

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LA
PÚRPURA TROMBÓTICA TROMBOCITOPÉNICA CONGÉNITA
(SÍNDROME DE UPSHAW-SCHULMAN)**

PROPUESTA DE ESTUDIO AL GRUPO ESPAÑOL DE AFÉRESIS

Junio 2016

ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La Púrpura Trombótica Trombocitopénica (PTT) es una enfermedad caracterizada por el déficit de la enzima ADAMTS13, que es la encargada de escindir los multímeros circulantes de factor von Willebrand (FvW). Su ausencia determina el desarrollo de una microangiopatía trombótica, ya que estos multímeros persisten en la circulación y trombosan los pequeños vasos de manera diseminada en el organismo.¹ Pese al avance que ha supuesto la utilización precoz de los recambios plasmáticos y la infusión plasma en estos pacientes, la mortalidad precoz y la morbilidad siguen siendo importantes.²

La mayoría de casos de PTT se deben a la aparición de autoanticuerpos que inhiben la actividad de ADAMTS13.³ Sin embargo, existe también una forma hereditaria de esta enfermedad ocasionada por la presencia de mutaciones del gen *ADAMTS13* que provocan una disminución drástica de su actividad enzimática.⁴ La PTT congénita es también conocida como síndrome de Upshaw–Schulman en honor a sus descubridores.⁵ Es una enfermedad muy poco frecuente, con una prevalencia desconocida, pero se estima que puede suponer entre el 5 y el 10% de las PTT.⁶ Es por ello que la mayoría de publicaciones son casos únicos o series cortas de pacientes, haciendo difícil un conocimiento profundo de la enfermedad.

Los pacientes con PTT congénita suelen debutar en la etapa neonatal o en la primera infancia, pero también pueden hacerlo en la edad adulta.^{7,8} La agresividad clínica de la enfermedad es variable, de modo que algunos pacientes precisan infusiones periódicas de plasma para mantenerse asintomáticos y otros sólo manifiestan síntomas en momentos puntuales, muchas veces en relación a algún agente desencadenante como las infecciones, algunos fármacos o, más típicamente, el embarazo.⁹

Genéticamente, la PTT congénita es muy heterogénea, habiéndose descrito más de 130 mutaciones diferentes. Prácticamente cada familia presenta una mutación distinta y éstas se localizan de manera bastante homogénea a lo largo de todo el gen y sus dominios.¹⁰ Estas mutaciones afectan tanto a los procesos de síntesis de la proteína, como a su actividad, o más frecuentemente, a su secreción. Algunos datos de la literatura sugieren que podría existir una correlación entre el tipo de mutación, la actividad residual de la enzima y la agresividad clínica.⁸ Sin embargo, también es verdad que hermanos con la misma mutación muestran una gran variabilidad clínica,¹¹ por lo que el déficit de ADAMTS13 provocado por dicha mutación no explicaría todo el fenotipo de la enfermedad. De hecho, se ha postulado que los SNPs presentes en esta enzima podrían justificar en parte esta variabilidad.¹² Además, se sabe que muchas veces se requieren desencadenantes como el embarazo, infecciones o fármacos para desencadenar la enfermedad. Algunas publicaciones han comunicado que también podría haber modificadores genéticos como polimorfismos en genes

relacionados con la regulación de la cascada de la coagulación, el FvW, la función plaquetar o el endotelio vascular.¹³⁻¹⁶ Esta necesidad de cooperación de diferentes factores en la PTT también se ha demostrado en el modelo murino.¹⁷ Por último, las mutaciones de *ADAMTS13* podrían tener una penetrancia incompleta.

El Grupo Español de Aféresis (GEA) posee una gran experiencia en el diagnóstico y manejo de la PTT.¹⁸⁻²¹ El grupo posee gran interés en continuar profundizando en el conocimiento de la PTT y mejorar su tratamiento a nivel nacional, tal y como lo demuestra la creación de guías de tratamiento y de un registro nacional de PTT. En el momento actual existen 14 casos de PTT congénita registrados, algunos de ellos con estudio biológico y genético realizado. Sin embargo, las técnicas empleadas para su estudio han sido heterogéneas o incompletas en muchos casos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La PTT congénita es una enfermedad hereditaria poco frecuente y heterogénea clínica y genéticamente. Conocer la correlación genotipo-fenotipo, así como los diferentes factores que podrían condicionar la aparición de episodios de PTT servirían para predecir el comportamiento clínico de cada caso y poder realizar intervenciones terapéuticas precoces.

