Instituto de Salud Carlos III y Fondos Feder (PI10/02594), Fundación Séneca (04515/GERM/06, 03116/PI/05) y Red RECAVA (RD06/0014/0039). Isabel Sánchez Guiu es becaria del Fondo de Investigaciones Sanitarias (N.º Expte.: FI10/00535). Ana Isabel Antón es investigadora sénior contratada por Red RECAVA (Instituto de Salud Carlos III).

Referencias bibliográficas

- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009; 94: 700-11.
- Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* 2011; 25 (4): 155-67.
- Navarro-Núñez, Lozano ML, Antón AI, Roldán V, Martínez C, Vicente V, Rivera J. Trastornos de receptores de membrana plaquetar. *Haematologica* (ed. esp.) 2008; 93 (Supl. 1): 253-62.
- Pujol-Moix N. Patología intraplaquetaria de base genética. *Haematologica* (ed. esp.) 2008; 93 (Supl. 1): 263-9.
- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135: 603-33.
- Rivera J, Lozano ML, Vicente V. Trastornos plaquetarios congénitos: aproximación al diagnóstico funcional y molecular. *Trombosis y Hemostasia*. IV Curso de Formación Continuada. SETH. pp 1-15. SETH.
- Rivera J, Navarro-Núñez L, Lozano ML, Martínez C, Corral J, González Conejero R, Vicente V. Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. *Haematologica* (ed. esp.) 2007; 92 (Supl. 1): 48-62.
- Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost* 2008; 99: 253-63.
- Salles II, Feys HB, Iserbyt BF, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmy H. Inherited traits affecting platelet function. *Blood Rev* 2008; 22: 155-72.
- Nurden P, Dreyfus M, Favier R, Négrier C, Schlégel N, Sie P, Nurden A. Reference center for platelet diseases. *Arch Pediatr* 2007; 14: 679-82.
- Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyser (PFA-100) closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 312-9.
- Sanchez MJ, Rivera J, Moraleda JM, Vicente V. Quantitative and qualitative abnormalities of glycoprotein Ib in Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost* 1993; 69 (6 Suppl.): abstract 1519.
- González-Manchón C, Butta N, Iruín G, Alonso S, Ayuso MS, Parrilla R. Disruption of the Cys5-Cys7 disulfide bridge in the platelet glycoprotein Ibbeta prevents the normal maturation and surface exposure of GPIb-IX complexes. *Thromb Haemost* 2003; 90: 456-64.
- Simsek S, Noris P, Lozano M, Pico M, von dem Borne AE, Ribera A, Gallardo D. Cys209 Ser mutation in the platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene is associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol* 1994; 88: 839-44.
- González-Manchón C, Larucea S, Pastor AL, Butta N, Arias-Salgado EG, Ayuso MS, Parrilla R. Compound heterozygosity of

- the GPIIb gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1385-91.
16. Arias-Salgado EG, Tao J, González-Manchón C, Butta N, Vicente V, Ayuso MS, Parrilla R. Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thrombasthenic phenotype. Failure of GPIIb(delta597-1008) to form stable complexes with GPIIIa. *Thromb Haemost* 2002; 87: 684-91.
 17. Jayo A, Conde I, Lastres P, Martínez C, Rivera J, Vicente V, González-Manchón C. L718P mutation in the membrane-proximal cytoplasmic tail of beta 3 promotes abnormal alpha IIb beta 3 clustering and lipid microdomain coalescence, and associates with a thrombasthenia-like phenotype. *Haematologica* 2010; 95: 1158-66.
 18. González-Manchón C, Butta N, Larrucea S, Arias-Salgado EG, Alonso S, López A, Parrilla R. A variant thrombasthenic phenotype associated with compound heterozygosity of integrin beta3-subunit: (Met124Val)beta3 alters the subunit dimerization rendering a decreased number of constitutive active alphaIIb-beta3 receptors. *Thromb Haemost* 2004; 92: 1377-86.
 19. González-Manchón C, Fernández-Pinel M, Arias-Salgado EG, Ferrer M, Alvarez MV, García-Muñoz S, et al. Molecular genetic analysis of a compound heterozygote for the glycoprotein (GP) IIb gene associated with Glanzmann's thrombasthenia: disruption of the 674-687 disulfide bridge in GPIIb prevents surface exposure of GPIIb-IIIa complexes. *Blood* 1999; 93: 866-75.
 20. González-Conejero R, Rivera J, Escolar G, Zuazu-Jausoro I, Vicente V, Corral J. Molecular, ultrastructural and functional characterisation of a Spanish family with Hermansky Pudlak Syndrome. Role of insC974 in the organogenesis of platelet dense granules and clinical relevance. *Br J Haematol* 2003; 123: 132-8.
 21. Antón A, Sánchez-Guiu I, Fernández-Navarro J, Fuster JL, González MH, Ortuño F, et al. Primer caso de mutación missense en un caso de Chediack-Higashi infantil con presentación en fase acelerada: cae el dogma de correlación fenotipo-genotipo. *Haematologica (ed. esp.)* 2010; 95 (Supl. 2): 22.
 22. Althaus K, Greinacher A. MYH9-related platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 189-203.
 23. Guerrero JA, Lozano ML, Zuazu-Jausoro I, Corral J, Martínez C, González-Conejero R, et al. Platelet dysfunction associated with reduced Gai expression in a family with inherited bleeding disorder. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (Suppl. 1): 2118.
 24. Bernal A, Lozano ML, Pita G, Navarro N, Baeza M, González A, et al. Identificación de determinantes genéticos en dos familias con disfunción plaquetaria congénita de causa desconocida. *Haematologica (ed. esp.)* 2009; 94 (Supl. 2): 25.