

Diagnóstico genético de la Eritrocitosis Congénita, mas allá de la PV

Adoración Blanco Álvarez
23 de noviembre de 2017

Definición de Eritrocitosis

La ERITROCITOSIS ABSOLUTA se define como el incremento de la masa eritrocitaria reflejada por el incremento de la hemoglobina y el hematocrito por encima de los valores de normalidad, ajustado a la edad, sexo y raza.

OMS 2008:

Hb > 18,5 g/dL en el hombre

Hb > 16,5 g/dL en la mujer

Hb > 17 g/dL en hombre y > 15 g/dL en mujer **SI** se asocia a un incremento de 2 g/mL del basal individual.

OMS 2016:

Hb > 16,5 g/dL en el hombre

Hb > 16,0 g/dL en la mujer

O

Hematocrito 49% en el hombre

Hematocrito 48% en la mujer

Clasificación de la Eritrocitosis

Eritrocitosis primaria

- Causada por defectos en los progenitores hematopoyéticos. Asociada a valores **bajos de eritropoyetina sérica**.

Eritrocitosis secundaria

- Causada por factores externos a la médula ósea que estimulan la eritropoyesis. Asociada a niveles **normales o elevados de eritropoyetina sérica**.

Clasificación de la Eritrocitosis

- Causada por mutaciones somáticas o secundaria a diferentes patologías o situaciones fisiológicas

Eritrocitosis
adquirida



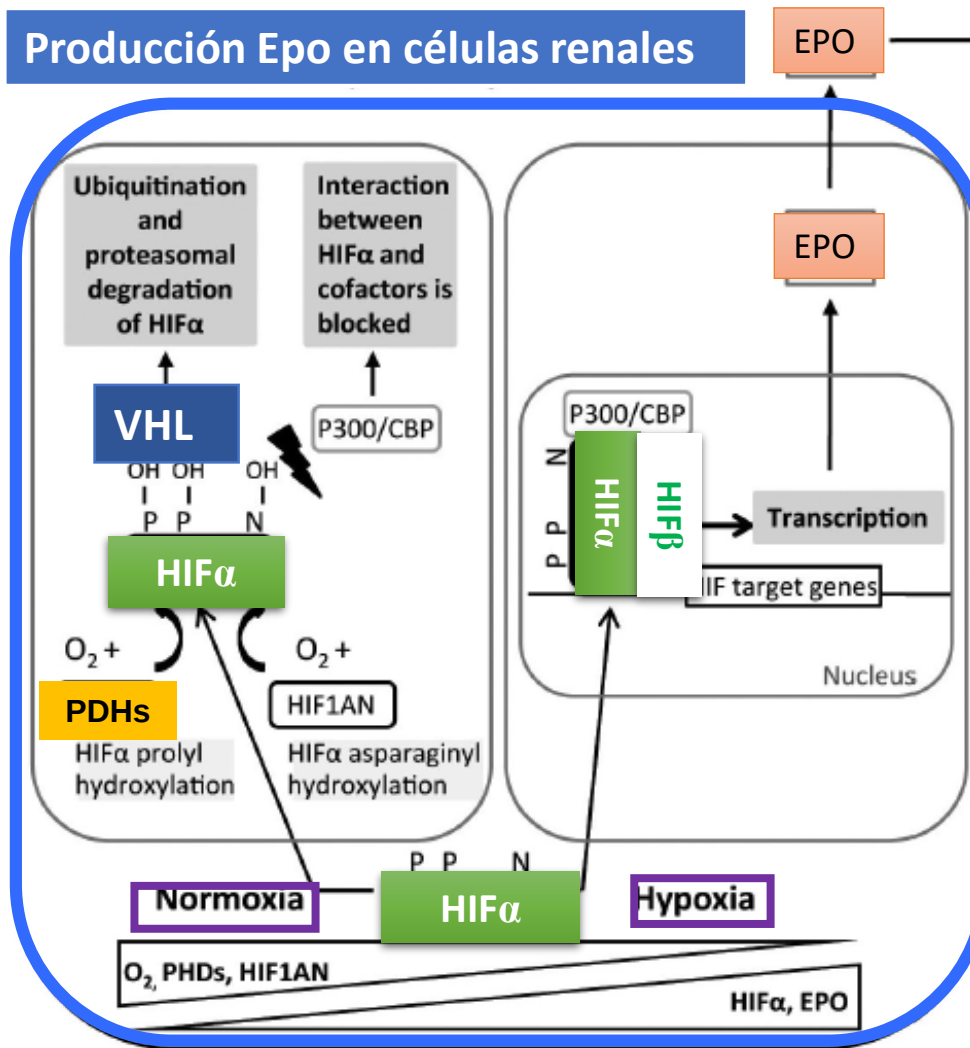
- Causada por mutaciones en línea germinal que afectan a la vía de Epo o la vía reguladora de la hipoxia

Eritrocitosis
congénita

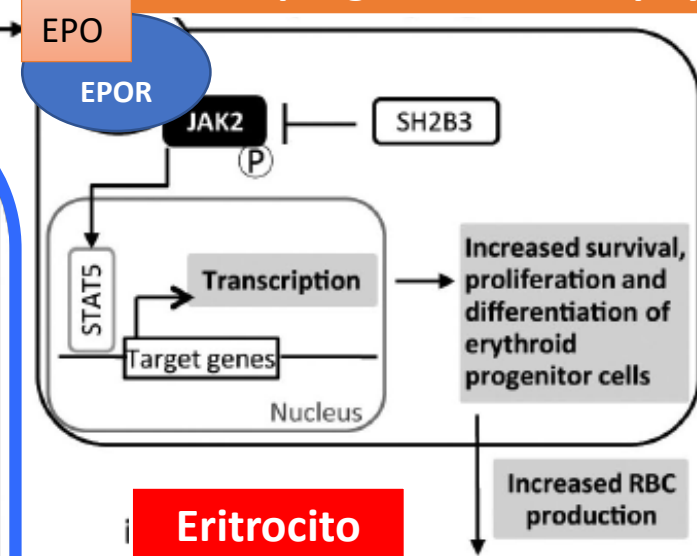


Patogénesis de la Eritrocitosis

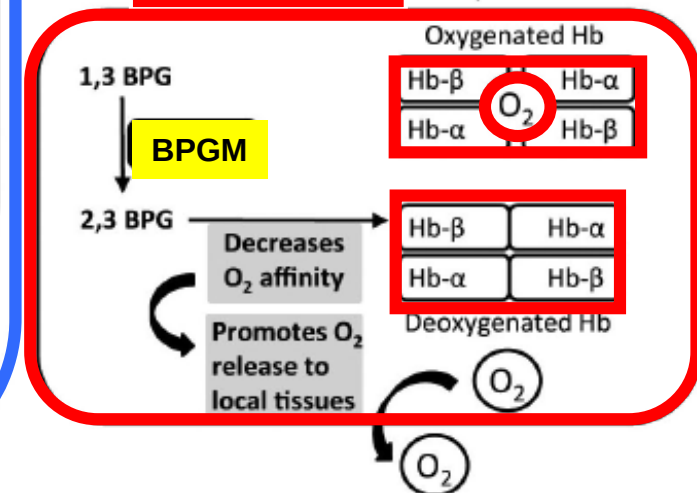
Producción Epo en células renales



Célula progenitora eritropoyética

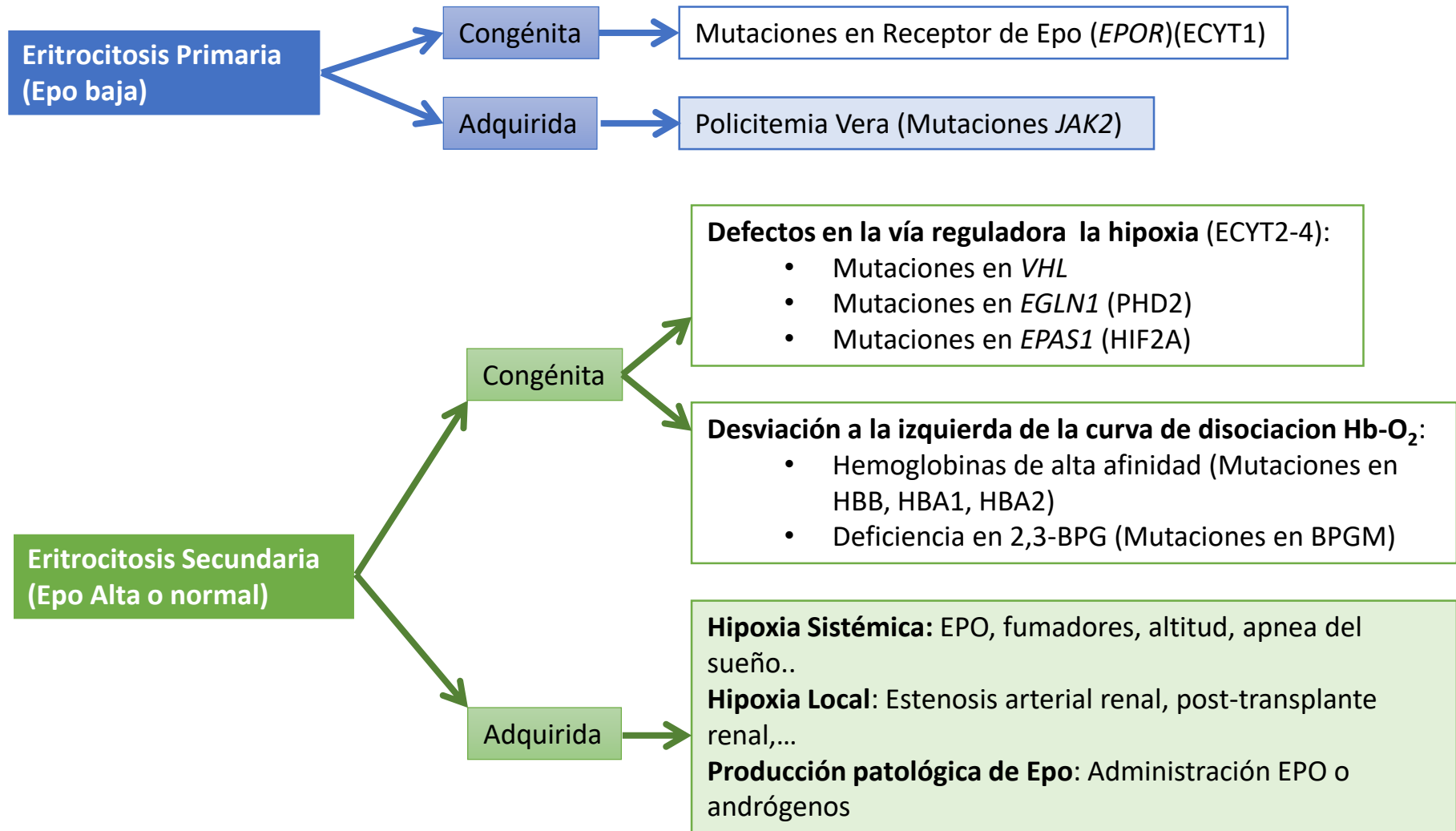


Eritrocito



Bento et al. HUMAN MUTATION 2013

Clasificación de la Eritrocitosis



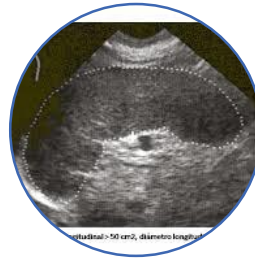


Diagnóstico diferencial Eritrocitosis

Varón de 25 años con poliglobulia mantenida, Hb 19 g/dl y HTC 56 %



Eritrocitosis
absoluta



Poliglobulia
aislada, sin
esplenomegalia



Causas
secundarias
(pulmonares,
renales o
cardiacas)



