

LO QUE LA NATURALEZA NOS ENSEÑA DE LA DEFICIENCIA DE ANTITROMBINA



Javier Corral
Profesor de Hematología Experimental

Departamento de Medicina

Universidad de Murcia, España

11 Junio 2021

Quiero empezar mi discurso de toma de posesión como académico correspondiente de la Real Academia de Medicina de Murcia agradeciendo profunda y sinceramente a esta acreditada Institución por el honor que me concede al invitarme a formar parte de una Entidad centenaria, con una trayectoria de reconocido prestigio, y que no solo ha estado presente como actor protagonista de la actividad docente, científica, asistencial y de difusión del día a día en Medicina en la Región de Murcia, sino que ha sido capaz de adaptarse a los tiempos y evolución de una Sociedad que cada día precisa de profesionales con diferentes formaciones y habilidades para dar una respuesta integral a todos y cada uno de los problemas sanitarios. Es imprescindible contar con expertos de áreas que hace escasamente una década apenas se vinculaban a la Medicina como los bioinformáticos, físicos, matemáticos, biólogos, bioquímicos, químicos, farmacéuticos, y por supuesto realizar una comunión de aspectos biológicos y médicos, básicos y clínicos para conseguir la Medicina del siglo XXI que nuestra sociedad merece. No tengan duda que daré todo lo mejor de mi para contribuir a este reto y aportar mis humildes habilidades para asistir al crecimiento de esta Institución.

Y en este sentido tengo que hacer un especial y entrañable reconocimiento a la figura del Prof. Vicente Vicente. Hace ya 30 años que el Prof. Vicente me propuso participar en un reto complicado cuando creó unos de los ejemplos de eficacia y calidad docente, asistencial e investigadora de la Región de Murcia, el que hoy es Servicio de Hematología y Oncología Clínica del Hospital Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, y Grupo de Excelencia Investigadora de Hematología y Oncología Clínico Experimental. Desde el primer día, solo puedo mostrar mi agradecimiento profesional y personal al Prof. Vicente por todo lo que he aprendido de él, por su actitud, conocimiento, habilidades, y su saber hacer, y sobre todo por haber sido un visionario de la medicina moderna. Por apostar por un grupo multidisciplinario y dar no solo oportunidades, sino confianza y libertad.

Les confieso que cuando empecé a plantear este discurso, me situaba en la misma tesitura a la que me enfrento cuando intento motivar a los estudiantes que van a iniciar una tesis doctoral conmigo porque tengo que darles argumentos para pensar que todavía hay margen para poder conocer e investigar en un campo que se podría considerar un clásico, porque en ciencia, cualquier campo con más de 10 años se puede considerar clásico. En el mundo de la

inmediatez, de la novedad, del titular, aspectos clásicos están denostados y consiguen poco atractivo para las nuevas generaciones, ni siquiera como modelo. Veremos si soy capaz de conseguirlo.

Porque el campo del que hoy les voy a hablar es un campo que quizás muchos consideren demasiado específico y “viejo”. Quiero que sigan mi lectura con la perspectiva de no quedarse con ningún dato, sino con ideas, con aproximaciones, con perspectivas que espero puedan aplicar en sus campos o intereses correspondientes.

Y es que la antitrombina es una molécula realmente antigua. Las primeras citas de Schmidt a una citoglobulina que previene la coagulación del plasma de caballo datan de 1892, y el nombre de antitrombina lo introduce Morawitz a principios del siglo XX para referirse a la molécula responsable de la pérdida gradual de la actividad de la trombina cuando el coágulo se ha formado. El desorden congénito del que voy a hablar, la deficiencia de antitrombina, es la primera trombofilia congénita que se identificó, allá por 1965, justo cuando yo nacía. El hematólogo Noruego Olav Egeberg notificó la asociación entre este fenotipo, la deficiencia de antitrombina y la aparición de eventos trombóticos en diferentes miembros de una familia. Normalmente cuando algo es lo primero, es porque es importante.



Deficiencia de antitrombina

- Deficiencia de AT (niveles <50%)
 - Trombosis temprana y recurrente
- 1965: Olav Egeberg

Antitrombina

- 1892: A. Schmidt

Cytoglobulin prevents coagulation in horse plasma

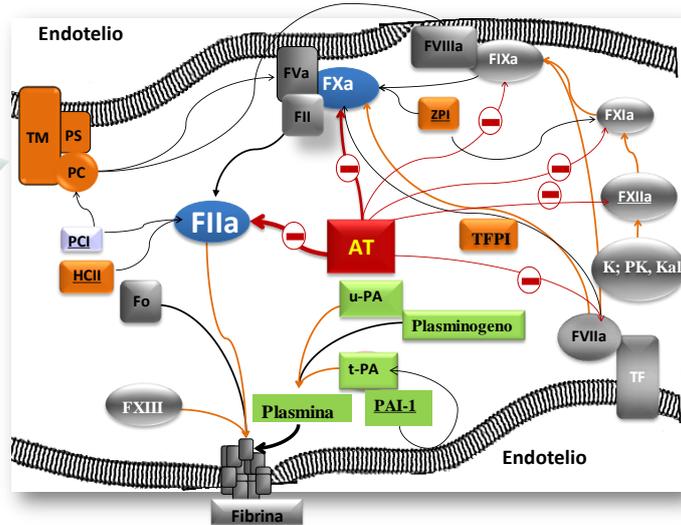
- 1905: P. Morawitz

AT: responsible for the gradual loss of thrombin activity after blood had clotted

