

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**DIAGNÓSTICO DE LAS DIÁTESIS
HEMORRÁGICAS HEREDITARIAS MEDIANTE
EL ANÁLISIS GENÉTICO
POR SECUENCIACIÓN MASIVA**

José María Bastida Bermejo
2015

D. Jesús María Hernández Rivas, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca y **D. José Ramón González Porras**, Doctor en Medicina, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina y Médico Adjunto del Hospital Clínico Universitario de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección, por **D. José María Bastida Bermejo**, titulado **“DIAGNÓSTICO DE LAS DIÁTESIS HEMORRÁGICAS HEREDITARIAS MEDIANTE EL ANÁLISIS GENÉTICO POR SECUENCIACIÓN MASIVA”** reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 30 de octubre de 2015.

Fdo. Dr. Jesús María Hernández Rivas

Fdo. Dr. José Ramón González Porras

A mis padres

A Ana

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hernández Rivas por contar conmigo para este proyecto, por la oportunidad de llevar a cabo esta tesis doctoral y por sus numerosos consejos.

A José Ramón por ofrecerme su tiempo, paciencia y disponibilidad sin condiciones. Por ser un ejemplo a seguir, un gran compañero y una gran persona. Y Al Dr. Alberca, por sus enseñanzas y la confianza depositada en mí desde que me conoció.

A Mónica y a Rocío por su gran ayuda, tiempo y dedicación a este proyecto; y a todas las personas del CIC e IBSAL que han participado.

A Pepe Rivera y a Marisa Lozano por su experiencia, generosidad y colaboración, que ha permitido crear un gran grupo de trabajo. Y por los infinitos mails intercambiados y su disponibilidad constante.

A Javier Corral por su cariño, ofrecerme su tiempo, sus conocimientos y pasión por la biología molecular.

Al Dr. San Miguel por ser un referente e inculcarme la pasión por la hematología y a la Dra del Cañizo por contar conmigo y darme la oportunidad de trabajar en este gran servicio.

A todos los que forman parte del Servicio de Hematología; muy especialmente al equipo de Coagulación por su apoyo y cariño. Al Dr. Marcos González por sus valiosos consejos, a todos los residentes por ser la base de este servicio y, por su puesto, a mis Co-Rs por compartir los buenos y malos momentos desde nuestra “primera firma”.

A todas las personas del CRH de Murcia por acogerme y hacerme sentir como uno más desde el principio.

A Todos mis Amigos por estar siempre ahí. A Miriam, Javi y Elena por sus consejos y apoyo incondicional.

A Fátima y Gabriel por quererme tanto y ser mi familia.

Agradecimientos

A Ana por ser mi Vida y porque sin ella nada hubiera sido posible.

A mi familia por ayudarme cuando más lo necesitaba.

Y a mi Madre, por ayudarme a desarrollar como persona, inculcarme los valores, por sus consejos únicos y por quererme tanto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	25
I. Clasificación y características clínico biológicas de las de las diátesis hemorrágicas hereditarias	28
1.1. Trastornos plaquetarios hereditarios	28
<i>Megacariopoyesis y fisiología plaquetaria</i>	29
<i>Trombocitopenias hereditarias</i>	32
<i>Trombocitopatías hereditarias</i>	36
1.2. Trastornos de la coagulación hereditarios	39
<i>Fisiología de la hemostasia secundaria</i>	39
<i>Clasificación de los trastornos de la coagulación hereditarios</i>	41
II. Diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias	42
2.1. Diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios	42
<i>Historia clínica familiar, personal y exploración física</i>	42
<i>Pruebas de Screening</i>	43
<i>Pruebas específicas de laboratorio</i>	44
<i>Algoritmo diagnóstico actual y nuevas técnicas diagnósticas</i>	47
2.2. Diagnóstico de los trastornos de la coagulación hereditarios	49
III. Aplicaciones de la secuenciación masiva	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
IV. Hipótesis	59
V. Objetivos	62
MATERIAL Y MÉTODOS	63
VI. Pacientes	
65	
6.1. Criterios de Inclusión	65
<i>Trastornos plaquetarios hereditarios</i>	65
<i>Trastornos de la coagulación hereditarios</i>	66

6.2. Población a estudio	66
6.3. Datos registrados	67
VII. Métodos	68
7.1. Estudios fenotípicos funcionales/morfológicos	68
7.2. Estudios moleculares	69
<i>Aislamiento de ADN</i>	69
<i>Next-Generation Sequencing</i>	69
<i>Secuenciación Sanger</i>	79
7.3. Aspectos éticos	80
RESULTADOS	81
Capítulo 1. <i>Design and validation of a 71-gene Next-Generation DNA sequencing panel for the diagnosis of inherited platelet disorders</i>	83
Capítulo 2. <i>Design and application of a thirty one-gene panel by Next Generation sequencing for Inherited bleeding coagulation disorders</i>	111
Capítulo 3. <i>Aplicación clínica de la secuenciación masiva en el diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios</i>	131
DISCUSIÓN GENERAL	155
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175
ANEXOS	195
Anexo 1. Escala de sangrado	197
Anexo 2. Publicaciones, comunicaciones y premios	198

ABREVIATURAS

<i>A2M</i>	Alpha-2-Macroglobulin
AA	Ácido araquidónico
<i>ABCA1</i>	ATP-Binding Cassete Sub-Family A
<i>ABCG5</i>	ATP-Binding Cassete Sub-Family G Member 5
<i>ABCG8</i>	ATP-Binding Cassete Sub-Family G Member 8
<i>ACTN1</i>	Actinin Alpha 1
AD	Autosómico dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
<i>ADRA2A</i>	Adrenoreceptor Alpha 2A
Ag	Antígeno
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
<i>ANKRD26</i>	Ankyrin Repeat Domain 26
<i>ANO6</i>	Anoctamin 6
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
<i>AP3B1</i>	Adaptor-Related Protein Complex 3, Beta 1 Subunit
AR	Autosómico recesivo
ARC	Síndrome Artrogriposis-disfunción Renal-Colestasis
ARN	Ácido ribonucleico
ATRUS	Trombocitopenia amegacariocítica con sinostosis radio-ulnar
BAM	Binary-alignment
BAT	Bleeding Assessment Tool
BCSH	British Committee for Standards in Haematology
BLOC	Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex
<i>BLOC1S3</i>	Biogenesis Of Lysosomal Organelles Complex-1, Subunit 3
<i>BLOC1S6</i>	Biogenesis Of Lysosomal Organelles Complex-1, Subunit 6
Beta-TG	Beta-Thromboglobulin
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
<i>CIQB1</i>	Complement Component 1, Q Subcomponent Binding Protein
Ca²⁺	Calcio iónico
CalDAG-GEFI	Ca ²⁺ and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor I
CAMT	Trombocitopenia amegacariocítica congénita
<i>CD36 /GP4</i>	Thrombospondin Receptor