Diagnóstico Policitemia Vera

OMS 2016

Table 4. WHO criteria for PV

WHO PV criteria

Major criteria

1. Hemoglobin >16.5 g/dL in men

Hemoglobin >16.0 g/dL in women

or,

Hematocrit >49% in men

Hematocrit >48% in women

or,

increased red cell mass (RCM)*

2. BM biopsy showing hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis) including prominent erythroid, granulocytic, and megakaryocytic proliferation with pleomorphic, mature megakaryocytes (differences in size)

3. Presence of *JAK2V617F* or *JAK2* exon 12 mutation

Minor criterion

Subnormal serum erythropoietin level

Diagnosis of PV requires meeting either all 3 major criteria, or the first 2 major criteria and the minor criterion†

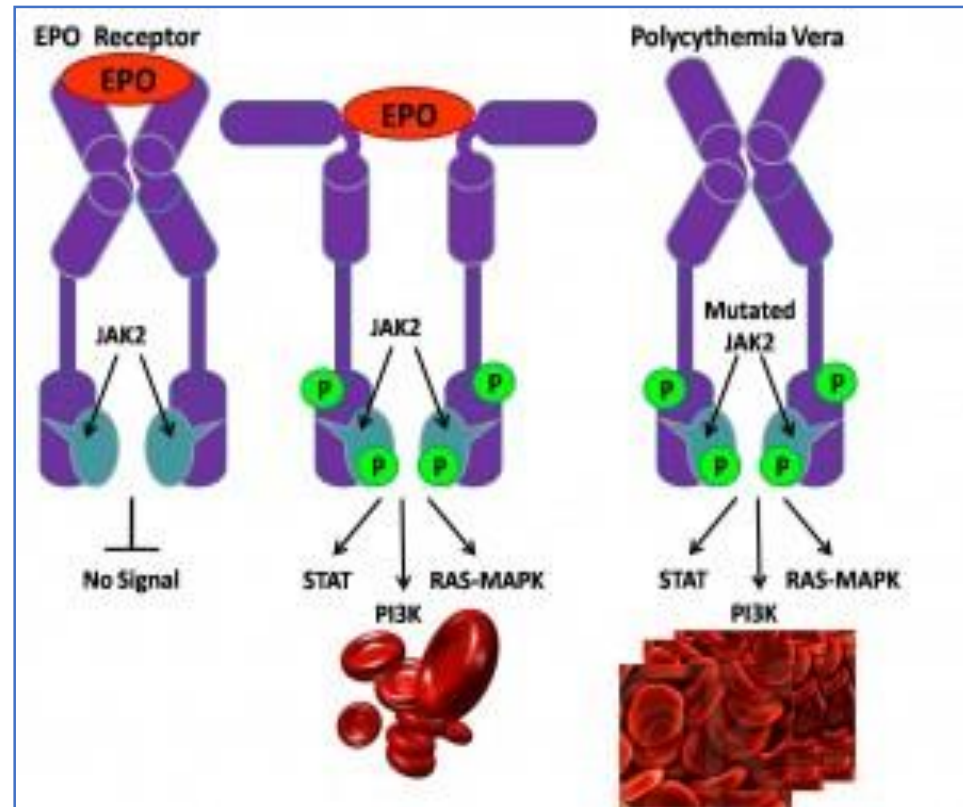
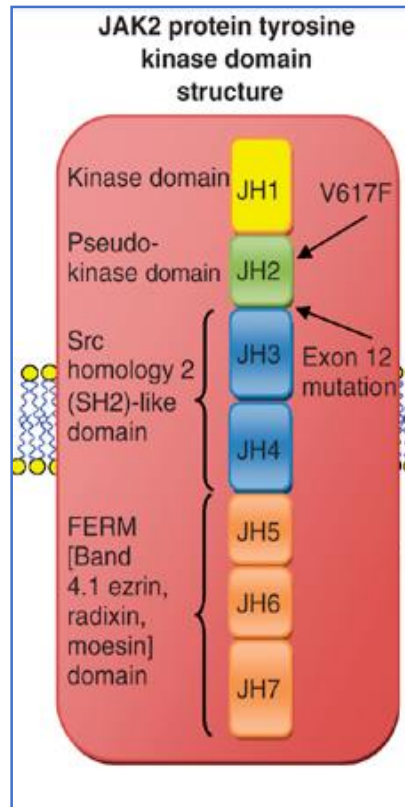
*More than 25% above mean normal predicted value.

†Criterion number 2 (BM biopsy) may not be required in cases with sustained absolute erythrocytosis: hemoglobin levels >18.5 g/dL in men (hematocrit, 55.5%) or >16.5 g/dL in women (hematocrit, 49.5%) if major criterion 3 and the minor criterion are present. However, initial myelofibrosis (present in up to 20% of patients) can only be detected by performing a BM biopsy; this finding may predict a more rapid progression to overt myelofibrosis (post-PV MF).



Diagnóstico Policitemia Vera

GEN *JAK2*





Diagnóstico diferencial Eritrocitosis

- Eritrocitosis absoluta
- Contaje de leucocitos y plaquetas normales, sin eplenomegalia
- Exclusión de causas secundarias adquiridas (cardiacas, pulmonares o renales)
- Exclusión de mutaciones en *JAK2* V617F



Niveles de eritropoyetina sérica

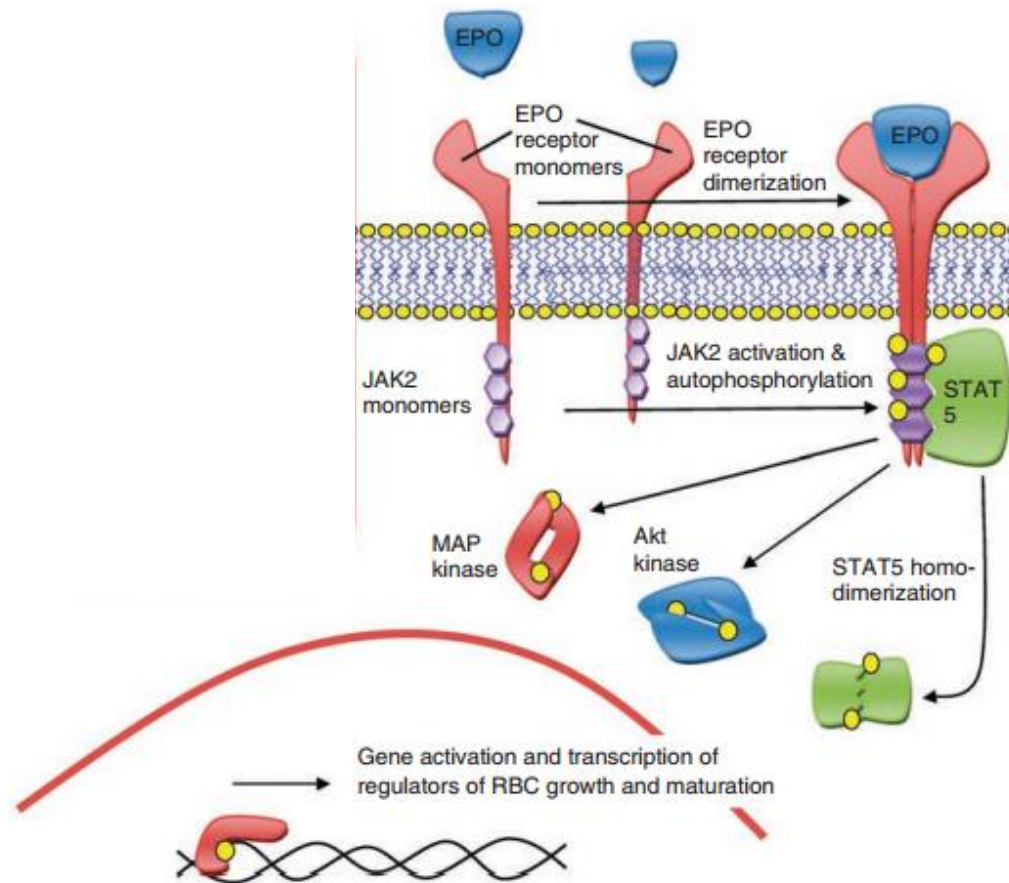
EPO BAJA



Secuenciación *JAK2* (Exón 12)

Secuenciación *EPOR* (Exón 8)

Señalización inducida por EPO



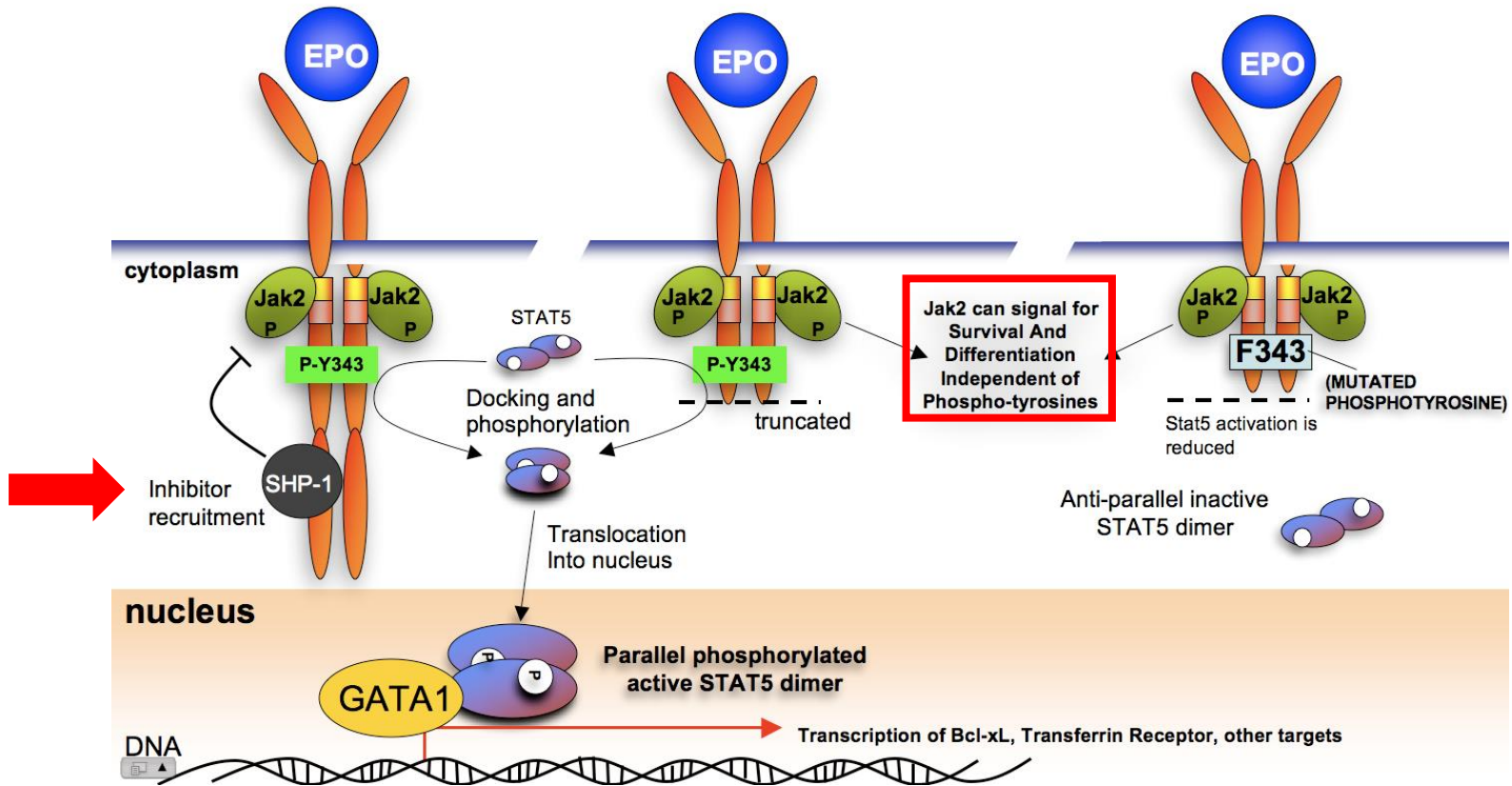
Señalización inducida por EPO

Truncated Epo Receptors

Progenitores eritroides maduros
EpoR Wild-type

Progenitores eritroides inmaduros
EpoR-H

EpoR-HM



Eritrocitosis Congénita tipo 1 (*EPOR*)