Y efectivamente hay razones para ello, para que la deficiencia de antitrombina fuera la primera trombofilia identificada. Esta es la cascada de la coagulación, un esquema aparentemente sencillo pero que evita la letalidad derivada del daño endotelial en organismos con un sistema circulatorio cerrado y de alta presión como el nuestro. Esta respuesta debe ser contundente e inmediata, porque no puede depender de la síntesis proteica. Por ello es un conjunto seriado de reacciones proteolíticas en cascada que culminan en la formación de trombina, la última serin proteasa procoagulante responsable no solo de la formación del coágulo de fibrina, sino también de la activación y agregación plaquetaria. Pero no piensen que el protagonismo de la coagulación lo tiene la trombina. El Prof. Terry Rabbitts, con quien realicé mi estancia postdoctoral en Cambridge, decía muy acertadamente que el poder de cualquier sistema no lo tiene el poderoso, el fuerte. Lo tiene quien controla al poderoso. En la coagulación el poder real lo tiene la antitrombina, por ser el principal inhibidor endógeno de la trombina y de la práctica totalidad de serin proteasas procoagulantes.

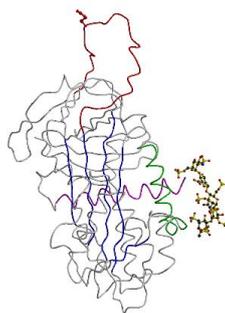
Relevancia hemostática de la antitrombina

Prof. Terry Rabbits

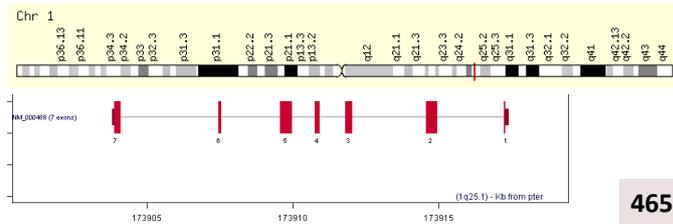


Y además lo hace a través de un mecanismo extraordinario que se ha comparado al de un cepo de ratón y que conocemos al detalle estructural, tal es el grado de conocimiento de este anticoagulante. En este video pueden comprobar a escala molecular el mecanismo de inhibición por suicidio de esta serpina, y así comprender el peso hemostático de la antitrombina lo que justifica que la deficiencia incluso moderada de este anticoagulante endógeno incremente notablemente el riesgo trombótico.

El estudio de esta molécula también ha permitido el desarrollo de una de las terapias más antiguas y exitosas empleadas en el tratamiento y profilaxis antitrombótico, las heparinas, cofactor de la antitrombina que aumentan más de 1000 veces la actividad anticoagulante por este mecanismo de activación, que como ven de nuevo, se conoce con pleno detalle.



Desde el punto de vista molecular, la deficiencia de antitrombina es un desorden simple, ya que se considera un trastorno monogénico, autosómico, y dominante. Es decir, la simple mutación de un alelo del gen SERPINC1, un gen sencillo que codifica la antitrombina, provoca la deficiencia y el riesgo trombótico. Hasta la fecha se han descrito más de 465 variantes genéticas diferentes implicadas en este desorden, un dato más que refleja tanto el interés de esta enfermedad como su grado de conocimiento.



SERPINC1

13 Kb

7 exones

465 variantes genéticas diferentes



Y precisamente ante esta situación de gran conocimiento, plantear nuevas perspectivas de estudio de este desorden obliga necesariamente a buscar aproximaciones originales, de interés y potencial aplicación. ¿Pero como hacerlo? Pues bien, en este punto es donde yo creo que la mirada a la naturaleza puede aportar ideas y soluciones. Porque todos los médicos e investigadores aman la naturaleza,

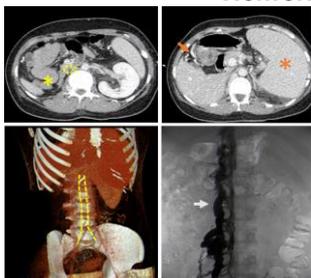
al menos esta naturaleza, aunque sea complicado alcanzarla.