ChIP-seq	Estudios de interacción proteína-ADN
CLEC3B	C-Type Lectin Domain Family 3, Member B
CMF	Citometría de flujo
CNV	Copy number variations
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
COX-1	Ciclooxigenasa tipo 1
CPB2	Carboxypeptidase B2
CRH	Centro Regional de Hemodonación
CRP	Péptido relacionado con el colágeno
CSO	Custom Selected Oligos
CYCS	Cytochrome C, Somatic
DAG	Diacilglicerol
DD	Diagnóstico diferencial
DHCR24	24-Dehydrocholesterol Reductase
DHH	Diátesis hemorrágica hereditaria
DPAGT1	Dolichyl-Phosphate N-Acetylglucosaminephosphotransferase 1
DTNBPI	Dystrobrevin Binding Protein 1
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPF/LMA	Enfermedad plaquetaria familiar con predisposición a LMA
ESP	Exome Sequencing Project
EVS	Exome Variant Server
EVW	Enfermedad de von Willebrand
EVW-TP	Enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario
F	Factor
F2	Coagulation Factor II
F3	Coagulation Factor III
F5	Coagulation Factor V
F7	Coagulation Factor VII
F8	Coagulation Factor VIII
F9	Coagulation Factor IX
F10	Coagulation Factor X
F11	Coagulation Factor XI
F12	Coagulation Factor XII (Hageman Factor)

<i>F13A1</i>	Coagulation Factor XIII, A1 Polypeptide
<i>F13B</i>	Coagulation Factor XIII, B Polypeptide
<i>FERMT3</i>	Fermitin Family Member 3
<i>FGA</i>	Fibrinogen Alpha Chain
<i>FGB</i>	Fibrinogen Beta Chain
<i>FGG</i>	Fibrinogen Gamma Chain
<i>FIBCD1</i>	Fibrinogen C Domain Containing 1
<i>FLI1</i>	Fli-1 Proto-Oncogene or ETS Transcription Factor
<i>FLNA</i>	Filamin A Alpha
FT	Factor tisular
FVIII:C	Factor VIII coagulante
FVW	Factor von Willebrand
FVW:Ac o RCo	Actividad del factor von Willebrand
FVW:Ag	Antígeno de factor von Willebrand
FVW:CB	Capacidad de unión del colágeno al FVW
FVW:VIII	Capacidad de unión del FVIII al FVW
<i>GATA1</i>	Globin Transcription Factor 1
GATK	Genome Analysis Toolkit
<i>GFI1B</i>	Growth Factor Independent 1B Transcription Repressor
<i>GGCX</i>	Gamma-Glutamyl Carboxylase
<i>GNAI3</i>	Guanine Nucleotide Binding Protein Alpha Inhibiting Activity Polypeptide 3
<i>GNAQ</i>	Guanine Nucleotide Binding Protein Q Polypeptide
<i>GNAS</i>	GNAS Complex Locus
GP	Glicoproteína
<i>GP1BA</i>	Glycoprotein Ib Alpha Polypeptide
<i>GP1BB</i>	Glycoprotein Ib Beta Polypeptide
<i>GP6</i>	Glycoprotein VI
<i>GP5</i>	Glycoprotein V
<i>GP9</i>	Glycoprotein IX
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HMWK	High molecular weight kininogen
<i>HOXA11</i>	Homeobox A11

HPLC	High Performance liquid chromatography
HPN	Heterotopia periventricular nodular
<i>HPS1</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome 1
<i>HPS3</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome 3
<i>HPS4</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome 4
<i>HPS5</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome 5
<i>HPS6</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome 6
<i>HRG</i>	Histidine-Rich Glycoprotein
HSTC	Transplante alogénico
HT1	Hybridization Buffer
IAM	Infarto agudo de miocardio
IBSAL	Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGV	Integrative Genomics Browser
InDels	Inserciones y deleciones
IP	Inositol fosfato
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPF	Índice de plaquetas inmaduras o reticuladas
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
<i>ITGA2</i>	Integrin Alpha 2 or Alpha 2 Subunit of VLA-2 Receptor
<i>ITGA2B</i>	Integrin Alpha 2b
<i>ITGB3</i>	Integrin Beta 3
<i>KLKB1</i>	Kallikrein B, Plasma (Fletcher Factor) 1
<i>KNG1</i>	Kininogen 1
LADIII	Leukocyte Adhesion Deficiency III
LHL	Linfocitosis hemofagocítica
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
<i>LMAN1</i>	Lectin, Mannose-Binding, 1
LTA	Light transmission aggregometry
LumiLTA	Lumiagregometría
<i>LYST</i>	Lysosomal Trafficking Regulator
MacroTH Medit	Macrotrombocitopenia hereditaria mediterránea
MAF	Minor allele frequency

<i>MASTL</i>	Microtubule Associated Serine/Threonine Kinase-Like
<i>MCFD2</i>	Multiple Coagulation Factor Deficiency 2
ME	Microscopía electrónica
Meg-CFC	Célula formadora de colonias de megacariocitos
MeSH	Medical Subject Headings
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
<i>MLPH</i>	Melanophilin
MO	Médula ósea
<i>MPL</i>	Thrombopoietin Receptor
<i>MYH9</i>	Myosin Heavy Chain 9 Non-Muscle
<i>MYO5A</i>	Myosin VA (Heavy Chain 12, Myosin)
NaOH 2N	Sodium hydroxide solution volumetric
<i>NBEAL2</i>	Neurobeachin-Like 2
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEH2	Nextera Enrichment Hyb Plate 1
NEW1	Nextera Enrichment Was Plate 1
NF-E2	Nuclear Factor, Erythroid 2
NGS	Secuenciación masiva o Next-Generation Sequencing
NHLBI	The National Heart, Lung, and Blood Institute
NIL	Nextera Index Library Plate
NLA	Nextera Library Amplification Plate
NLT	Nextera Library Tagment Plate
NLX	Neutropenia ligada al cromosoma X
NMM-IIA	Nonmuscle myosin IIA
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
<i>P2RX1</i>	Purinergic Receptor P2X, Ligand Gated Ion Channel, 1
<i>P2RY1</i>	Purinergic Receptor P2Y, G-Protein Coupled, 1
<i>P2RY12</i>	Purinergic Receptor P2Y, G-Protein Coupled, 12
P2Y12	Purinergic Receptor P2Y12
PAR-1	Protease activated receptor 1
PAR-4	Protease activated receptor 4
Pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Platelet derived growth factor
PF	Factor plaquetario
PFA100®	Platelet Function Analyzer
PGG2/PGH2	Prostaglandinas G2 y H2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA	Protein-cinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2 citosólica
PLA2G7	Phospholipase A2 Group VII
PLAT	Plasminogen Activator, Tissue
PLAU	Plasminogen Activator Urokinase
PLAUR	Plasminogen Activator Urokinase Receptor
PLC	Fosfolipasa C
PLCB2	Phospholipase C
PLG	Plasminogen
PLGRKT	Plasminogen Receptor, C-Terminal Lysine Transmembrane Protein
PMA	Phorbol myristate acetate
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping version-2
Pr.Transmembr.	Proteína transmembrana
PRF1	Perforin 1 (Pore Forming Protein)
PRKACG	Protein Kinase CAMP-Dependent Catalytic Gamma;
PRP	Plasma rico en plaquetas
PTI	Trombocitopenia inmune
PTGS1	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1
PTS	6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase
RAB27A	Member RAS Oncogene Family
RASGRP2	RasGuanyl Releasing Protein 2.
RBM8A	RNA Binding Motif Protein 8A
RCo	Cofactor de la ristocetina
RGS2	Regulator Of G-Protein Signaling 2
RIPA	Aglutinación de PRP con ristocetina