- ▶ EC tipo 1 presenta **herencia autosómica dominante**, con prevalencia y penetrancia desconocida
- ▶ Diagnóstico se basa en: poliglobulia aislada, P50 normal, **EPO sérica baja o normal**, y historia familiar.
- ▶ Se han descrito **casos esporádicos sin historia familiar** y con presencia de variantes patogénicas en heterocigosis en *EPOR*

24 mutaciones de tipo **indel** todas localizadas en el **exón 8** (2017)
4 variantes missense de significado incierto



Diagnóstico diferencial Eritrocitosis

- Eritrocitosis absoluta
- Contaje de leucocitos y plaquetas normales, sin eplenomegalia
- Exclusión de causas secundarias adquiridas (cardíacas, pulmonares o renales)
- Exclusión de mutaciones en *JAK2 V617F*



Niveles de eritropoyetina sérica

EPO 9,9 mUI/mL

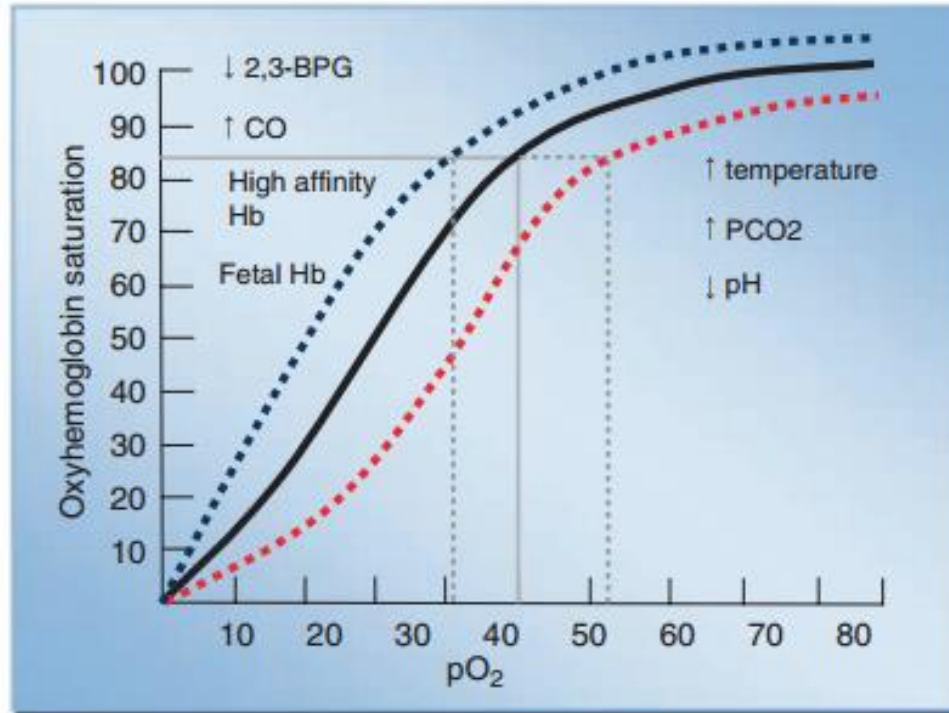
EPO ALTA o Normal



Determinación de P50

Definición de P50

Afinidad Hb O₂ ↑
P50 ↓



Afinidad Hb O₂ ↓
P50 ↑



Diagnóstico diferencial Eritrocitosis

- Eritrocitosis absoluta
- Contaje de leucocitos y plaquetas normales, sin eplenomegalia
- Exclusión de causas secundarias adquiridas (cardiacas, pulmonares o renales)
- Exclusión de mutaciones en *JAK2* V617F



EPO NORMAL O ALTA

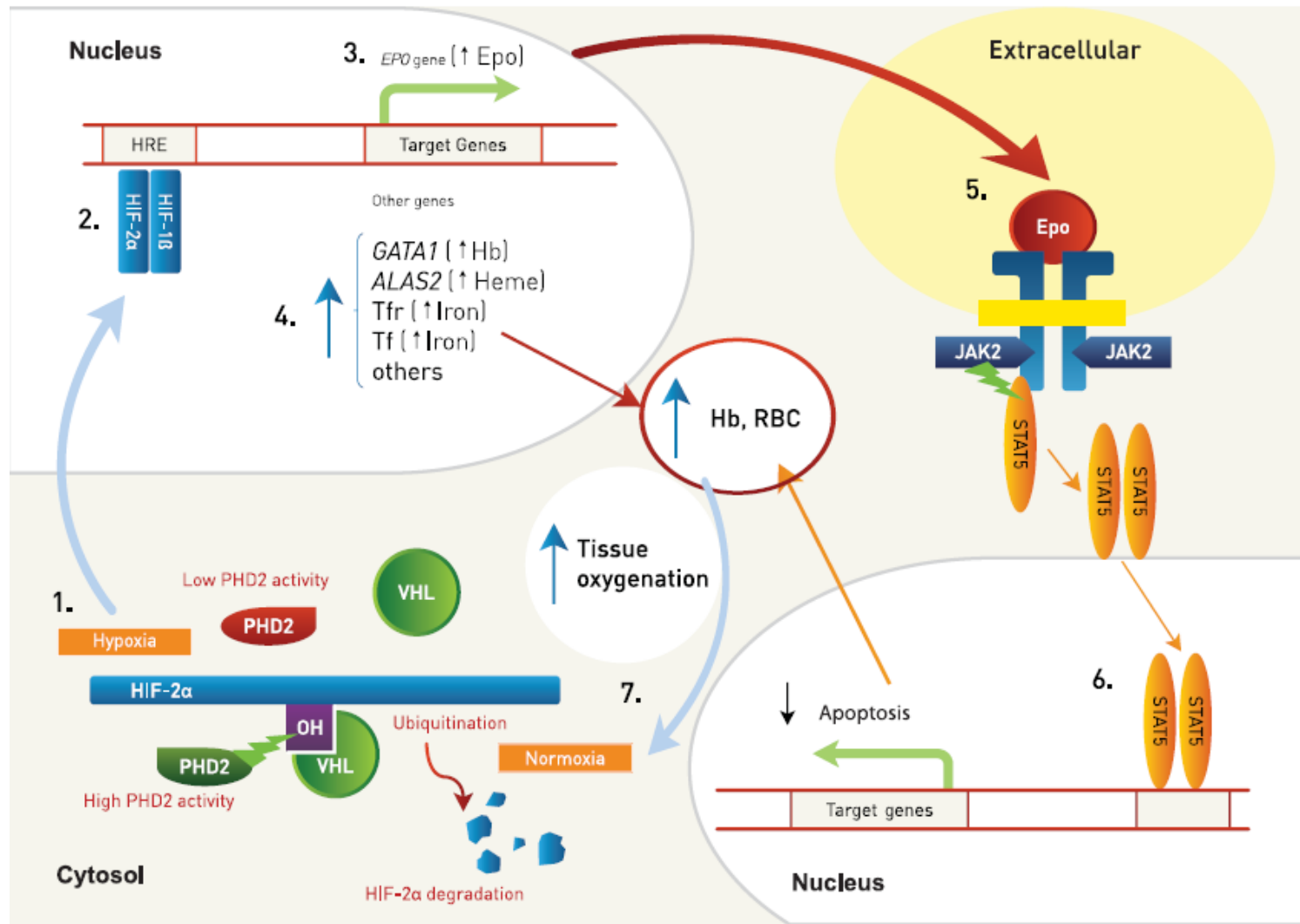
P50 NORMAL O NO VALORADA



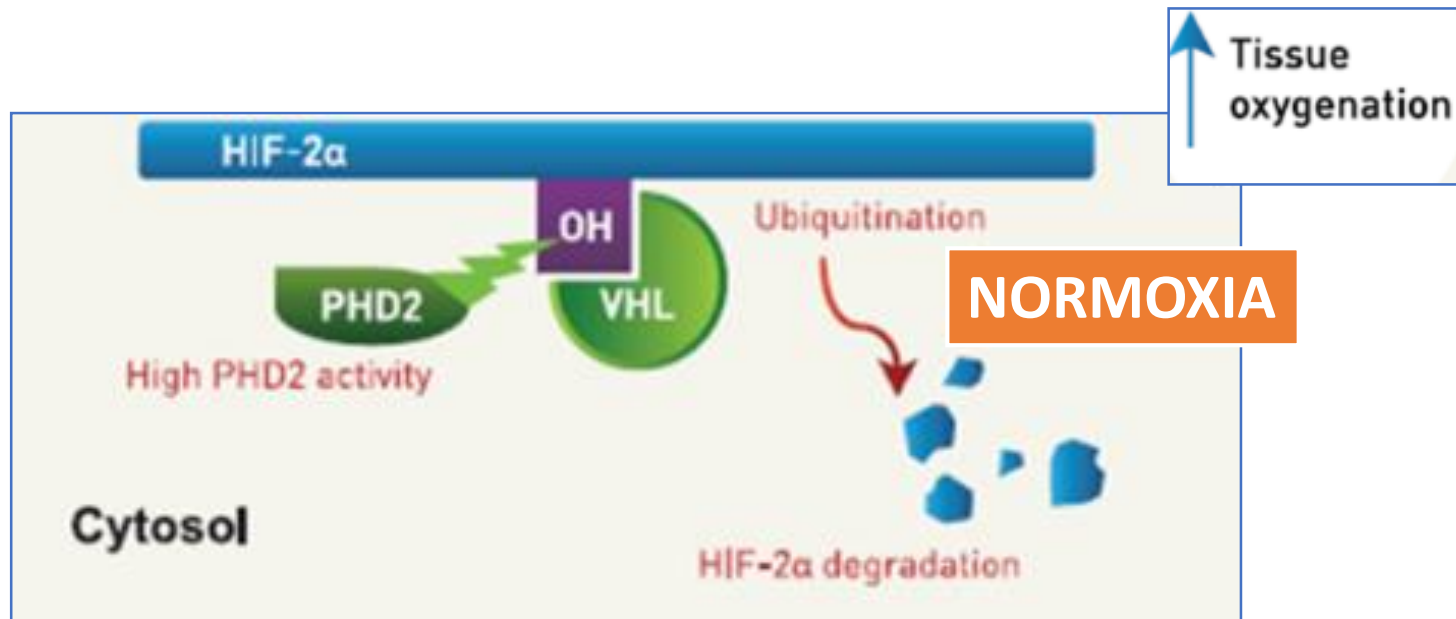
Secuenciación *VHL*
Secuenciación *EGLN1*
Secuenciación *EPAS1* (exón 12)