Por ello, se plantean los siguientes objetivos:

1. Creación de una colección nacional de muestras biológicas de pacientes con PTT congénita y sus familiares de primer grado.
2. Caracterización detallada del curso clínico de estos pacientes.
3. Medición homogénea de la actividad enzimática de *ADAMTS13* y presencia de auto-anticuerpos.
4. Estudio de mutaciones del gen *ADAMTS13* completo mediante secuenciación masiva.
5. Planificar, en base a los resultados clínicos y moleculares, nuevos estudios biológicos para dilucidar los mecanismos responsables de la variabilidad fenotípica de esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Creación de la colección de PTT congénita en el Biobanco La Fe

Se solicitará colaboración a todos aquellos pacientes registrados en la base de datos de PTT del GEA (n=14) y a todos aquellos casos no registrados que deseen participar en este estudio. Además de recoger muestras de los casos de PTT congénita, se recogerán muestras de todos aquellos familiares de primer grado (padres, hijos, hermanos) que consientan participar. Para ello, se precisará explicación y firma del consentimiento informado de cada paciente/familiar antes de la extracción de muestras (Anexo 1). Las muestras necesarias para la creación de la colección son muestras de sangre venosa en los siguientes tubos:

- 2 tubos de EDTA de 5 mL (tapón morado)
- 2 tubos de citrato de 5 mL (tapón azul)

En el caso de que sean pacientes recibiendo transfusión de plasma, realizar la extracción justo antes de la infusión del mismo.

Las muestras deberán llegar correctamente identificadas (rotular los tubos con identificación y fecha de extracción) y acompañadas del consentimiento informado y los datos clínicos asociados. Se deberá coordinar el envío de muestras para que éstas lleguen al Biobanco La Fe antes de las 17h del mismo día de la extracción, si bien lo preferible será contactar con el Biobanco para informar del envío (biobanco_lafe@iislafe.es; raquel_amigo@iislafe.es; telf. 626494032)

En caso de dificultad para conseguir estas condiciones, también se puede contactar con Inés Gómez (gomez_ine@gva.es; telf. 961 24 46 28).

Dirección de envío:

A/A Raquel Amigó
Biobanco La Fe
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
Avenida Fernando Abril Martorell, 106, Torre A - Sótano
46026 - Valencia

Caracterización clínica

Previamente los casos se habrán introducido en el registro de PTT y deben tener el Consentimiento informado incluido. Además deberán de recoger un formulario les desencadenantes y necesidad de soporte transfusional (anexo 2).

Estudios bioquímicos

En todas las muestras se medirá la actividad de ADAMTS13 mediante la técnica ELISA y el kit *TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity ELISA* de Technoclone. También se descartará la presencia de inhibidores con el kit *TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH* de Technoclone.

Secuenciación del gen ADAMTS13

El estudio de secuenciación génica se llevará a cabo mediante la tecnología de secuenciación masiva en el equipo Ion PGM® System de Ion Torrent® utilizando un panel específico que escrutará la región exónica y también intrónica del gen *ADAMTS13*. El análisis de las lecturas se realizará mediante el programa *Ion Reporter®* con unos *scripts* informáticos desarrollados en nuestro propio centro.

Análisis de resultados y planteamiento de nuevos proyectos

Se analizará la presencia de mutaciones exónicas, intrónicas y variantes polimórficas en el gen *ADAMTS13*. Con cada una de ellas se pretende:

- Localizar la alteración en los diferentes dominios protéicos
- Predecir *in silico* la alteración funcional en la proteína
- Establecer la penetrancia de la alteración según su expresión fenotípica en el resto de familiares
- Valorar la presencia de otros polimorfismos que favorezcan la aparición de microangiopatía.