RNA-Seq	Secuenciación de transcriptomas completo
rpm	Revoluciones por minuto
RTA	Análisis en tiempo real
<i>RUNX1</i>	Runt-Related Transcription Factor 1
SBS	Síndrome Bernard Soulier
SCH	Síndrome Chediak-Higashi
SDF-1	Stromal-derived factor 1
SG	Síndrome de Griscelli
SHP	Síndrome Hermansky-Pudlak
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SJB	Síndrome Jacobsen
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNVs	Single Nucleotide Variants
SP	Sangre periférica
SPG	Síndrome Plaqueta Gris
<i>STIM1</i>	Stromal Interaction Molecule 1
STSL	Sitosterolemia
<i>STX11</i>	Syntaxin 11
<i>STXBP2</i>	Syntaxin Binding Protein 2
SWA	Síndrome Wiskott-Aldrich
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
TAR	Trombocitopenia con ausencia de radio
TASRC	ver ATRUS
<i>TBXA2R</i>	Thromboxane A2 Receptor
<i>TBXAS1</i>	Thromboxane A Synthase 1
TCPT	Síndrome Paris-Trousseau
TEG	Tromboelastografía
TFPHs	Trombocitopatías hereditarias
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
TG	Trombastenia de Glanzmann
TGT	Test de generación de trombina
TH(s)	Trombocitopenia(s) hereditaria(s)
TLX	Trombocitopenia ligada al cromosoma X

TPHs	Trastornos plaquetarios hereditarios
TPO	Trombopoyetina
TRAP	Thrombin receptor agonist peptide
TS	Thromboxane synthase
<i>TUBB1</i>	Tubulin Beta 1 Class VI
<i>UNC13D</i>	Unc-13 Homolog D
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
<i>USF1</i>	Upstream Transcription Factor 1
TxA2	Tromboxano A2
VASP	Fosfoproteína estimulante vasodilatadora
VEB	Virus de Epstein Barr
<i>VIPAS39</i>	VPS33B Interacting Protein
<i>VKORC1</i>	Vitamin K Epoxide Reductase Complex, Subunit 1
VPM	Tamaño o volumen plaquetario medio
<i>VPS33B</i>	Vacuolar Protein Sorting 33 homologue B
<i>VWF</i>	Von Willebrand Factor
<i>WAS</i>	Wiskott-Aldrich Syndrome
WES	Whole-Exome-sequencing
WGS	Whole-Genome-sequencing

INTRODUCCIÓN

Las diátesis hemorrágicas hereditarias (DHH) constituyen un grupo amplio y heterogéneo de trastornos hereditarios y/o congénitos poco frecuentes, relacionados con la hemostasia primaria y la secundaria. El diagnóstico de sospecha es esencial y consiste en la caracterización clínica, fenotípica y funcional del paciente. Así, se podrá dirigir el análisis molecular a un gen candidato y confirmar, por tanto, el diagnóstico. Sin embargo, esta estrategia supone un reto diagnóstico debido a que, en numerosas ocasiones, el diagnóstico de estas enfermedades es difícil, sobre todo en los casos con fenotipos hemorrágicos leves o fenotipos indeterminados. La falta de acuerdo en su clasificación, la ausencia de estandarización y la gran heterogeneidad en las herramientas diagnósticas, son las principales limitaciones para la detección de estos defectos. Para su diagnóstico se requiere una gran cantidad de pruebas, una validación interna e interlaboratorios, y la repetición del estudio, por lo menos un mes después, para que desaparezcan los posibles factores intercurrentes adquiridos. Desde hace años el diagnóstico molecular de los trastornos hereditarios se lleva a cabo mediante secuenciación convencional, tipo Sanger. Sin embargo, las DHH son enfermedades raras y con múltiples genes implicados en la etiopatogenia de la enfermedad, que condicionan patologías difícilmente diferenciables en ocasiones. La secuenciación convencional de múltiples genes es cara y laboriosa, por lo que es necesario gran cantidad de tiempo para secuenciar numerosos exones de muchos genes cuando el fenotipo no está bien definido.

La secuenciación masiva o Next-Generation Sequencing (NGS) es una herramienta valiosa para la investigación y evaluación de los trastornos clínicos causados por mutaciones genéticas. Ofrece la capacidad de secuenciar gran cantidad de información genética de manera paralela, simultánea y de forma precisa. En un intento de solucionar estos problemas, hemos planteado el análisis simultáneo de un gran número de genes en una serie de enfermos con DHH (Panel de Hemostasia Primaria y Secundaria). Una de las aplicaciones de la secuenciación masiva es la captura de determinadas regiones del genoma, herramienta que permite analizar gran cantidad de exones y de diferentes genes de manera simultánea y con un coste asumible. Por ello, en este estudio hemos empleado la captura de secuencia, que es idónea para secuenciar alteraciones genéticas hereditarias presentes en las DHH, enfermedades en las que no ha sido utilizada de manera sistemática.

I. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE LAS DIÁTESIS HEMORRÁGICAS HEREDITARIAS

Las DHH se clasifican en dos grandes grupos en función de la alteración de la hemostasia. Si se afecta la hemostasia primaria se denominan trastornos plaquetarios hereditarios, mientras que si la hemostasia secundaria está alterada se definen como trastornos de la coagulación hereditarios.

1.1. Trastornos Plaquetarios Hereditarios

Los trastornos plaquetarios hereditarios (TPHs) son un grupo heterogéneo de enfermedades que provocan una tendencia al sangrado con una intensidad variable dependiendo del tipo de trastorno, edad, sexo y exposición a eventos hemorrágicos, tales como intervenciones quirúrgicas o traumatismos [1].