**VÍA REGULADORA
DE LA HIPOXIA**

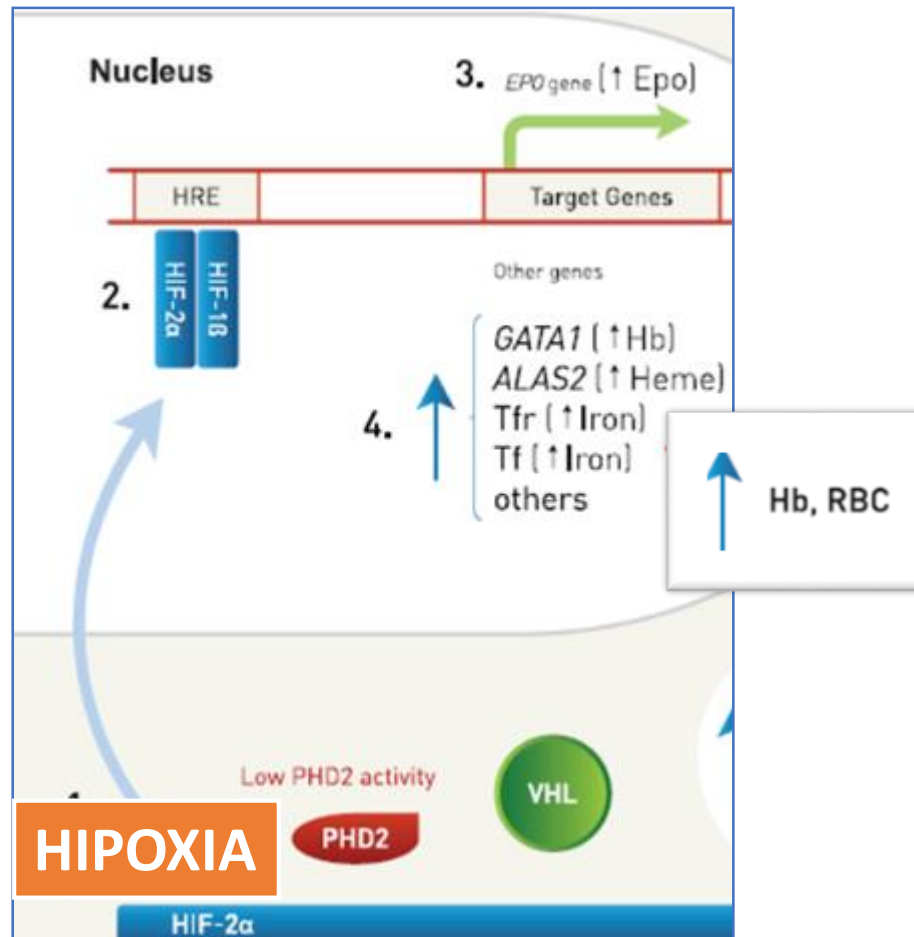
Vía de respuesta a la Hipoxia



Vía reguladora de la Hipoxia



Vía reguladora de la Hipoxia



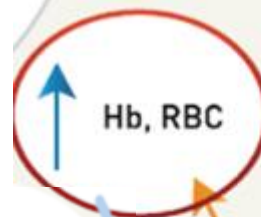
Nucleus

3. *EPO* gene (↑ *Epo*)



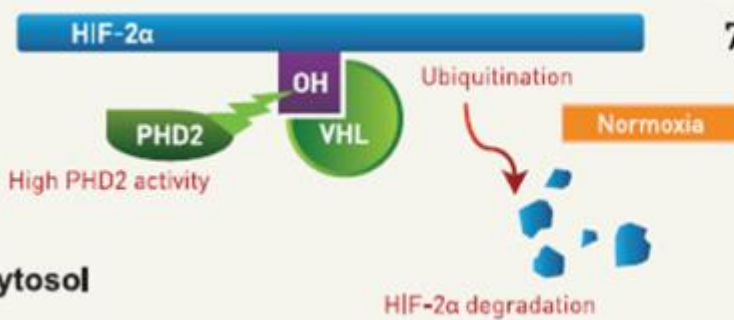
Extracellular

5.



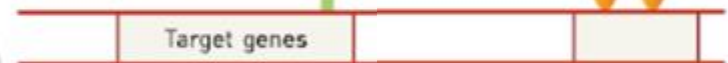
↑ Tissue oxygenation

7.



Cytosol

Nucleus



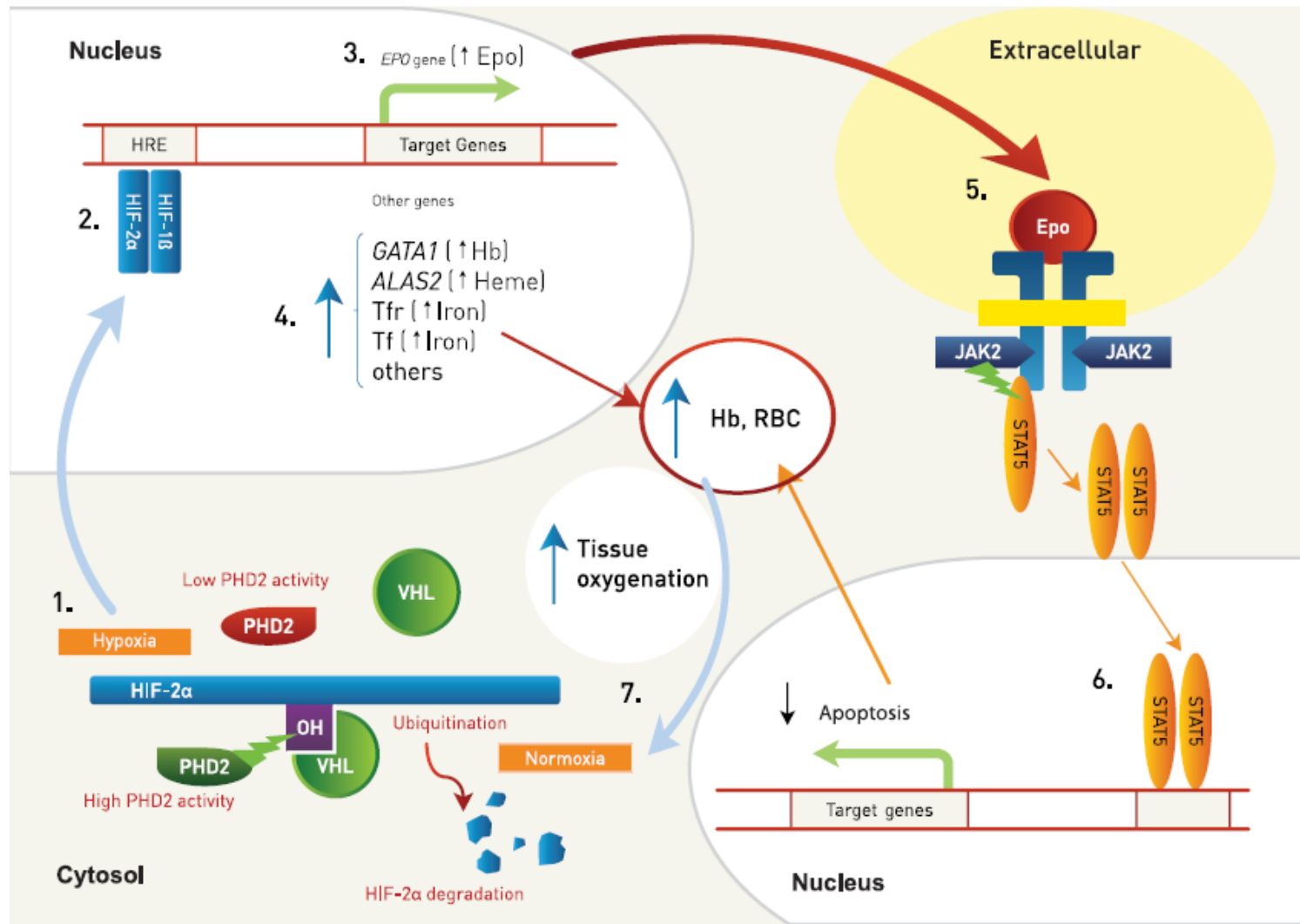
6.

↓ Apoptosis

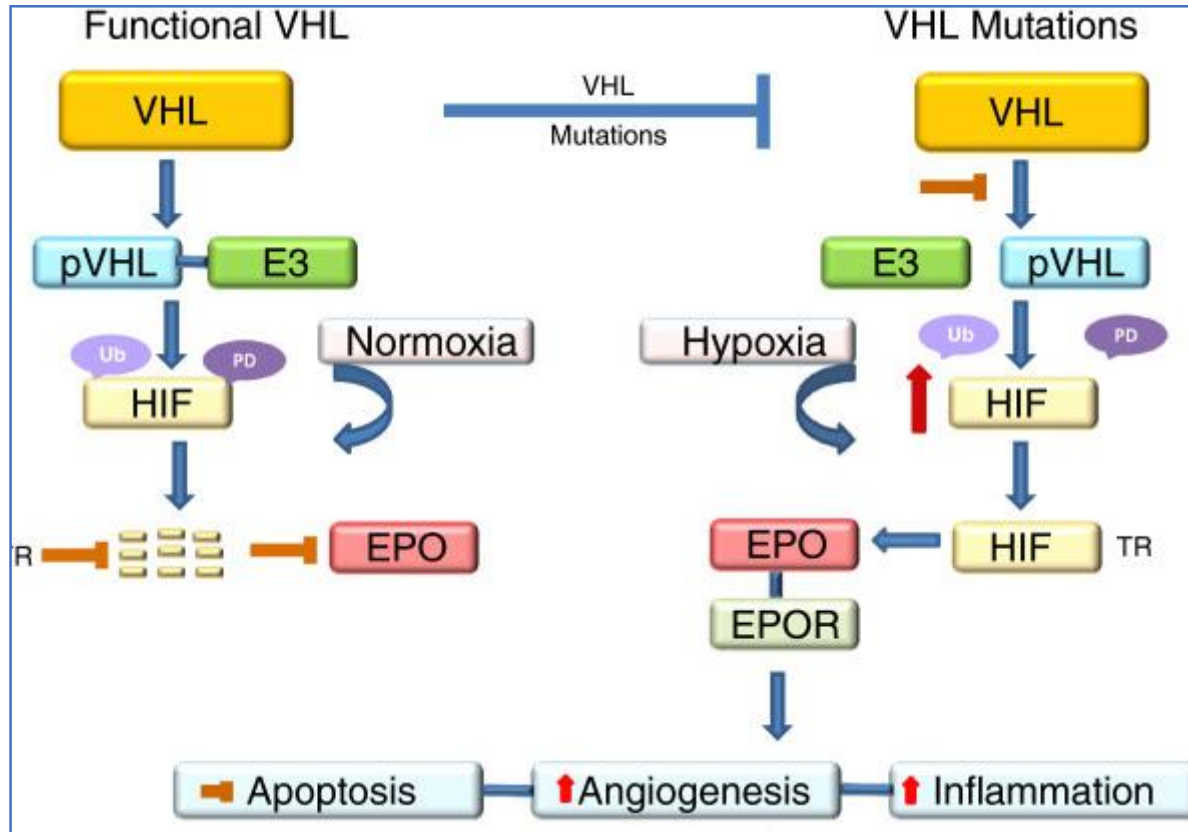
STATs

STATs

Vía reguladora de la Hipoxia



Vía de von Hippel-Lindau (VHL)



Gen *VHL*

* 608537

VHL GENE; VHL

HGNC Approved Gene Symbol: *VHL*

Cytogenetic location: *3p25.3* Genomic coordinates (GRCh38): *3:10,141,634-10,153,669* (from NCBI)

Gene-Phenotype Relationships

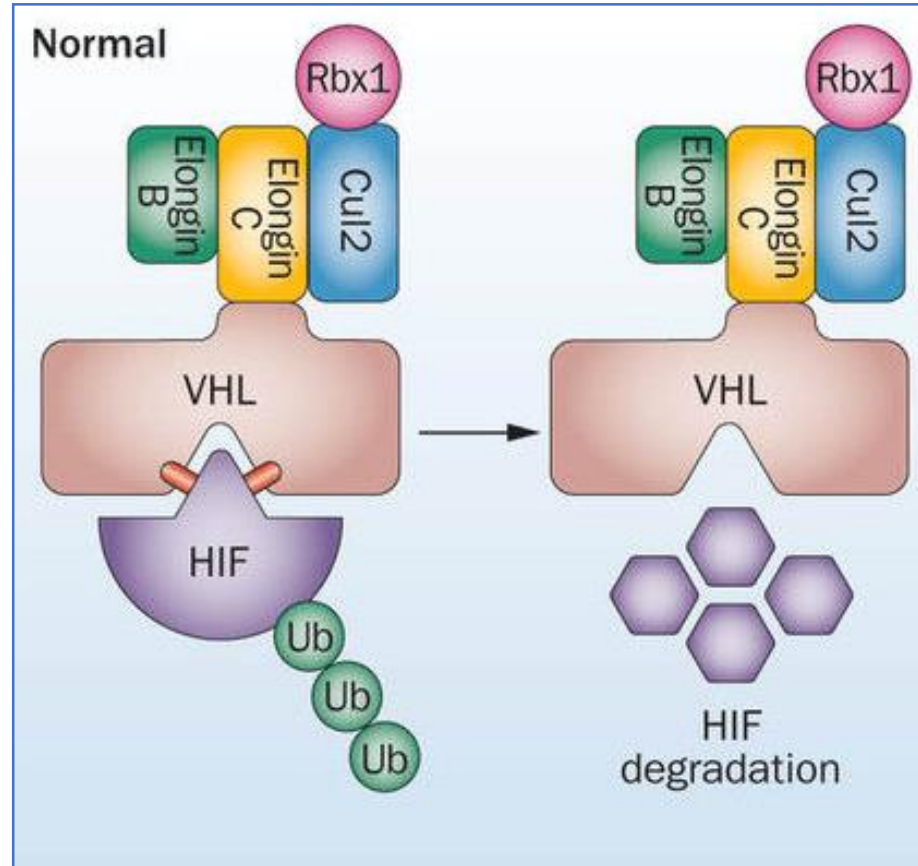
Location	Phenotype	Phenotype MIM number	Inheritance	Phenotype mapping key
<i>3p25.3</i>	Erythrocytosis, familial, 2	<i>263400</i>	AR	3
	Hemangioblastoma, cerebellar, somatic			3
	Pheochromocytoma	<i>171300</i>	AD	3
	Renal cell carcinoma, somatic	<i>144700</i>		3
	von Hippel-Lindau syndrome	<i>193300</i>	AD	3