A mi me encanta la naturaleza real, porque me parece siempre bella, incluso cuando pueda llegar a ser devastadora, y ocurre lo mismo con la fisiopatología. Lo que quiero mostrarles en mi presentación, es que la naturaleza es una fuente de inspiración en la actividad investigadora, especialmente para los grupos como el nuestro que no disponen de recursos económicos para crear otras realidades. Porque la naturaleza nos muestra sorpresas inesperadas. El Prof. Robin Carrell, con quien disfruté un año como Fellow del Trinity College, indicaba muy acertadamente que los pacientes son experimentos únicos de la naturaleza. Y a diferencia de los mundos casi perfectos que podemos llegar a crear en la actualidad, a la realidad virtual que se está implantando en nuestras vidas, la naturaleza es siempre real. Lo que veamos en la naturaleza, en los pacientes, tengan la certeza que ocurre, que es real, existe. Además, en la naturaleza nada es sencillo. Todo es complejo, también el enfermar.

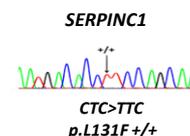
Por tanto, como dice el Prof. Vicente, lo que tenemos que hacer es tener los ojos abiertos y saber ver, porque a la corta o a la larga, al final todo se descubre. Si sabemos mirar podemos descubrir. Y este es un buen ejemplo. Este estudio que han liderado los Dres. de la Morena y Bravo comenzó con un caso, una mujer de 26 años con historia trombótica temprana que estaba anticoagulada e ingresó en el hospital Reina Sofia por una hemorragia digestiva. Al suspender el tratamiento anticoagulante vuelve a sufrir una trombosis, que se intentó tratar con heparina sin éxito. Estos hechos nos dirigieron a la antitrombina, y mediante una aproximación molecular, identificamos una alteración muy grave y rara, una mutación que afecta al dominio de unión a heparina, pero en homocigosis. Este descubrimiento que explica la resistencia a la heparina y la historia trombótica, permitió la elección de un tratamiento específico, el uso de concentrados de antitrombina, que fueron capaces de controlar el problema trombótico sin incrementar el riesgo hemorrágico. Pero este resultado tan satisfactorio clínicamente no terminó aquí. En el estudio de la causa de la hemorragia digestiva los radiólogos informaron de un hecho que en este contexto no se le dio ninguna importancia: la paciente tenía una agenesia de la vena cava inferior. Abrir los ojos.

- Mujer, 26 años ETEV (24 años)

- Hemorragia digestiva Suspende TAO Trombosis



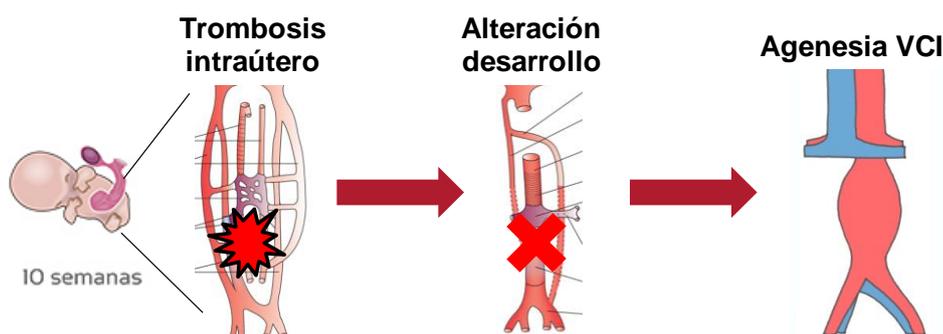
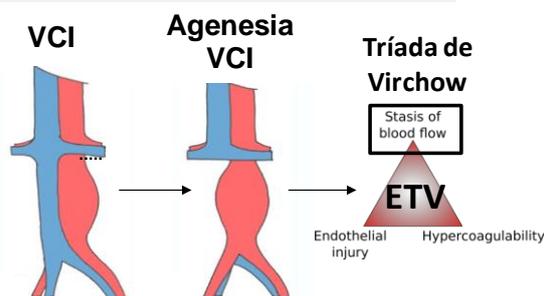
- Resistencia a heparina
- AT Budapest 3 (p.L131F) homocigota
- Concentrados de antitrombina



Agenesia de vena cava ¿Qué es esto? Les confieso que era la primera vez que oía hablar de esta malformación congénita rara, cuyo diagnóstico, como en nuestro caso es incidental por pruebas de imagen. Pero ojo, había algo relacionado con nuestro campo: ¡incrementa 10 veces el riesgo de sufrir eventos tromboticos venosos! Porque se pensaba que afectaba una de las patas de la triada de Virchow: aumentaba la estasis. Y lo mas interesante para alguien que busca: su etiopatogenia es desconocida, no se conoce su base molecular. Aunque, y de nuevo suenan las alarmas, hay autores que sugieren que podría ser la consecuencia de un evento trombotico uterino. Entonces surge la hipótesis: ¿podría una trombofilia grave como la que tiene nuestra paciente estar en la base de una agenesia de cava?