Según la localización del defecto, los TPHs se clasifican en dos grupos: a) Trombocitopenias hereditarias (THs) que son producidas por la alteración a nivel de la megacariopoyesis en donde se afecta la formación y el número de plaquetas y las b) Trombocitopatías hereditarias (TFPHs) por alteración a nivel de la función plaquetaria (Figura 1) [2].

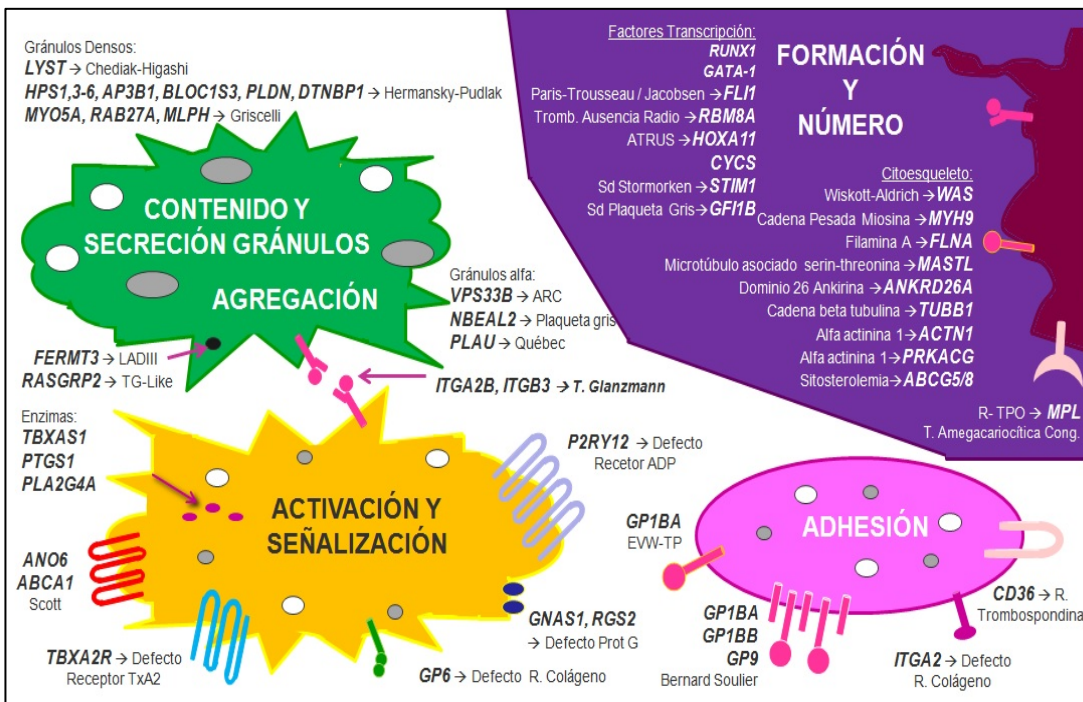


Figura 1. Representación esquemática de los distintos trastornos plaquetarios hereditarios (adaptado y modificado de Bunin et al) [2].

Las distintas fases que intervienen en la formación del coágulo son (Figura 3) [14]:

- Adhesión: la lesión del endotelio vascular da lugar a la exposición de fibrillas de colágeno que permite la unión a su receptor (GP Ia/IIa) y la unión del factor von Willebrand (FVW) al complejo GP Ib/IX/V, localizado en la matriz subendotelial [15,16].
- Activación: los agonistas plaquetarios se unen a sus receptores correspondientes (Colágeno/GPVI; ADP/P2Y₁₂; Trombina/PAR-1, PAR-4; Tromboxano [TxA₂]/receptor TxA₂), asociados a proteínas G transmembrana dando lugar a la cascada de señalización en la que intervienen enzimas (fosfolipasa C o PLC, fosfatidilinositol 3-cinasa o PI3K, proteína quinasa C o PKC) e iones Ca²⁺ favoreciendo la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP), la síntesis de TxA₂, el incremento del Ca²⁺ citosólico y la disminución del AMPc [17-22]. Todo ello conlleva la activación, la señalización intracelular y la modificación de la morfología y el contenido plaquetario [23,24].
- Agregación: formación de puentes de fibrinógeno entre las plaquetas tras producirse un cambio conformacional reversible en la integrina α IIb β 3 (receptor del fibrinógeno), que a su vez, favorece la aparición de hasta 80.000 receptores por plaqueta y la afinidad de la integrina por el fibrinógeno [14]. La activación de este complejo se produce por dos mecanismos (“inside-out y out-inside”) [14]:
 - “Inside-out”: el incremento del Ca²⁺ citosólico dependiente de la PKC y/o de la proteína reguladora del DAG/Ca²⁺ (CalDAG-GEFI) provoca la activación, vía Rap1b, de las proteínas del citoesqueleto *Talin-1* y *Kindlin-3* provocando el cambio conformacional del receptor del fibrinógeno [25,26].
 - “Out-inside”: la unión con el fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y FVW, inicia una cascada de señalización a través de las tirosín quinazas (Src y Syk), que provoca la activación de PLC y PI3K [27]. Las plaquetas activadas por ADP aumentan la expresión de moléculas de adhesión intercelular en las células endoteliales (ICAM-1), fibronectina, trombospondina, y otras proteínas adhesivas que refuerzan y estabilizan el tapón plaquetario. El fibrinógeno liberado de los gránulos α aporta una fuente de fibrinógeno adicional en las zonas de lesión endotelial. Además, los factores de crecimiento como el PDGF tienen un potente efecto mitogénico sobre las células musculares lisas y contribuyen a la reparación tisular [28].

1.1.2. Trombocitopenias Hereditarias

En la última década se han descubierto nuevos defectos genéticos asociados a la presencia de trombocitopenia y se ha determinado la presencia de mutaciones en nuevos genes implicados en estas patologías, aunque se piensa que sólo constituyen una pequeña fracción de los genes que están relacionados con la presencia de las trombocitopenias hereditarias (THs) [32]. A menudo las THs presentan manifestaciones clínicas similares y se usan diferentes clasificaciones basadas en:

- Tamaño o volumen plaquetario medio (VPM) [33].
- Defecto genético subyacente [34].
- Patrón de herencia [13].
- Manifestaciones clínicas asociadas (sindrómicas/asindrómicas) [35].
- Alteración fisiopatológica a nivel de la megacariopoyesis y de la estructura plaquetaria (Figura 4) [13].