Eritrocitosis Congénita tipo 2 (*VHL*)

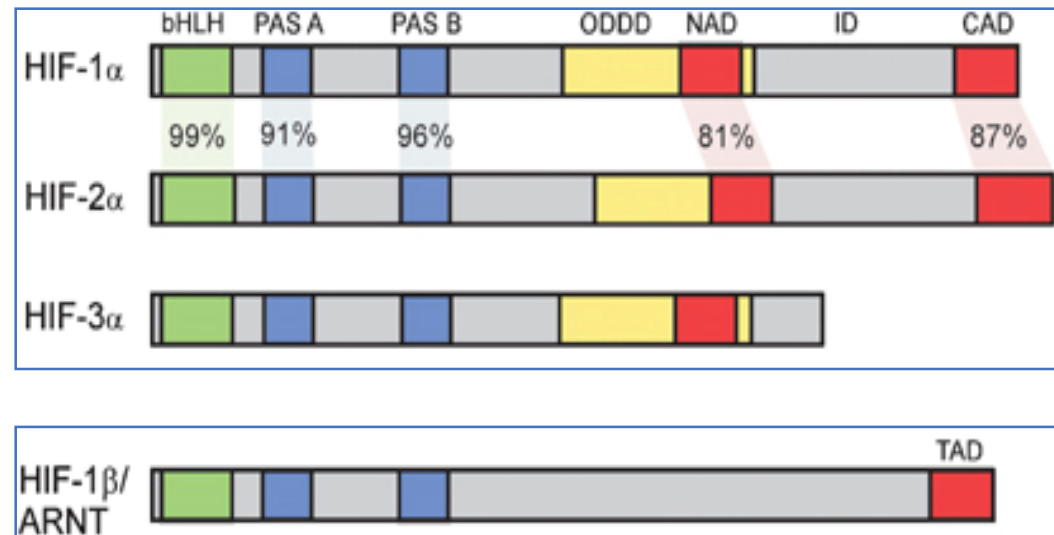
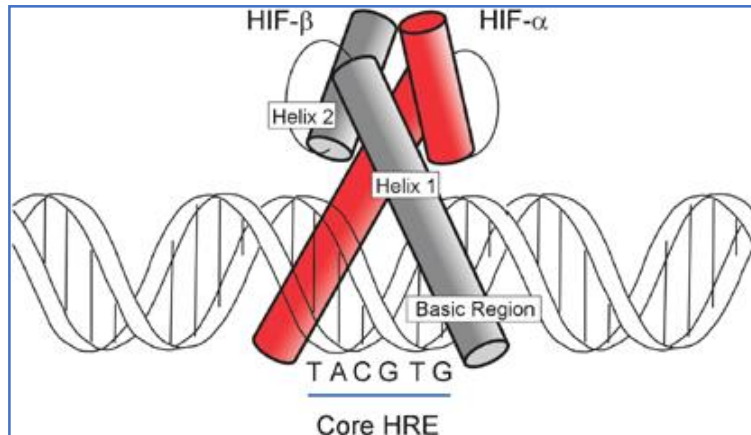
- ▶ EC tipo 2 presenta **herencia autosómica recesiva**, con prevalencia y penetrancia desconocida
- ▶ Diagnóstico se basa en: poliglobulia aislada, P50 normal, **EPO sérica alta o normal**, y sin historia familiar.
- ▶ Las mutaciones encontradas son en homocigosis, heterocigotos compuestos.

Policitemia Chuvash es endémica, causada por c.598C>T en homocigosis
Mayor prevalencia de trombosis venosa y arterial, y eventos hemorrágicos
No se ha descrito mayor incidencia de neoplasias

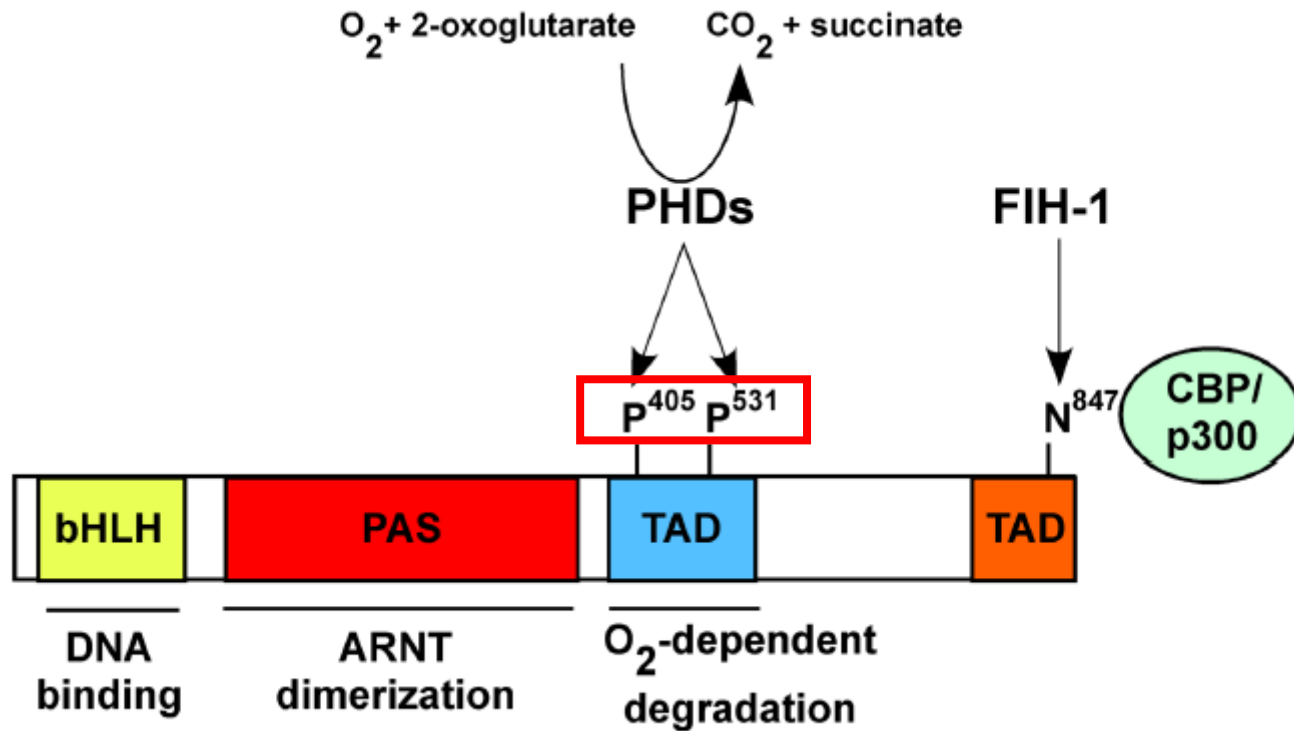
Vía de von Hippel-Lindau (VHL)



Factores inducibles por hipoxia (HIFs)



Estructura del gen *EPAS1* (HIF α 2)



Eritrocitosis Congénita tipo 4 (*EPAS*)

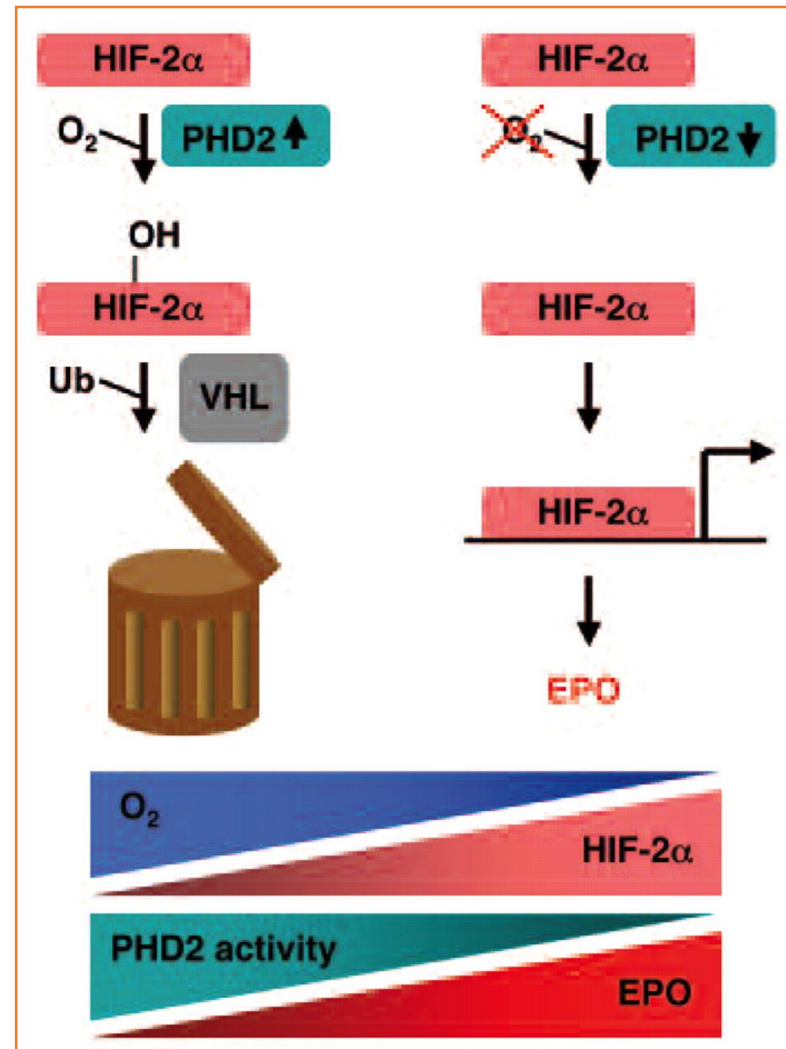
- ▶ EC tipo 4 presenta **herencia autosomica dominante**, con prevalencia y penetrancia desconocida
- ▶ Diagnóstico se basa en: poliglobulia aislada, P50 normal, **EPO sérica alta o normal**, y sin historia familiar.