Agenesia de vena cava

- Malformación congénita rara (0,07%).
- Diagnóstico incidental en pruebas de imagen.
- Riesgo 10 veces superior de ETEV.
- Etiopatogenia desconocida. No base molecular.
- **Hipótesis: evento trombotico intrauterino**



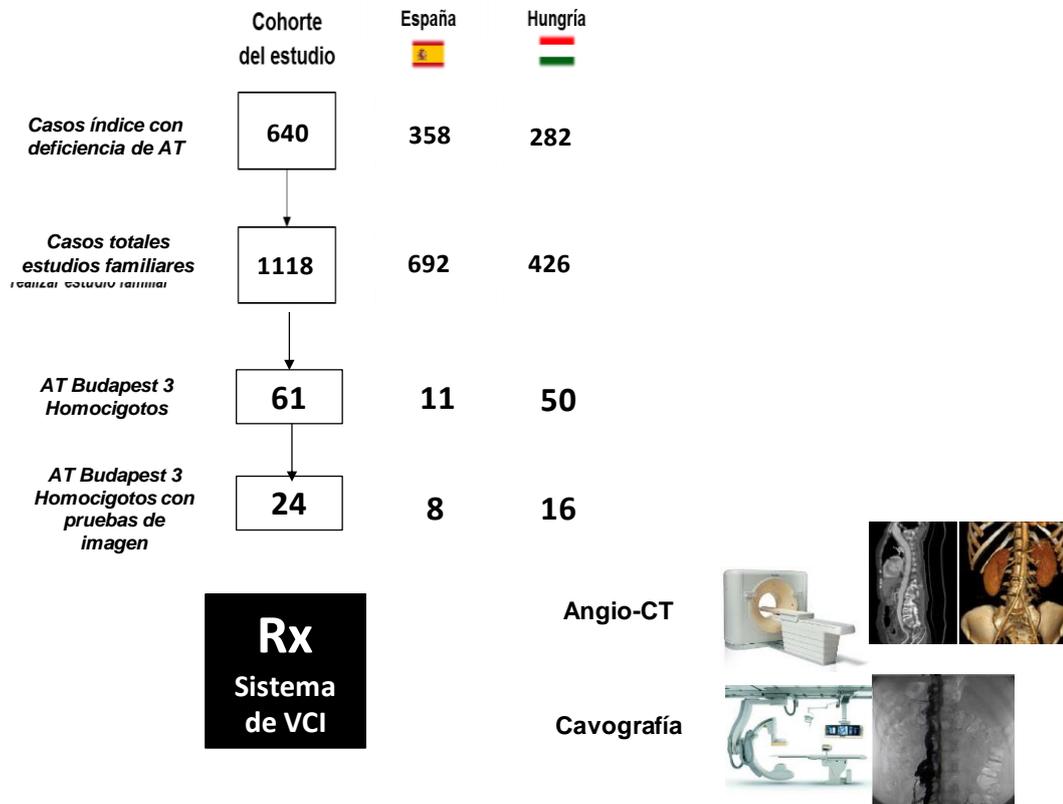
**Trombofilia grave
Deficiencia de AT
homocigota Budapest 3**

*Bass JE et al. RadioGraphics 2000
d'Archangeau O. Belge Radiol.1990*

Para responder a esta pregunta, podríamos ir a modelos, y esperar a tener suerte que el modelo murino, o de pez, fuera igual al humano. Pero nosotros fuimos a la realidad, a la cohorte más grande a nivel mundial de deficiencias de antitrombina, formada por 1118 pacientes de dos países, España y Hungría, para poder seleccionar 61 casos homocigotos para la variante Budapest 3 a los que plantear el estudio: realizar un análisis de imagen,

mayoritariamente por escáner a fin de poder evaluar, en los 24 casos que participaron, si existía alguna relación entre esta trombofilia, posiblemente la mas grave que sea viable, y la que se ha considerado una malformación congénita, la agenesia de vena cava.

Agenesia de vena cava en pacientes Budapest 3 homocigotos



Sorprendentemente, 16 de los 24 casos analizados, presentaban agenesia de la vena cava inferior