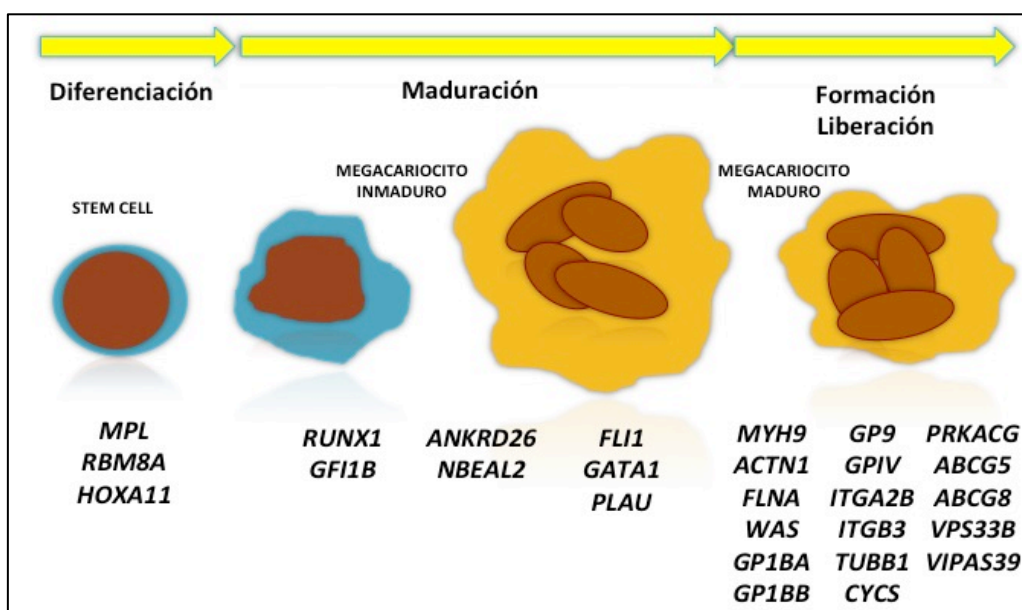


Figura 4. Representación esquemática de los genes responsables de las trombocitopenias hereditarias a nivel de la alteración de la megacariopoyesis: etapas de la producción de plaquetas, desde la diferenciación y maduración de los megacariocitos hasta la liberación de las plaquetas, su estructura y función (adaptado de Pecci et al) [13].

A continuación, se describen de manera esquemática las principales THs en función del mecanismo de acción del gen implicado en su etiopatogenia (Tablas 1-4).

Tabla 1. THs con alteraciones en los genes que codifican los factores de transcripción que intervienen en la megacariopoyesis:

Enfermedad	Cr /Gen (Exones) Proteína	Herencia	Características clínico-biológicas
TH amega. cong. (CAMT)	1p34.2 <i>MPL</i> (12) Receptor de TPO	AR	VPM: N. Trombocitopenia neonatal [36]. Clínica: asindrómica. Hemorragias fatales. Evolución a aplasia medular [37]. Laboratorio: TPO elevado [37]. Tipo1: ausencia de expresión. Tipo2: expresión disfuncional del receptor [38].
TH ausencia de radio (TAR)	1q21.1 <i>RBM8A</i> (6) Subunidad Y14	AR	VPM: N. Trombocitopenia neonatal. Mejora con la edad. Clínica: hemorragias fatales. Síndrómica: malformaciones óseas, renales y cardíacas. Aplasia bilateral radio. Intolerancia a la leche de vaca [39]. 2 SNP (5'UTR e Intrón 1) [40].
TH ameg. cong. Sin. Radio-ulnar (ATRUS)	7p15.2 <i>HOXA11</i> (2) Hoxa11	AR	VPM: N. Trombocitopenia neonatal. Clínica: síndrómica: malformaciones esqueléticas, sordera neurosensorial. Fusión uni/bilateral de la región proximal del radio y el cúbito [41].
EPF/LMA	21q22.12 <i>RUNX1</i> (10) Runx1	AD	VPM: N. Clínica: puede ser síndrómica o asindrómica. Laboratorio: LTA alteración gránulos densos: Síndrome "aspirin-like" [42]. Estado pre-leucémico. Haploinsuficiencia: TH. Efecto dominante negativo: riesgo LMA [43]. Síndrome deleción 21q22: malformaciones neurológicas, faciales, cardíacas, retraso psicomotor [44].
Síndrome Stormorken	11p15.4 <i>STIM1</i> (12) Stim1	AD	VPM: N. Clínica: síndrómica: miosis congénita, migraña, ictiosis, hipocalcemia, miopatía tubular. Asplenia y anemia [45]. Laboratorio: disminución LTA y retracción del coágulo. Disfunción complejo α IIb/ β 3 y alteraciones en el calcio [46].
Síndrome Plaqueta Gris (SPG)	9q34.13 <i>GFI1B</i> (11) Gfi1b	AD	VPM: elevado. Trombocitopenia progresiva. Clínica: esplenomegalia, mielofibrosis [47]. Laboratorio. Frotis: plaqueta gris o fantasma [47]. LTA patológica ADP y Colágeno. ME: disminución gránulos α . Aumento de expresión de CD34 [47].
TH relacionada con <i>CYCS</i> o TCH4	7p15.3 <i>CYCS</i> (3) Citocromo C	AD	VPM: elevado; incrementa la interacción del citocromo C con Apaf-1 favoreciendo la apoptosis [48]. Las mutaciones provocan una ganancia de función y liberación de las pro-plaquetas inmaduras [49].
Síndrome Paris-Trousseau (TCPT) Jacobsen (SJB)	11.q23 <i>FLI1</i> (10) Fli-1	AD	VPM: elevado. Clínica. Síndrómica: malformaciones faciales, cardíacas y neurológicas. Alteración en la maduración. TCPT: trombocitopenia. SJB: más grave y mayor clínica síndrómica asociada [50]. Laboratorio. LTA inespecífica para gránulos α . ME: gránulos α gigantes. [50].
TH relacionada con <i>GATA1</i>	Xp11.23 <i>GATA1</i> (10) GATA-1	Ligada X	VPM: elevado. Clínica: correlación genotipo/fenotipo: Si la mutación afecta a la unión de GATA1-FOG1 da lugar a Anemia diseritropoyética/Talasemia con TH grave; mientras que si afecta a otras regiones va a predominar la trombocitopenia leve [51]. Laboratorio: LTA patológica con Colágeno, Ristocetina y TxA2. ME: descenso gránulos α [52].

Abreviaturas. Cr: cromosoma; TH: trombocitopenia hereditaria; TPO: trombotopoyetina; AR: autosómica recesiva; AD: autosómica dominante; VPM: volumen/tamaño plaquetario medio; N: normal; LTA: light transmission aggregometry; ADP: adenosín difosfato; ameg.: amegacariocítica; cong.: congénita; Sin.: sinostosis; EPF/LMA: Enfermedad plaquetaria familiar con predisposición a leucemia mieloblástica aguda; Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1; SNP: *single nucleotide polymorphism*. El número entre (n) se corresponde al número de exones que tiene cada gen.