Mutaciones en heterocigosis localizadas en el **exón 12**

Se ha reportado la mutación en el **exon 9 p.Phe374Tyr** en un paciente con policitemia y feocromocitoma/paraganglioma

Isoenzimas PDH

PDH2 enzima clave hidroxilación HIF2 α
El gen *EGLN1* codifica PDH2



Eritrocitosis Congénita tipo 3 (*EGLN1*)

- ▶ EC tipo 3 presenta **herencia autosómica dominante** (mutaciones en heterocigosis), con prevalencia y penetrancia desconocida, mutaciones en heterocigosis
- ▶ Diagnóstico se basa en: poliglobulia aislada, P50 normal, **EPO sérica normal** y historia familiar.
- ▶ La mutación **p.His374Arg** reportada en un paciente con policitemia y feocromocitoma/paraganglioma

Table 4. Previously described and novel oxygen-sensing pathway gene mutations leading to CE

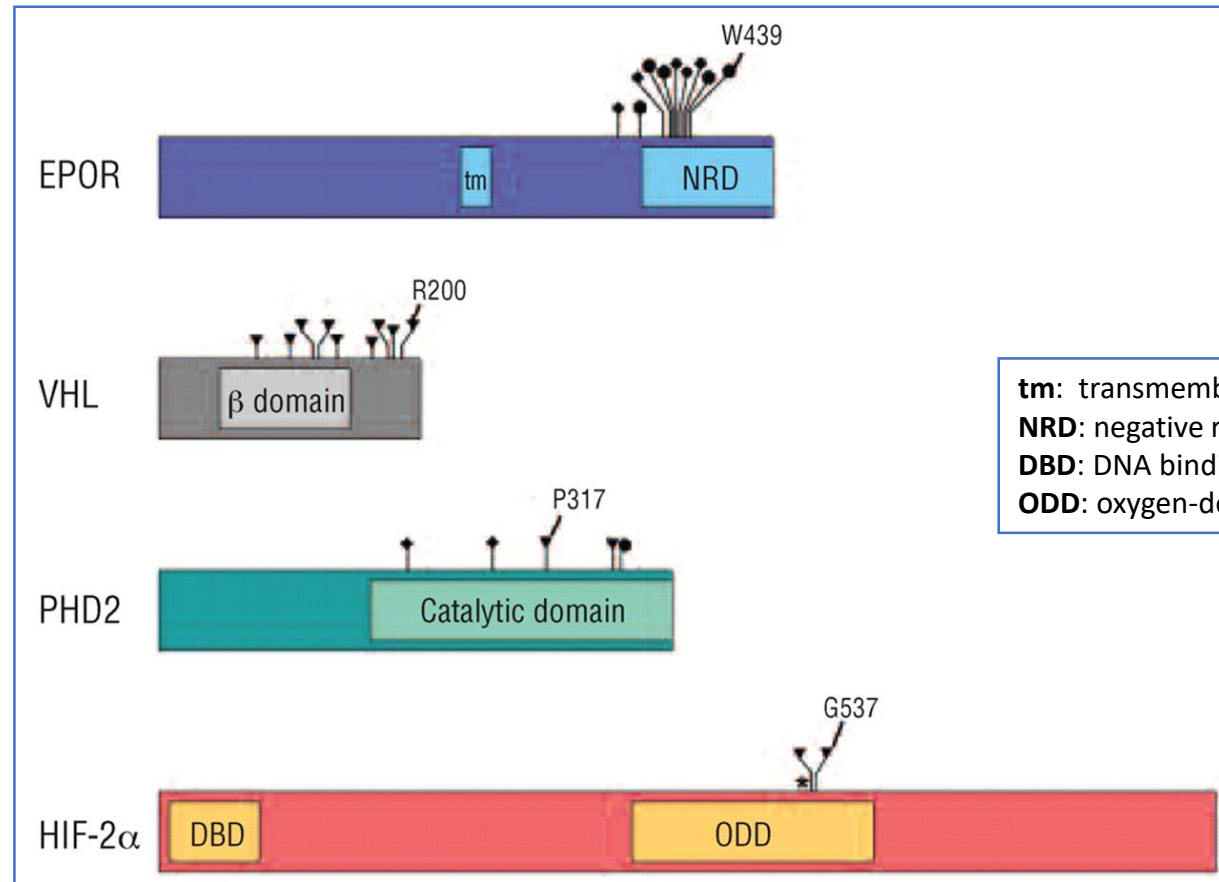
Gene	Nucleotide exchange	Exon	Protein effect	References
<i>EGLN1</i> (PHD2)	c.12C>A	1	p.Asp4Glu [#]	Lorenzo et al. (2010)
	c.380G>C	1	p.Gly127Ser [*]	Lorenzo et al. (2010)
	c.471G>C	1	p.Gln157His [#]	Albiero et al. (2011); Ladrone et al. (2012)
	c.599C>A	1	p.Pro200Gln	Ladrone et al. (2012)
	c.606delG	1	p.Met202Ilefs*72	Al-Sheikh et al. (2008)
	c.609C>G	1	p.Asn203Lys	Albiero et al. (2012)
	c.610G>A	1	p.Lys204Glu	McMullin (this report)
	c.760G>C	1	p.Asp254His	Ladrone et al. (2012)
	c.840dupA	1	p.Arg281Thrfs*4	Al-Sheikh et al. (2008)
	c.853G>C	1	p.Gly285Arg	McMullin (this report)
	c.872A>T	1	p.Lys291Ile	Albiero et al. (2012)
	c.950C>G	2	p.Pro317Arg	Percy et al. (2006)
	c.1000T>C	2	p.Trp334Arg	Bento et al. (2013b)
	c.1010dup	3	p.Val338Glyfs*18	McMullin (this report)
	c.1112G>A	3	p.Arg374His	Percy et al. (2007); Ladrone et al. (2012)
	c.1121A>G	3	p.His374Arg	Ladrone et al. (2008)
	c.1129C>T	3	p.Gln377*	Al-Sheikh et al. (2008)
	c.1192C>T	4	p.Arg398*	Ladrone et al. (2012)
	c.1267A>G	5	p.Lys423Glu	Albiero et al., (2012)

JAK2
V617F

Paraganglioma



Via reguladora de la Hipoxia, genes mutados



tm: transmembrane
NRD: negative regulatory domain
DBD: DNA binding
ODD: oxygen-dependent degradation domain



Diagnóstico diferencial Eritrocitosis

- Eritrocitosis absoluta
- Contaje de leucocitos y plaquetas normales, sin esplenomegalia
- Exclusión de causas secundarias adquiridas (cardiacas, pulmonares o renales)
- Exclusión de mutaciones en *JAK2* V617F
- Epo sérica normal



EPO NORMAL O ALTA

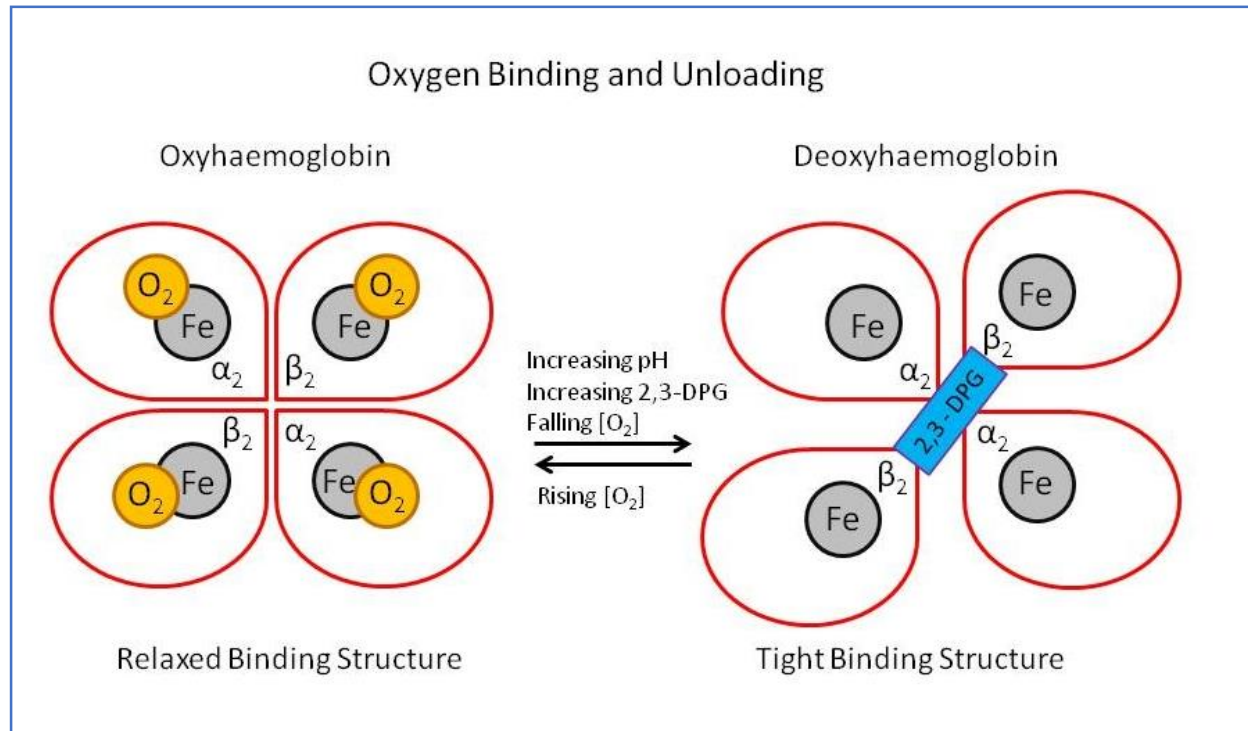
P50 BAJO



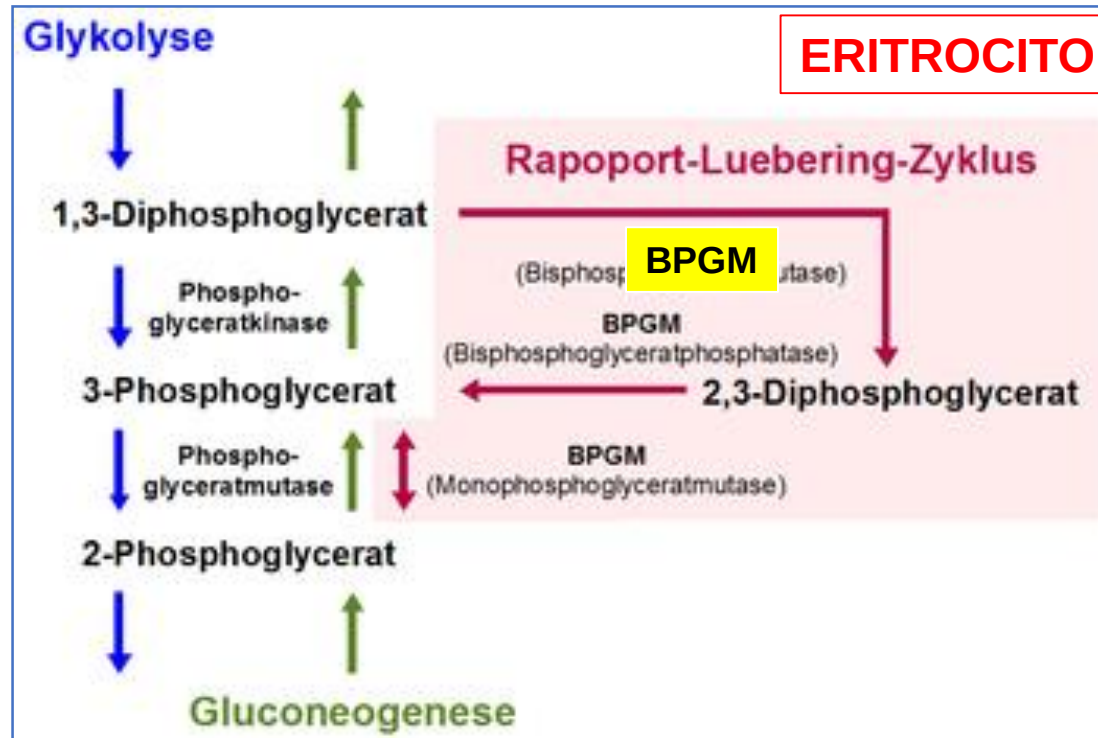
Secuenciación *HBB*, *HBA1*, *HBA2*
Secuenciación *BPGM*
Secuenciación Sistema NADH-metahemoglobina reductasa