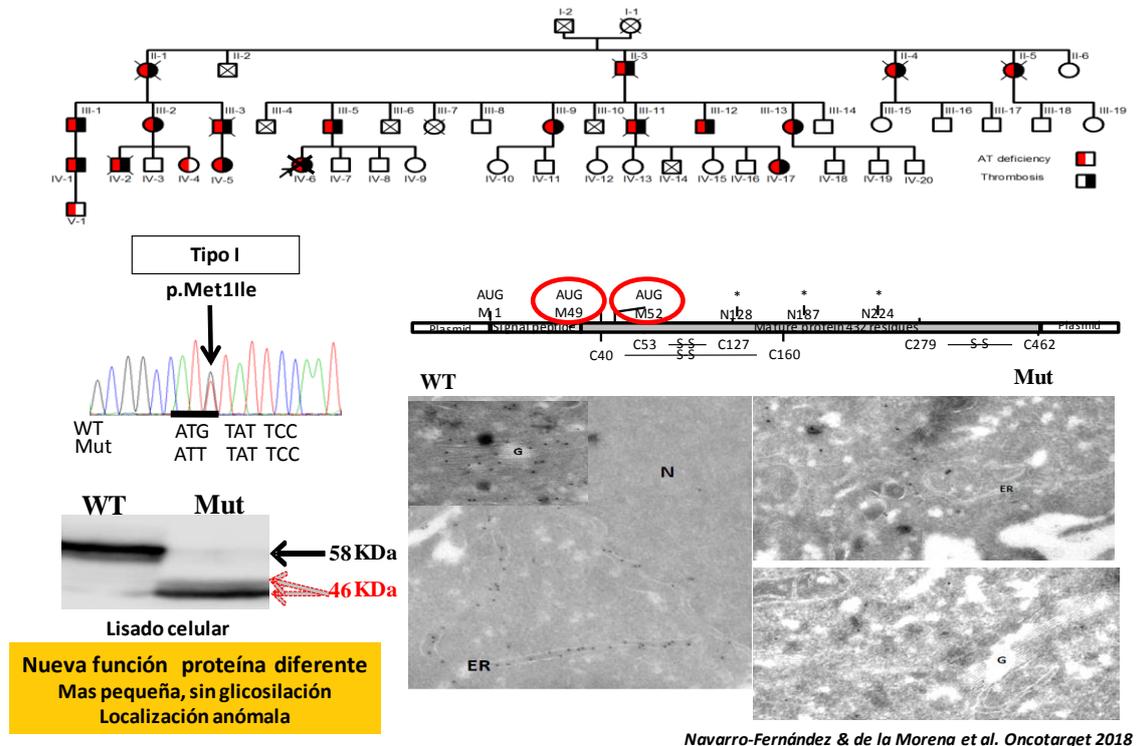
En 4 de ellos además existían otras anomalías como agenesia renal o hipoplasia de la iliaca.

Y en un caso adicional descubrimos una agenesia de la iliaca izquierda.

En todos los casos con malformaciones vasculares se objetivó circulación colateral compensatoria con engrosamiento de los azigos-hemiázigos menos el caso con agenesia de iliaca que presentaba una vena cava doble.

En resumen, casi el 71% de los casos con deficiencia de antitrombina homocigotos para la variante Budapest 3 presentaban agenesia del sistema de la vena cava, una incidencia mas de 1000 veces superior a la descrita en la población general y que sustenta una asociación entre esta trombofilia tan grave y esta malformación vascular, apoyando la hipótesis que se origina como consecuencia de un evento trombótico intrauterino o perinatal, lo que no solo revoluciona la etiopatogenia de esta enfermedad, sino que, cuando se valide, tendrá implicaciones relevantes en el manejo de los pacientes con agenesia de cava, precisamente

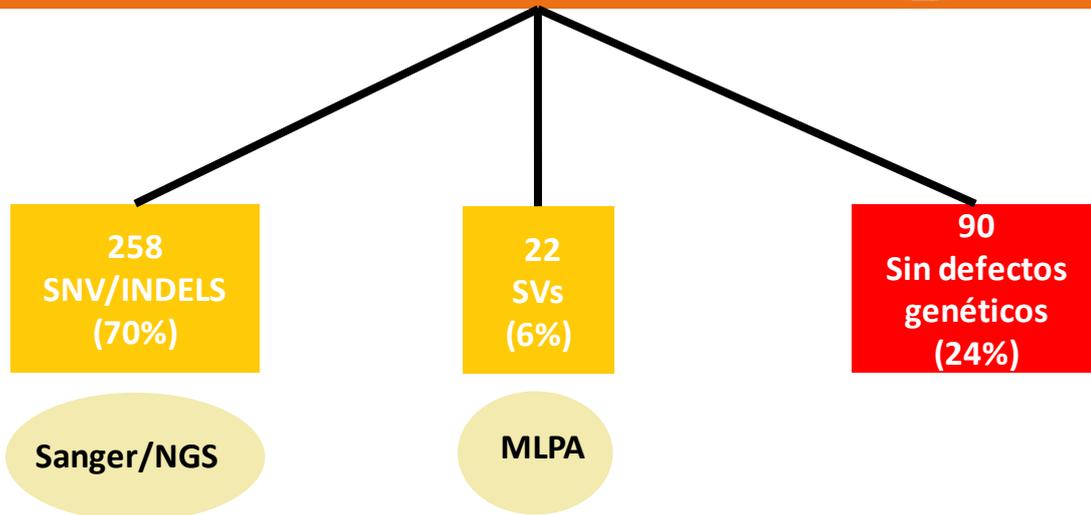
porque alcanza una localización que no es normal y donde va a ejercer nuevas funciones, como hemos comprobado mediante un array de expresión. Por tanto, esta mutación, además de la pérdida de función confiere una ganancia de función que explica la gravedad clínica de los portadores.