CRONOGRAMA

	Jul – Sep 2016	Oct – Dic 2016	Ene – Mar 2017	Abr – Jun 2017
Creación de la colección				
Estudios bioquímicos				
Estudios genéticos				
Análisis de resultados				
Elaboración de publicaciones				

RELEVANCIA CIENTÍFICA Y PERTINENCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La PTT congénita es una enfermedad rara, y por tanto precisa ser estudiada en el seno de grupos cooperativos que adquieran la experiencia y conocimiento necesarios para poder mejorar el manejo de estos pacientes. Actualmente el GEA se encuentra en disposición de llevar a cabo esta labor, impulsando el enriquecimiento del registro de PTT en todo el ámbito nacional y acompañándolo de una colección de muestras biológicas que sirva de base para futuros proyectos.

El diagnóstico biológico y molecular de la PTT congénita no ha estado ni está aún hoy al alcance de todos los centros en España, por lo que las determinaciones de actividad enzimática, presencia de inhibidores y secuenciación del gen se han realizado en diversos laboratorios, incluso extranjeros, y con metodologías diferentes. En este sentido, el presente proyecto permitirá homogeneizar dichas determinaciones y hará posible la comparación entre pacientes. Por otro lado, la posibilidad de secuenciar al completo el gen *ADAMTS13* proporcionará información, no sólo de las mutaciones en los diferentes dominios funcionales, sino también de la existencia de variantes polimórficas a lo largo de todo el gen, incluyendo los intrones.

Por último, la labor iniciada en este trabajo y los resultados esperables de él permitirán labrar las bases para planificar futuros estudios en torno a la PTT congénita.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tsai H-M. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*. 2010;91(1):1–19.
2. Crawley JTB, Scully MA. Thrombotic thrombocytopenic purpura: basic pathophysiology and therapeutic strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013(1):292–299.
3. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998;339(22):1585–1594.
4. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001;413(6855):488–494.

5. Upshaw JD. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 1978;298(24):1350–1352.
6. Reese JA, Muthurajah DS, Hovinga JAK, et al. Children and adults with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe, acquired ADAMTS13 deficiency: comparison of incidence, demographic and clinical features. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(10):1676–1682.
7. Uchida T, Wada H, Mizutani M, et al. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004;104(7):2081–2083.
8. Lotta LA, Wu HM, Mackie IJ, et al. Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012;120(2):440–448.
9. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, et al. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol.* 2008;144(5):742–754.
10. Pérez-Rodríguez A, Lourés E, Rodríguez-Trillo Á, et al. Inherited ADAMTS13 deficiency (Upshaw-Schulman syndrome): a short review. *Thromb Res.* 2014;134(6):1171–1175.
11. Veyradier A, Lavergne J-M, Ribba A-S, et al. Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost.* 2004;2(3):424–429.
12. Plaimauer B, Fuhrmann J, Mohr G, et al. Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. *Blood.* 2005;107(1):118–125.
13. Desch KC, Motto DG. Thrombotic thrombocytopenic purpura in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(9):1901–1908.
14. Lotta LA, Wu HM, Musallam KM, Peyvandi F. The emerging concept of residual ADAMTS13 activity in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Rev.* 2013;27(2):71–76.
15. Noris M, Bucchioni S, Galbusera M, et al. Complement factor H mutation in familial thrombotic thrombocytopenic purpura with ADAMTS13 deficiency and renal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(5):1177–1183.
16. Vanhoorelbeke K, De Meyer SF. Animal models for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2013;11 Suppl 1:2–10.
17. Banno F, Kokame K, Okuda T, et al. Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2005;107(8):3161–3166.
18. Del Río-Garma J, Alvarez-Larrán A, Martínez C, et al. Methylene blue-photoinactivated plasma versus quarantine fresh frozen plasma in thrombotic

thrombocytopenic purpura: a multicentric, prospective cohort study. *Br J Haematol.* 2008;143(1):39–45.

19. del Río-Garma J, Pereira A, Arroyo JL, et al. ADAMTS-13 activity and von Willebrand factor levels in methylene-blue photo-inactivated plasma processed by either the Springe method or an “in house” system. *Vox Sang.* 2008;95(2):101–105.

20. la Rubia de J, Moscardó F, Gómez MJ, et al. Efficacy and safety of rituximab in adult patients with idiopathic relapsing or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura: results of a Spanish multicenter study. *Transfus Apher Sci.* 2010;43(3):299–303.

21. Alvarez-Larrán A, Del Río-Garma J, la Rubia de J, et al. Newly diagnosed versus relapsed idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a comparison of presenting clinical characteristics and response to treatment. *Ann Hematol.* 2009;88(10):973–978.