**TRANSPORTE
ÓXIGENO POR
HEMOGLOBINA**

Deficiencia de Bifosfoglicerato mutasa



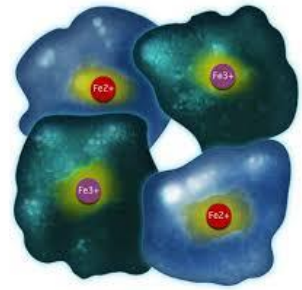
Deficiencia de Bifosfoglicerato mutasa



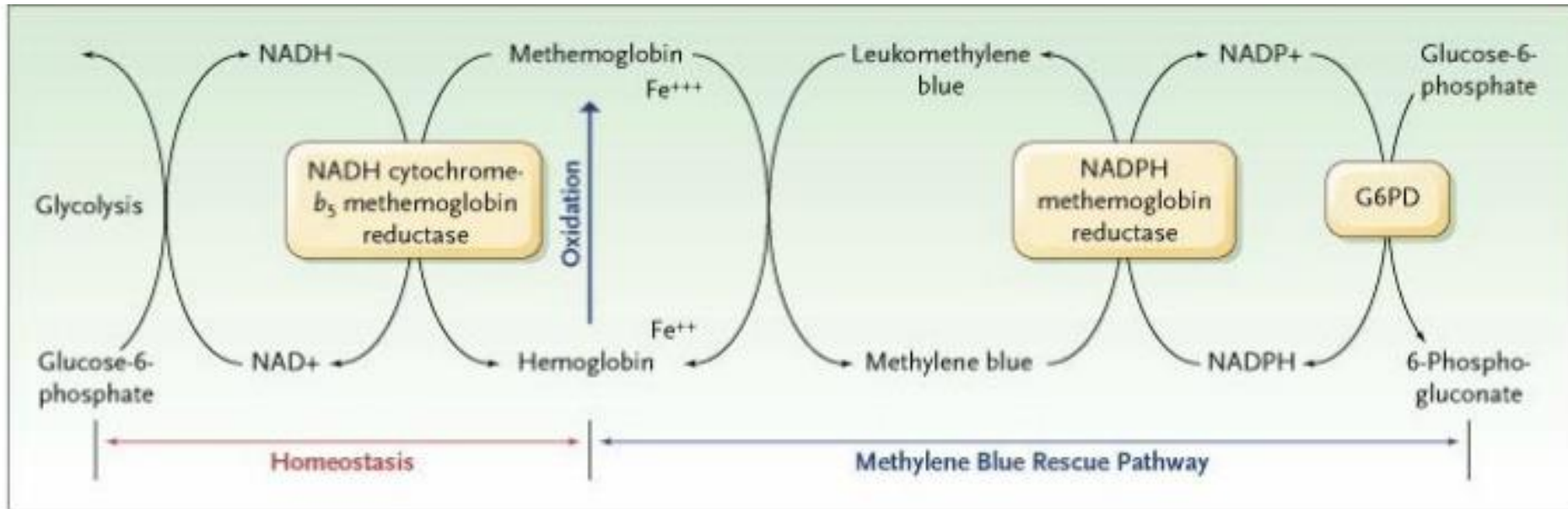
Mutaciones:

- c268C>T (p.Arg90Cys) c.61delC (p.Arg21Valfs*28) heterocigoto compuesto
- c.185G>A(p.Arg62Gln) homocigoto

Metahemoglobina

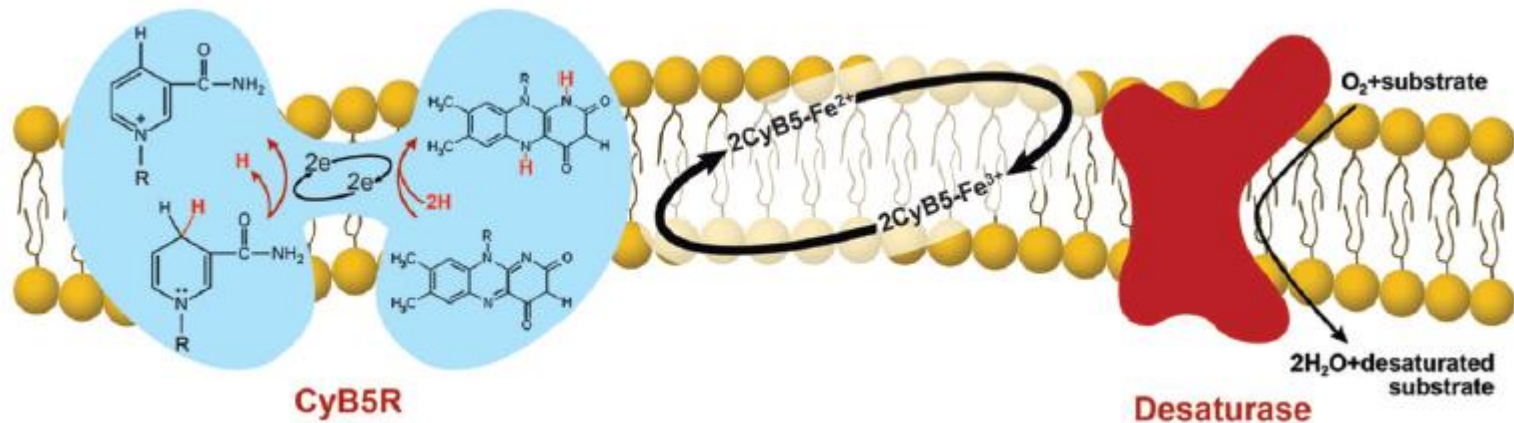


SISTEMA NADH-METAHEMOGLOBINA REDUCTASA

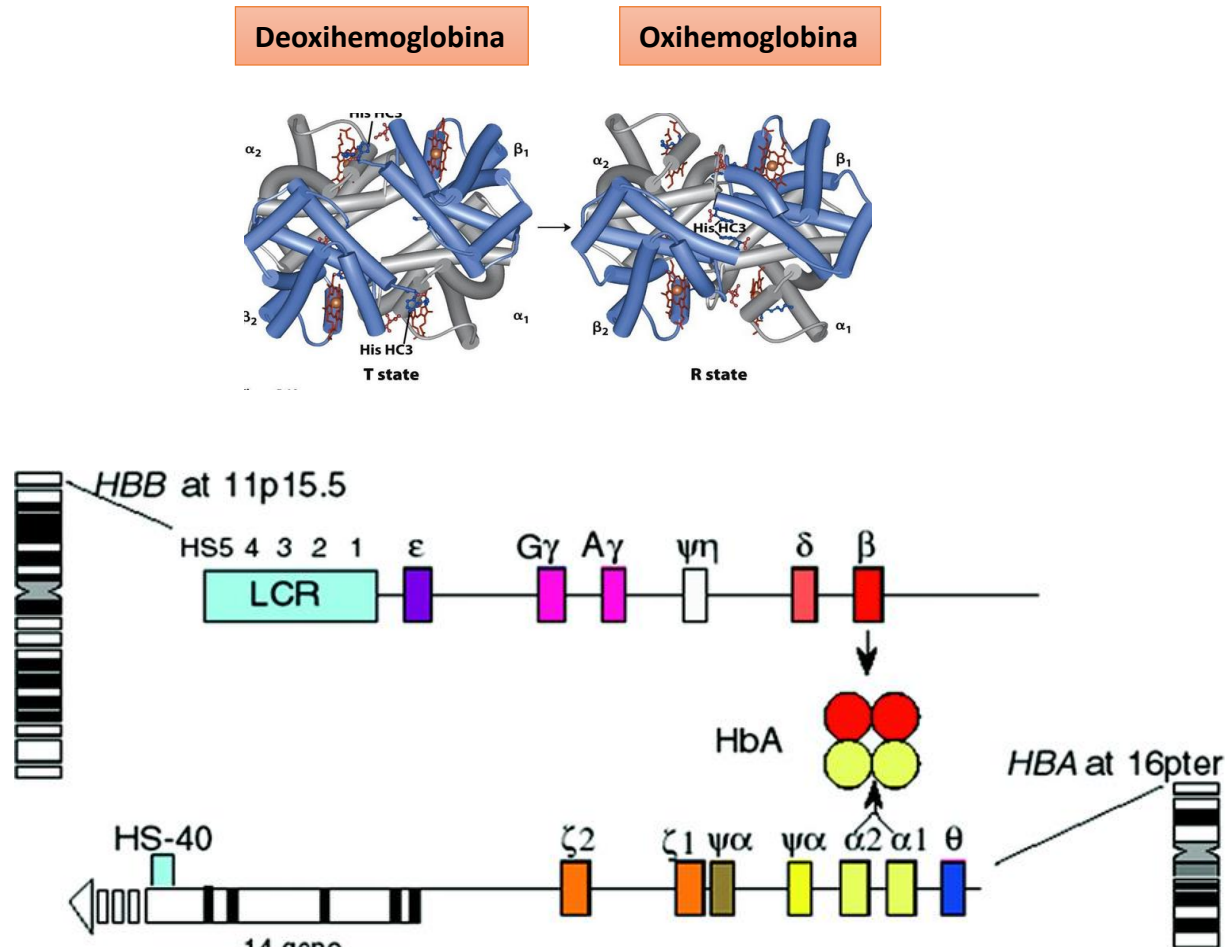


Metahemoglobina

- Deficiencia de citocromo b5R (AR)
- Deficiencia de citocromo b5 (AR)
- **Enfermedad de hemoglobina M (AD)**



Hemoglobinas de alta afinidad (*HBB*, *HBA1*, *HBA2*)



Hemoglobinas de alta afinidad

Journal of Clinical Investigation
Vol. 45, No. 6, 1966

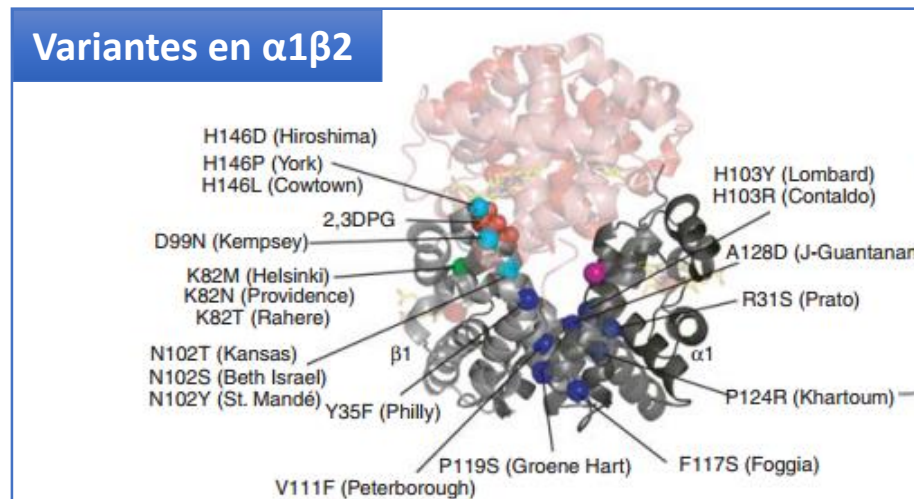
101 Hb alta afinidad (2017)

Polycythemia Associated with a Hemoglobinopathy *

SAMUEL CHARACHE,[†] DAVID J. WEATHERALL, AND JOHN B. CLEGG

(From the Departments of Medicine and Biophysics, Johns Hopkins University School of Medicine and Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Md.)