Finalmente, la mirada a la naturaleza obliga a afrontar los retos. De nuestra cohorte de 370 pacientes no relacionados con deficiencia de antitrombina, tras realizar los estudios moleculares pertinentes en el gen codificante, identificamos alteraciones moleculares que explican la deficiencia en la mayoría de los casos, el 76%. Pero en el 24% de los casos no identificábamos ningún defecto en SERPINC1. Estos fueron los casos que inmediatamente llamaron nuestra atención y a los que hemos dedicado mayor esfuerzo, porque esperábamos encontrar nuevos mecanismos implicados en este desorden.

Afrontar los retos

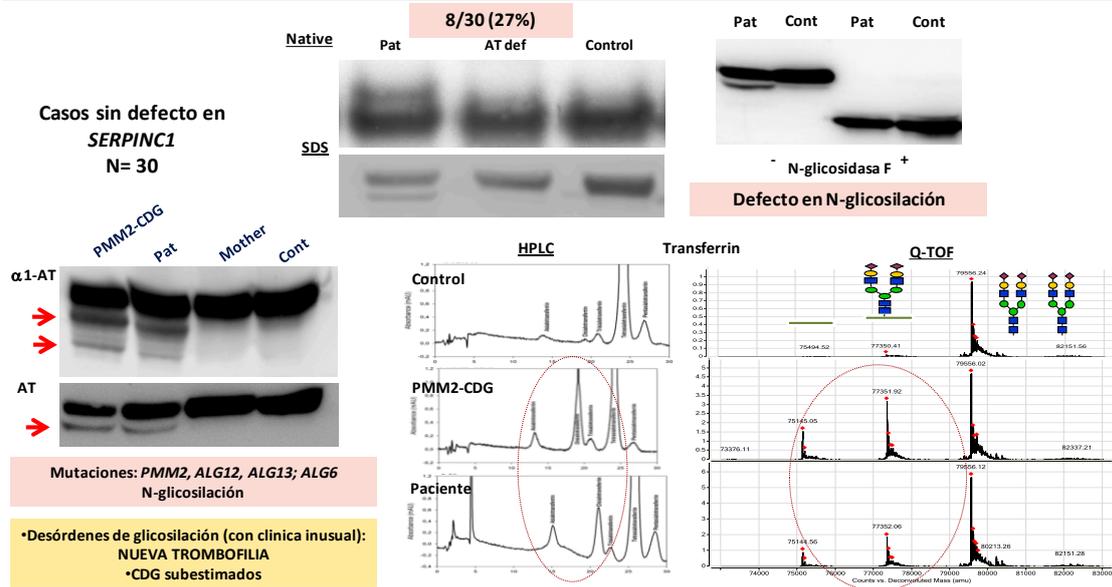
370 pacientes no relacionados
Con deficiencia de antitrombina



Y el primer logro lo conseguimos estudiando la proteína plasmática de estos casos. La Dra de la Morena-Barrio, se dio cuenta que un porcentaje importante de estos casos, el 27%, presentaba una antitrombina aberrante en plasma. ¿Cómo explicar una forma aberrante si no existen alteraciones en el gen codificante? La respuesta de Maria Eugenia fue acertada: debe ser causada por un defecto en una modificación post-traducciona. Y como la antitrombina solo presenta glicosilación, Maria Eugenia comprobó su hipótesis, tratando el plasma de estos pacientes con N-glicosidasa F que elimina todos los glicanos. Como pueden ver, este experimento demostró que estos pacientes tenían un desorden de glicosilación. No pensábamos que este desorden fuera específico de una sola proteína y efectivamente, analizando otras proteínas como la antitripsina, confirmamos que existía un desorden de glicosilación global. Nuestra cabeza fue inmediatamente a los libros clásicos buscando qué desorden provoca una hipoglicosilación como esta, y encontramos un desorden extraordinariamente raro y heterogéneo molecularmente que se engloba en los llamados trastornos congénitos de glicosilación o CDG. Los CDGs se diagnostican habitualmente en niños con graves manifestaciones clínicas multiorgánicas que incluyen el retraso psicomotor. Por tanto, comparamos el perfil de hipoglicosilación de nuestros pacientes con el de pacientes CDG. Y resultado fue rotundo. Nuestros pacientes tenían el mismo patrón. Nos sudaron las manos porque nuestros pacientes no eran niños, no tenían retraso psicomotor y la trombosis era su principal manifestación clínica. Teníamos que estar absolutamente seguros. Por ello, recurrimos al *gold* estándar del diagnóstico de CDG, el análisis de las glicofomas de transferrina, y lo hicimos por dos métodos diferentes HPLC y Q-TOF. ¡Los resultados confirmaron que nuestros pacientes eran CDGs! Presentaban aumentos patológicos de asialo y disialo transferrina. La prueba final de que habíamos descubierto nuevos CDGs fue la identificación en nuestros pacientes de alteraciones moleculares en los genes implicados en CDGs, implicados en la ruta de N-glicosilación. Por tanto, nuestro estudio no solo identificó que los desórdenes de glicosilación (con una clínica inusual) constituyen una nueva trombofilia,

sino que es una evidencia rotunda de que los trastornos de glicosilación están subestimados y se abren más allá del campo de la pediatría.