Tabla 2. THs con alteraciones en los genes que codifican los receptores de los agonistas plaquetarios:

Enfermedad	Cr / Gen (Exones) Proteína	Herencia	Características clínico-biológicas
Síndrome Bernard Soulier (SBS)	17p13.2 <i>GP1BA</i> (2) 22q11.21 <i>GP1BB</i> (2) 3q21.3 <i>GP9</i> (3)	AR	VPM: elevado. Cada gen codifica una GP del complejo GPIb-IX-V. Consanguinidad. Adolescencia [53]. Laboratorio: LTA patológica a la Ristocetina. CMF detecta la expresión de proteína y el tamaño plaquetario: si se produce la ausencia del complejo da lugar a un SBS clásico; mientras que si la expresión es disfuncional se produce un SBS variante [54]. Las mutaciones <i>missense</i> afectan al dominio rico en leucina y péptido señal [54]. No hay descritas mutaciones en <i>GP5</i> [55].
MacroTH Medit.	<i>GP1BA</i> <i>GP1BB</i>	AD	VPM: elevado. Clínica: asintomática. Laboratorio: disminución leve de GP en la CMF. Variante Bolzano (p.Ala172Val) [56].
Enfermedad de von Willebrand tipo Plaquetario (EVW-TP)	<i>GP1BA</i>	AD	VPM: elevado. Laboratorio: LTA a ristocetina potenciada. El índice FVW:RCo/FVW:Ag está disminuido. Aclaramiento de multímeros [57]. Seis mutaciones <i>missense</i> descritas que afectan a la región "beta-hairpin-loop". Da lugar a un aumento de la afinidad de GPIb α por el FVW [58]. Clave el DD con EVW-2B [59].
Síndrome Velocardio-facial o Di George	Del22q11.2 <i>TBX1</i> (anomalías sindrómicas) <i>GP1BB</i> TH	AD	VPM: elevado. Clínica: síndrome: malformaciones cardíacas, faciales, paladar, alteración aprendizaje, insuficiencia de paratiroides y timo. Alteraciones inmunitarias. Sangrado muy leve [60]. Sólo 10-20% hereditario. Laboratorio: LTA ristocetina patológica [60]. Microdelección intersticial del22q11.2 [61].
TH relacionada con <i>ITGA2B ITGB3</i>	17q21-23 <i>ITGA2B</i> <i>ITGB3</i> Integrinas α Iib/ β 3	AD	VPM: elevado. Las mutaciones (en heterocigosis) afectan a nivel del dominio citoplasmático y extracelular de cada integrina [62]. La ganancia de función del complejo α Iib/ β 3 altera el remodelado del citoesqueleto plaquetario [62]. Si la alteración es en homocigosis da lugar a la Trombastenia de Glanzmann (TG).
Abreviaturas. Cr.: cromosoma; macroTH Medit: macrotrombocitopenia hereditaria mediterránea; AR: autosómica recesiva; AD: autosómica dominante; VPM: volumen/tamaño plaquetario medio; GP: glicoproteína; FVW: factor von Willebrand; RCo: ristocetina; Ag: antígeno; DD: diagnóstico diferencial, EVW: enfermedad de von Willebrand; LTA: light transmission aggregometry. El número entre (n) se corresponde al número de exones que tiene cada gen.			

Tabla 3. THs con alteraciones en los genes relacionados con los gránulos α plaquetarios:

Enfermedad	Cr / Gen (Exones) Proteína	Herencia	Características clínico-biológicas
Síndrome de Quebec	10q22.2 <i>PLAU</i> uPA	AD	VPM: elevado. Duplicación en tándem de una región de 78kb. Clínica: hematuria, sangrado visceral, hemartrosis. Laboratorio: LTA patológica adrenalina. Proteólisis anómala del contenido de los gránulos α [63].
Síndrome Plaqueta Gris	3p21.31 <i>NBEAL2</i> (54)	AR	VPM: elevado. Clínica: mismas características que <i>GFI1B</i> [47]. Laboratorio: no sobreexpresión de CD34 [47]. Proteína codificada: BEACH/ARM/WD40 [64].
Abreviaturas. Cr: cromosoma; AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; VPM: volumen/tamaño plaquetario medio; LTA: light transmission aggregometry; uPA: activador del plasminógeno tipo urocinasa. El número entre (n) se corresponde al número de exones que tiene cada gen.			

Tabla 4. THs con alteraciones en los genes que codifican las proteínas del citoesqueleto:

Enfermedad	Cr / Gen (Exones) Proteína	Herencia	Características clínico-biológicas
Síndrome Wiskott-Aldrich (SWA)	Xp11.22 <i>WAS</i> (12) WASp	Ligada X	VPM: disminuido. Trombocitopenia neonatal. Clínica: sindrómica: infecciones, inmunodeficiencia humoral y celular, eccema y alergia. Linfomas VEB [65]. Tratamiento: terapia génica y HSCT [66]. Correlación genotipo-fenotipo [65,67]: - <i>Nonsense</i> y <i>frameshift</i> : ausencia WASp: SWA clásico. - <i>Missense</i> : descenso WASp: TLX. -Mutación en exones 8 y 9 (dominio unión GTPasa): NLX. Laboratorio: CMF: expresión WASp [65].
TH relacionada con <i>FLNA</i>	Xq28 <i>FLNA</i> (47) Filamina A (FLNa)	Ligada X	VPM: N. Clínica: trombocitopenia aislada [68] o sindrómica asociada a las filaminopatías: grupo heterogéneo de enfermedades con malformaciones neurológicas, cardiovasculares, renales, músculo-esqueléticas (HPN) [69]. Mutaciones de novo: 15% [69]. Mosaicismo [70].
TH ligada al Cr 10 (TCH2)	10p12.1 <i>ANKRD26</i> (34) Ankirina dominio 26	AD	VPM: N. Frecuencia: 10% [71]. Clínica: hemorragia en situaciones de estrés. Riesgo de desarrollar leucemia mieloblástica aguda [71]. Laboratorio: Medulograma: hiperplasia megacariocitos dismórficos. ME: descenso gránulos α [72].
TH relacionada con <i>ACTN1</i>	14q24.1 <i>ACTN1</i> (21) α -actinina 1	AD	VPM: elevado. Familias japonesas y una francesa [73]. Las mutaciones afectan al dominio de unión con la actina y al dominio calmodulina-like alterando el ensamblaje del citoesqueleto y la transducción de señales [74].
TH relacionada con <i>TUBB1</i>	20q13.3 <i>TUBB1</i> (4) β 1-tubulina	AD	VPM elevado. Clínica: asindrómica. Laboratorio: disminución de la expresión de β 1-tubulina en megacariocitos y plaquetas [75]. Dos SNPs (p.Gln43Pro y p.Arg318Trp) [75].
Enfermedades relacionadas con <i>MYH9</i>	22q13.1 <i>MYH9</i> (41) NMM-IIA	AD	VPM: elevado. Puede ser neonatal. Clínica: sangrado leve-moderado [76]. Puede asociar sordera neurosensorial, nefropatía y cataratas preseniles [76]. Laboratorio: Frotis: inclusiones neutrofílicas (cuerpos de Döhle) [77]. Mutaciones de novo: 35% [78]. Correlación genotipo-fenotipo [78]: -Dominio globular : clínica más grave. -Dominio <i>Tail</i> y <i>Helical coil</i> : formas más leves.
TH relacionada con <i>PRKACG</i>	9q21.11 <i>PRKACG</i> (1)	AR	VPM: elevado. Clínica: hemorragia grave [79]. Laboratorio: se altera la subunidad catalítica del AMPc dependiente de PKA, que afecta a la interacción con FLNa y GP1bb desestructurando el citoesqueleto [79, 80]. Única mutación descrita p.Ile74Met [79].
Sitosterolemia (STSL)	2p21 <i>ABCG5</i> (13) <i>ABCG8</i> (13)	AR	VPM: elevado. Clínica: síndrome: xantomas, arteriosclerosis, artritis, esplenomegalia. Sangrado leve-moderado [81]. Depósito patológico de esteroides por alteración del transportador de la proteína ABC hepático e intestinal [82]. Alteración del citoesqueleto y FVW [82]. Laboratorio: datos de hemólisis y estomatocitos [81].