Variantes en $\alpha 1\beta 2$

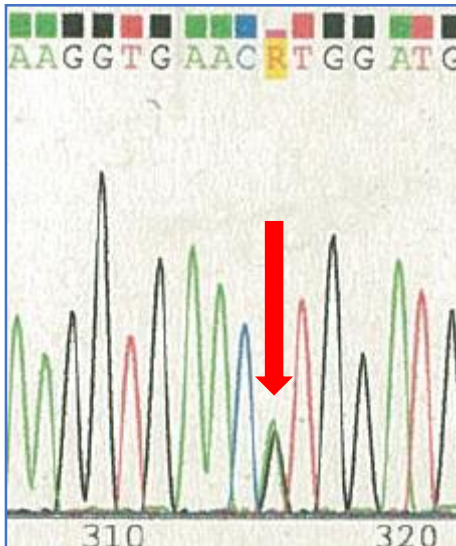




Diagnóstico diferencial Eritrocitosis

- Varón de 25 años con poliglobulia mantenida, Hb 19 g/dl y HTC 56 %
- Poliglobulia aislada con eritrocitosis absoluta y sin eplenomegalia
- Exclusión de causas secundarias adquiridas (cardíacas, pulmonares o renales)
- Exclusión de mutaciones en *JAK2* V617F
- Epo sérica normal, P50 no determinado

Hemoglobina Olympia heterocigota



HbVar: A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias

Detail page display

Hb Olympia

HbVar ID 257

HGVS name HBB:c.61G>A

Category

Hb variants

Mutation location

exon

hg19: chr11 5,248,191

Click on this button to view this variant as an user track

[PSU Genome Browser](#)

3D position

External

Hematology and Clinical Presentation

	Clinical presentation	Laboratory findings	Comments
Heterozygote	marked Erythrocytosis	- Hb 17 - 18.4 g/dL - MCV 88 - 93 fL - PCV 0.51 - 0.54 L/L - RBC 5.5 - 6.2 $10^{12}/L$	



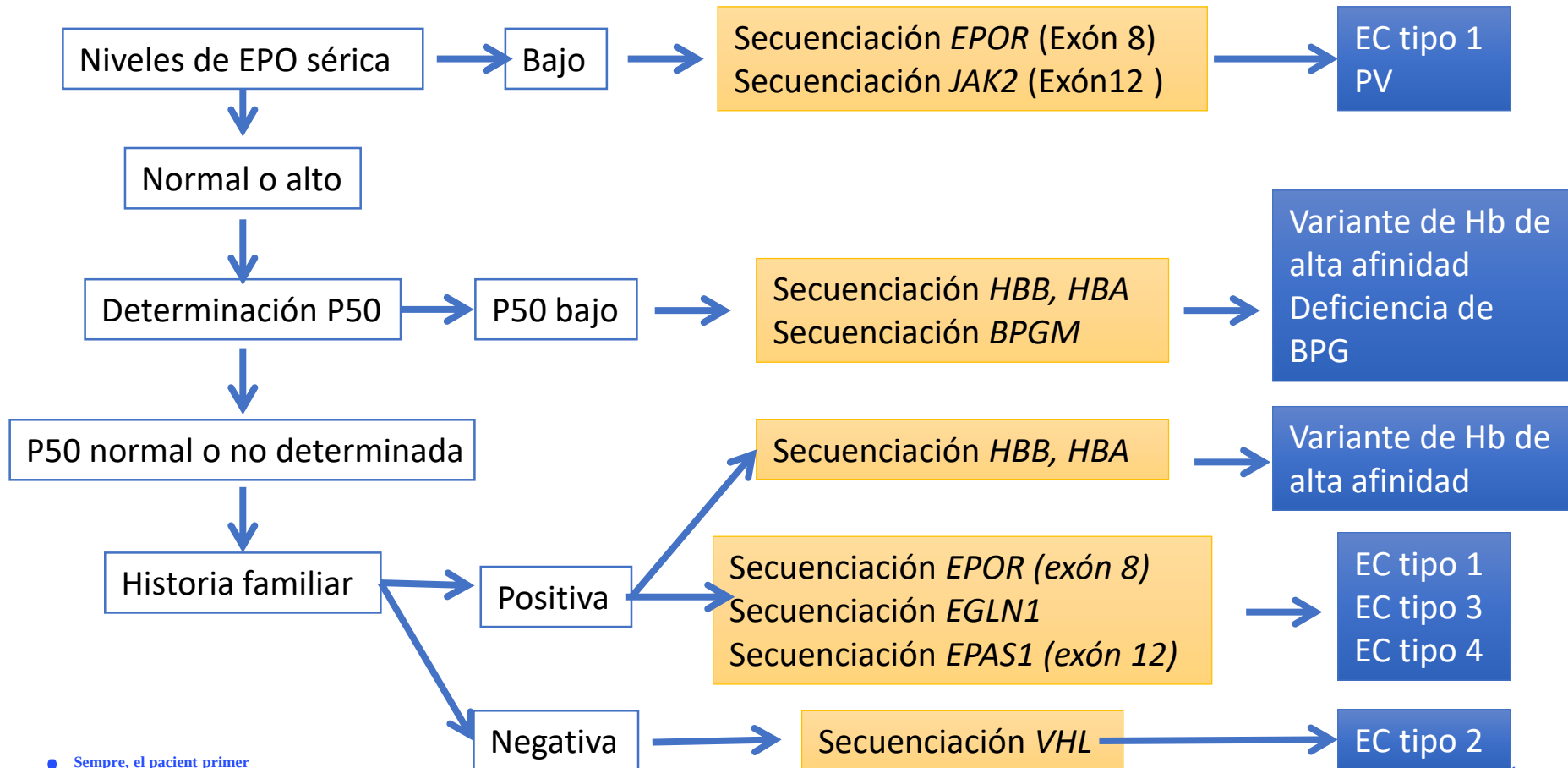
Conclusión

Table 1. Causes of erythrocytosis.

Primary erythrocytosis (typically low Epo levels)	
Congenital Epo receptor mutations	Acquired Polycythemia vera (including <i>JAK2</i> mutations)
Secondary erythrocytosis (high or normal Epo levels)	
Congenital (inherited) Defects in oxygen-sensing pathway: <i>VHL</i> mutations (e.g. Chuvash polycythemia) <i>EGLN1</i> (PHD2) mutations <i>EPAS1</i> (HIF2A) mutations Other congenital defects High-oxygen affinity Hb Bisphosphoglycerate mutase deficiency	Acquired (Epo-mediated) Systemic hypoxia: Chronic lung disease Right-to-left cardiopulmonary vascular shunts Smoker's erythrocytosis Nocturnal hypoventilation syndromes (e.g. obstructive sleep apnea) High altitude Local hypoxia: Renal artery stenosis Renal cysts (polycystic kidney disease) Post-renal transplant erythrocytosis Pathological Epo production (tumors) Brain (cerebellar hemangioblastoma, meningioma) Renal cell carcinoma Hepatocellular carcinoma Pheochromocytoma Drug-associated: Erythropoietin/androgen administration

Algoritmo Diagnóstico Eritrocitosis

Eritrocitosis absoluta, conteaje dentro de la normalidad de leucocitos y plaquetas, sin esplenomegalia. Descartar causas secundarias (cardiacas, pulmonares o renales)
JAK2 V617F no mutado



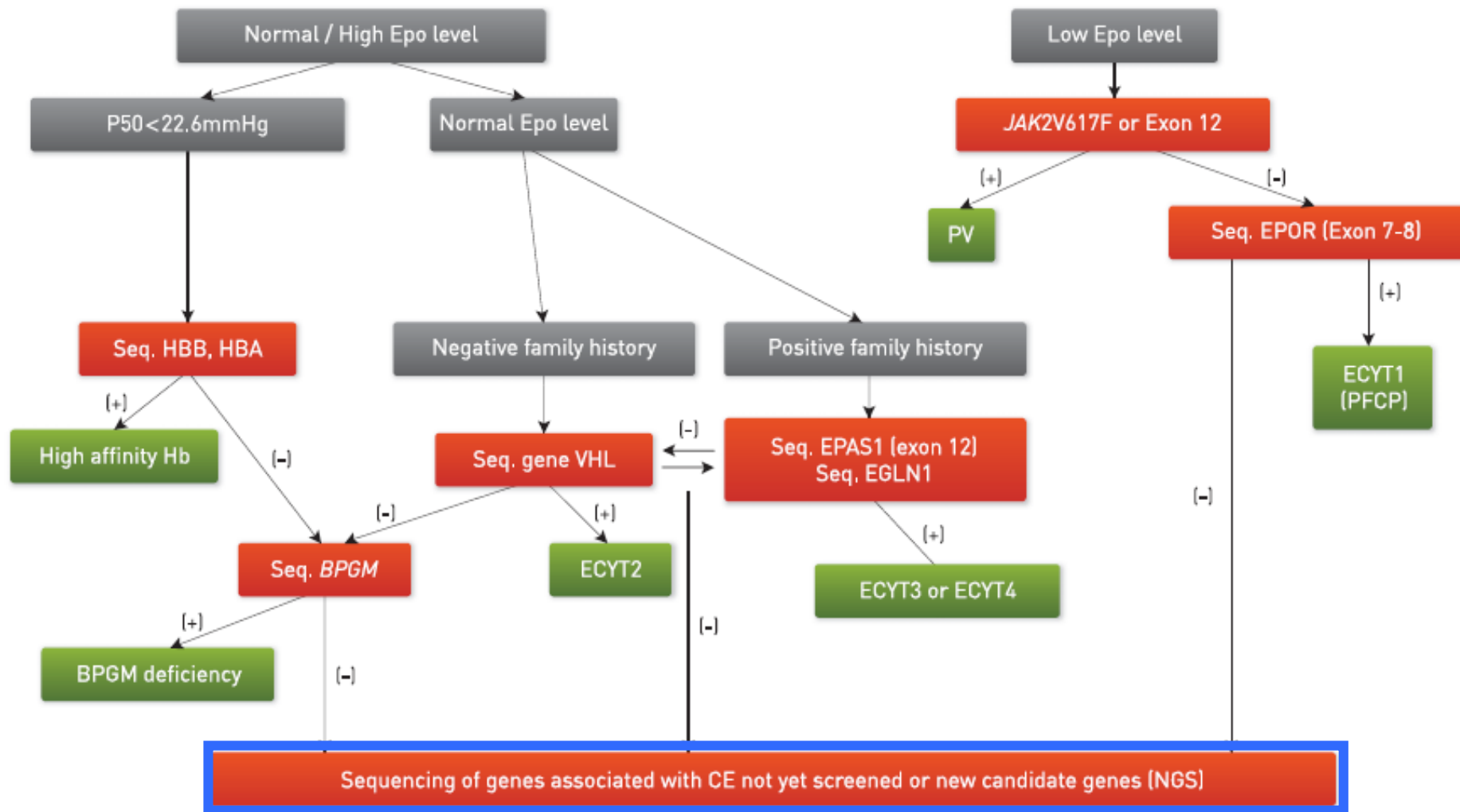
Eritrocitosis Congénita

Table 1. Congenital erythrocytosis—OMIM classification, genes, and proteins associated

Disease group (MIM number)	Gene (MIM number)	Location	Inheritance	Protein	Protein function
ECYT1 (133100)	EPOR (133171)	19p13.2	Dominant (<i>de novo</i> cases described)	Epo receptor (EPOR)	cognate receptor for EPO activates JAK/STAT5 pathway promotes survival, proliferation and differentiation of erythroid progenitor cells.
ECYT2 (263400)	VHL (608537)	3p25.3	Recessive (dominant cases described)	Van Hippel Lindau (VHL)	E3 ligase involved in the ubiquitination and degradation of HIF α isoforms targets HIF α for proteasomal degradation
ECYT3 (609820)	EGLN1 (606425)	1q42.1	Dominant	Prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 (PHD2)	oxygen sensor of HIF pathway hydroxylates prolines in HIF α isoforms requires O ₂ , Fe, 2Og for activity/function.
ECYT 4 (611783)	EPAS1 (603349)	2p21	Dominant	Hypoxia Inducible Factor 2 α (HIF2 α)	part of HIF2 transcription complex hydroxylated by PHD2 targeted to proteasome by VHL controls Epo synthesis
High oxygen affinity: Variant Hbs, BPGM	HBB, HBA	11p15.4; 16p13.3	Dominant	Hemoglobin (Hb)	tetramer made up of two alpha and two beta chains oxygen transport from the lung to the peripheral tissues
	BPGM	7q33	Recessive	Bisphosphoglycerate mutase	regulation of hemoglobin affinity for oxygen controls the levels of 2,3-BPG



Algoritmo diagnóstico de EC





Generalitat de Catalunya
Departament de Salut



Institut Català
de la Salut