Desórdenes de glicosilación: nuevo mecanismo implicado en deficiencia de antitrombina



Y el mejor modelo es el caso ALG12-CDG identificado con esta aproximación. Hasta la fecha solo había 10 casos ALG12-CDG descritos en el mundo. Todos con retraso psicomotor, dimorfismo facial, defectos de coagulación (incluida la deficiencia de antitrombina) y con otras manifestaciones clínicas ya más heterogéneas como cardiopatías o defectos esqueléticos. Pues el caso identificado en nuestra cohorte era efectivamente un modelo en todo su sentido. Les presento a nuestra modelo, una joven que terminó sus estudios en la Universidad de Murcia y ahora es profesora, que baila casi como una profesional, pero que también ha tenido, además de la deficiencia de antitrombina, graves manifestaciones clínicas que requirieron de intervención, una cardiopatía congénita y una escoliosis grave, pero que ninguno de los especialistas que la trataron asociaron con una base molecular común, su desorden de glicosilación.

ALG12-CDG

- 10 casos en todo el mundo, todos con retraso psicomotor
- Dimorfismo facial
- Defectos de coagulación
- Otros signos (no en todos): cardiopatías, defectos óseos....)

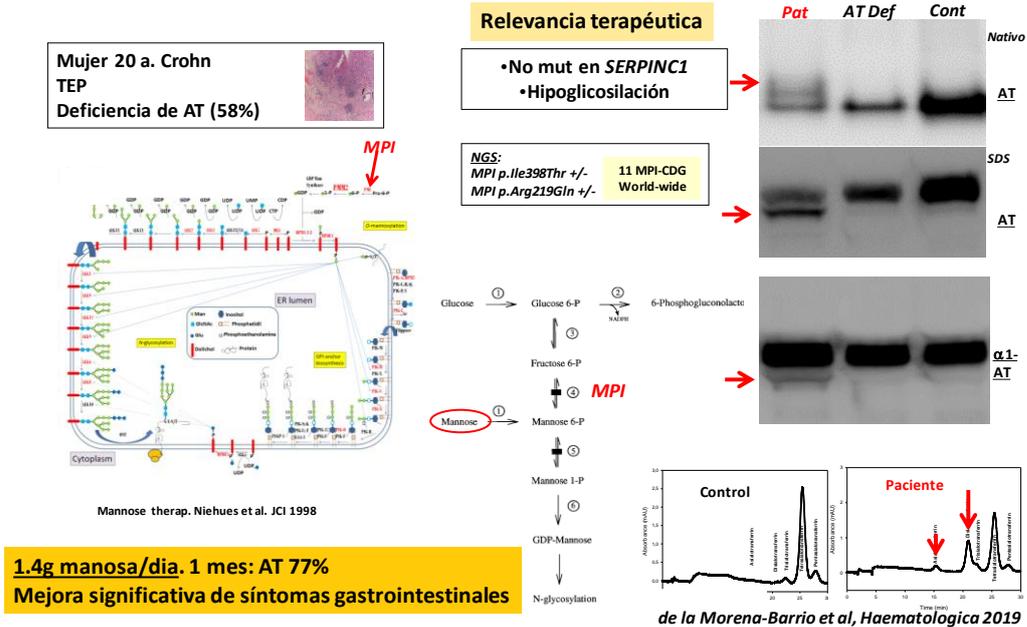
El caso ALG12-CDG en nuestro estudio: un nuevo modelo para CDG



de la Morena-Barrio et al.
Mol Genet Genomic Med.
2020;8:e1304

Y este campo también nos ha dado grandes satisfacciones por sus implicaciones terapéuticas. Fue de nuevo un caso, de una mujer diagnosticada de Crohn con graves problemas gastrointestinales que el tratamiento con biológicos no solo no mejoró, sino que contribuyó a un tromboembolismo pulmonar. La paciente presentaba una la deficiencia de antitrombina, causada por hipoglicosilación. En este caso debida a una heterocigosis compuesta en el gen MPI. Este es uno de los primeros genes implicados en la ruta de formación del precursor del glicano y que tiene una particularidad importante: es de los pocos CDGs tratables, ya que la suplementación oral con manosa compensa el problema genético como se ha comprobado en casos anteriores. Nos costó convencer al medico responsable, pero finalmente la paciente fue tratada con manosa oral. Una cucharada de este azúcar no solo permitió restablecer los niveles normales de antitrombina, sino que provocó una mejora muy significativa de los síntomas gastrointestinales que sin duda eran causados por la malabsorción inducida por el trastorno de glicosilación.