Abreviaturas. Cr: cromosoma; TH: trombocitopenia hereditaria; AR: autosómica recesiva; AD: autosómica dominante; VPM: volumen/tamaño plaquetario medio; N: normal; VEB: virus de Epstein Barr; HSTC: trasplante allogenico; TLX: Trombocitopenia ligada al cromosoma X; NLX: neutropenia ligada al cromosoma X; HPN: Heterotopia periventricular nodular; SNP: *single nucleotide polymorphism*; NMM-IIA: Cadena pesada IIA de la miosina no muscular; AMPc: AMP cíclico; PKA: protein-quinasa A; FVW: factor von Willebrand.
El número entre (n) se corresponde al número de exones que tiene cada gen.

1.1.3. Trombocitopatías Hereditarias

Los trastornos hereditarios de la función plaquetaria o trombocitopatías hereditarias (TFPHs) afectan a la función plaquetaria sin alterar la megacariopoyesis (ausencia de trombocitopenia). Las alteraciones mejor caracterizadas son las relacionadas con la adhesión y agregación [83]. Sin embargo, en los últimos años se han determinado las alteraciones moleculares relacionadas con la señalización, almacenamiento y secreción de gránulos así como de la actividad pro-coagulante [83]. La clínica hemorrágica es variable en cuanto la gravedad, siendo el sangrado mucocutáneo el síntoma más característico. En las formas leves es frecuente el sangrado excesivo tras un procedimiento invasivo o trauma, aunque no hay una clara correlación entre la gravedad clínica y la alteración encontrada en las pruebas de laboratorio, lo que dificulta el diagnóstico [84,85]. Los trastornos graves, como la Trombastenia de Glanzmann (TG), son muy raros. Por el contrario, la prevalencia de los trastornos leves es significativamente mayor (1/10.000), e incluso podría ser infraestimada debido a la complejidad de los procedimientos diagnósticos actuales [85,86]. Por ello es preciso realizar un diagnóstico correcto, lo que posibilitará el mejor manejo terapéutico. En general, estas enfermedades se clasifican según el nivel de actuación de la fase de la agregación plaquetaria donde ocurre el trastorno (Figura 5) (Tablas 5 y 6) [83,87,88].

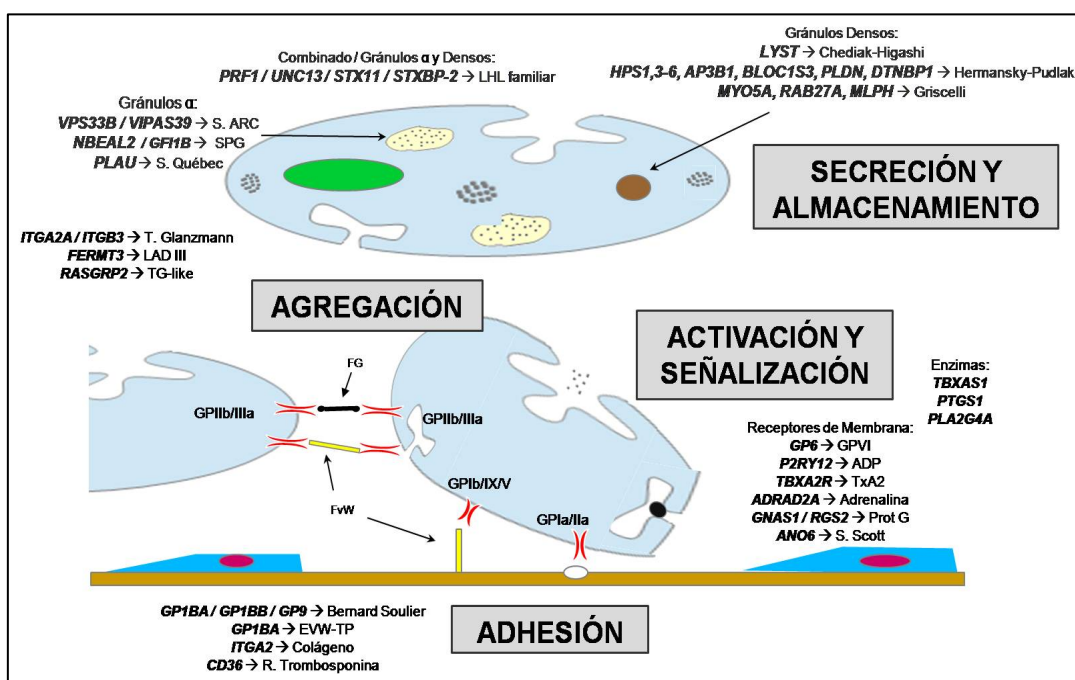


Figura 5. Representación esquemática de las distintas fases de la función plaquetaria, donde se producen los trastornos de las trombocitopatías hereditarias.