Desórdenes de glicosilación: un nuevo mecanismo implicado en deficiencia de AT



Finalmente, en estos retos como conocer el mecanismo de los casos que todavía no tienen explicación, el apoyo, que no la pleitesía, de la nueva tecnología es altamente recomendable. Nos quedan todavía un 19% de casos sin base molecular conocida. Quizás porque los métodos de estudio que hemos empleado no sean suficientemente buenos, sensibles, o tengan limitaciones. Recientemente se ha desarrollado un nuevo sistema de secuenciación masiva de tercera generación basado en secuencias muy largas (de hasta 2.5 Mb) sin manipulación del ADN. Belén de la Morena-Barrio se fue a Cambridge a formarse en esta nueva metodología, la implantó en nuestro servicio con excelentes resultados que no puedo detallar pero que le han permitido defender hace dos semanas una tesis doctoral internacional brillante.

Para nuestro reto particular, Belén analizó con esta tecnología 11 casos con deficiencia de antitrombina en los que los métodos, puedo ya decir clásicos de análisis molecular, la secuenciación Sanger de los 7 exones y regiones flanqueantes, la secuenciación completa del gen por NGS, el MLPA y el array de CGH no identificó ningún defecto. Tampoco estos 11 casos tenían trastornos de glicosilación. Pues bien, en dos de estos pacientes, Belén encontró con este método la inserción de lo que después, mediante ensamblaje *de novo* y verificación por PCR, confirmó se trataba de un nuevo retrotransposón de 2.4 Kb insertado en el intrón 6 de *SERPINC1*. Con este hallazgo se identifica un nuevo mecanismo causante de la deficiencia de antitrombina no detectado con métodos moleculares clásicos y se aumenta el catálogo de desórdenes causados por la inserción de estos elementos móviles tan frecuentes en el genoma y tan esquivos, que posiblemente tengan gran peso en muchas enfermedades somáticas y germinales.

Identificación de un nuevo mecanismo causante de deficiencia de antitrombina: inserción de retrotransposones

11 casos con def de AT sin base molecular tras:

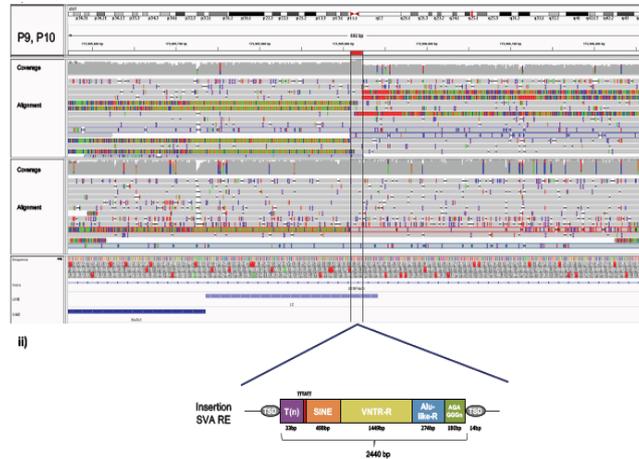
- Secuenciación 7 exones y regiones flanqueantes
- Secuenciación gen completo por NGS
- MLPA
- CGHa

•No CDG



2 pacientes

Inserción 2,440bp Intrón 6
Nuevo retrotransposon



En conclusión, quiero remarcar que el estudio de elementos claves de diferentes sistemas siempre es importante y apasionante. Que los pacientes son una excelente fuente de información y que siempre son reales. Nuestro espíritu investigador nos debe llevar mas allá de lo obvio y saber ver indicios. Que siempre hay que tener en cuenta la diversidad clínica, y que nos tenemos que enfrentar a los retos con originalidad y aprovechando los avances tecnológicos

Siguiendo estas pautas, para un desorden viejo y raro como es la deficiencia de antitrombina, hemos sido capaces de constatar la limitación de métodos diagnósticos, identificar nuevos defectos moleculares, descubrir nuevos mecanismos, e implicar a este desorden en otras patologías. Por tanto, todavía le queda una larga vida a la antitrombina.

Y todo ello ha sido posible gracias a mucha gente. Especialmente nuestro grupo, formado por las hermanas de la Morena-Barrio, sin duda algo genético tiene que haber en esta familia que despierta la imaginación, la inteligencia y buen hacer; A Carlos Bravo, Rosa Cifuentes, a dos técnicos de laboratorio, figuras indispensables en investigación e injustamente tratadas, José Padilla, y especialmente Toñi Miñano que ha estado implicada en todos los proyectos que les he comentado y que es clave en nuestro grupo. Y por supuesto a todo nuestro grupo de Hematología y Oncología Clínica. Además, estos trabajos no se habrían realizado sin la colaboración de muchos hematólogos de media España y parte de Europa que han aportado pacientes e ideas, y sin el apoyo institucional que los financia: la fundación Séneca, el ISCIII, el IMIB y la Sociedad Española de Hemostasia y Trombosis. Y por supuesto todo ha sido posible gracias a la generosidad de los que me han dado tiempo y apoyo, desde que eran pequeños y han ido creciendo, oyendo hablar de antitrombina en las cenas o desayunos y en algún que otro cuento que me inventaba para hacerles dormir.