Tabla 5. Clasificación de las TPHs con alteraciones en los genes que codifican los receptores de los agonistas plaquetarios, enzimas encargadas de la síntesis de los mismos y proteínas del citoesqueleto y proteínas que intervienen en la transducción de señales:

Receptor (R) Enzima (E)	Cr / Gen (Exones) Proteína	Herencia	Características clínico-biológicas
R. Colágeno	19p13.42 <i>GP6</i> (8) GPVI	AR	Fase: adhesión. Clínica: hemorragia leve/moderada [89]. Suele producirse por causas adquiridas [90]. Laboratorio: LTA patológica para colágeno. CFM: ausencia o defecto de expresión de GPVI. SNPs: riesgo de IAM [91]. No hay mutaciones descritas en <i>ITGA2</i> [92].
R. ADP	3q25.1 <i>P2YR12</i> (3) P2Y12	AR	Fase: activación. Clínica: hemorragia leve/moderada. Suele producirse por causas adquiridas (antiagregantes). Laboratorio: LTA patológica ADP [93]. No hay mutaciones descritas en <i>P2RX1</i> ni <i>P2RY1</i> [94].
R. Tromboxano A2 (TxA2)	19p13.3 <i>TBXA2R</i> (3) R. TxA2	AD / AR	Fase: activación. Clínica: hemorragia leve/moderada. Laboratorio: LTA patológica al AA y TxA2 [95]. Homocigosis/Heterocigosis. p.Arg60Leu / p.Asp304Asn [96].
R. Adrenalina	10q25.2 <i>ADRAD2A</i> (1)	---	Fase: activación. Afecta al receptor α 2-adrenérgico. Clínica: sanos, neonatos, Trombocitemia esencial, Síndrome Québec. Muy infrecuente [97]. Laboratorio: LTA patológica Adrenalina.
Trombastenia Glanzmann (TG)	17q21.31 <i>ITGA2B</i> (30) Integrina α Ib	AR	Fase: agregación, señalización y actividad procoagulante. Clínica: hemorragias moderadas-graves. Laboratorio: LTA patológica a todos los agonistas excepto Ristocetina. Alteración retracción coágulo. CMF: detección de α Ib/ β 3 [98]: - Tipo 1: ausencia total (<5%). - Tipo 2: descenso (20-30%). - Tipo Variante: expresión disfuncional. No diferencias fenotípicas entre ambos genes [99].
	17q21.32 <i>ITGB3</i> (15) Integrina β 3		
Deficiencia (E) TxA2 sintetasa	7q34-q35 <i>TBXAS1</i> (17) TxA2 sintetasa	AR	Fase: señalización. Clínica: hemorragia en situaciones de riesgo. Síndrome Ghosal: incremento densidad ósea [100]. Laboratorio: LTA patológica AA.
Deficiencia (E) PLA2 citosólica	7q34-q35 <i>PLA2G4A</i> (18) PLA2	AR	Fase: señalización. Clínica: puede asociar úlceras intestinales [101]. Laboratorio: LTA patológica ADP y Colágeno. CMF y ME: alteración de los gránulos densos.
Deficiencia (E) COX-1	9q33.2 <i>PTGS1</i> (11) COX-1	AR	Fase: señalización. Laboratorio: LTA patológica AA. Alteración en la síntesis de TxA2 [102].
Deficiencia Proteínas G	1q31.2 <i>RGS2</i> (5) GTPasa	AD	Fase: señalización. Laboratorio: LTA patológica AA. Alteración niveles AMP cíclico y gránulos α por hidrólisis de las proteínas G [103].
	20q13.32 <i>GNAS</i> (13) Subunidad α		Hiperfunción de la proteína. Clínica: incremento riesgo hemorrágico en situaciones de estrés [104]. Síndrome: malformaciones neurológicas, braquidactilia pseudo-hipoparatiroidismo y retraso del crecimiento [105].
TG-like	11q13.1 <i>FERMT3</i> (15) Kindlin-3	AR	Fase: adhesión, activación y señalización. Clínica: síndrome LADIII: infecciones, mala cicatrización, osteopetrosis. Hemorragias más graves que en TG [106].
	11q13.1 <i>RASGRP2</i> (18) CalDAG- GEFI		Fase: adhesión y agregación. Clínica: previamente relacionado con LADIII [107]. Laboratorio: LTA similar a TG. Expresión disfuncional complejo α Ib/ β 3.

Abreviaturas. R.: receptor; E.: enzimas; Cr.: cromosoma; IAM: infarto agudo de miocardio; AR: autosómica recesiva; AD: autosómica dominante; LTA: light transmission aggregometry; AA: ácido araquidónico; GTPasa: guanosina trifosfatasa; ADP: adenosin difosfato; CMF: Citometría de flujo; SNP: single nucleotide polymorphism. TG: Trombastenia Glanzmann. PLA2 citosólica: fosfolipasa A2; COX-1: ciclooxigenasa tipo 1. LADIII: Síndrome *Leukocyte Adhesion Deficiency*. El número entre (n) se corresponde al número de exones que tiene cada gen. (E): enzima.

Tabla 6. Clasificación de las TPHs con alteraciones en los genes que intervienen en el almacenamiento y secreción de gránulos α y densos:

Enfermedad	Cr / Gen (Exones) Proteína	Herencia	Características clínico-biológicas
Síndrome artrogriposis, disfunción renal y colestasis (ARC)	15q26.1 <i>VPS33B</i> (23)	AR	Fase: secreción y gránulos α . Clínica: artrogriposis, insuficiencia renal y colestasis neonatal (ARC). Puede asociar malformaciones músculo-esqueléticas cardíacas y cerebrales, ictiosis, sordera. Puede desarrollar macrotrombocitopenia [108]. Laboratorio: CMF y LTA compatibles con alteración en los gránulos α . ME: ausencia de gránulos α [108].
	14q24.3 <i>VIPAS39</i> (20)		
Síndrome Hermansky-Pudlak (SHP)	9 (genes): <i>HPS1</i> , <i>AP3B1</i> , <i>HPS3-6</i> , <i>DTNBP1</i> , <i>BLOC1S3</i> , <i>BLOC1S6</i> / <i>PLDN</i> Complejo BLOC AP3B1 Cromosomas: 1, 3, 22, 11, 10, 6, 19, 15 y 5.	AR	Características comunes: fase de secreción gránulos densos. Laboratorio: LTA patológica Colágeno, Epinefrina y ADP. CMF: defecto captación mepacrina, serotonina y liberación CD63. ME: ausencia gránulos densos [109]. Clínica: Albinismo óculo-cutáneo y sangrado variable [109]; Complejo BLOC1 (subtipos 7-9): <i>DTNBP1</i> , <i>BLOC1S3</i> y <i>BLOC1S6</i> : infrecuentes y leves. Complejo BLOC2 (subtipos 3, 5 y 6) hemorragia moderada, colitis granulomatosa, no fibrosis pulmonar. (<i>HPS3</i> , <i>HPS5</i> y <i>HPS6</i>). Complejo BLOC3 (subtipos 1 y 4) <i>HPS1</i> y <i>HPS4</i> : mas grave y mutaciones más frecuentes. Asocia fibrosis pulmonar y colitis granulomatosa. <i>AP3B1</i> (subtipo 2): LHL, neutropenia, nistagmus, sangrado leve e inmunodeficiencia.
Síndrome Chediak-Higashi (SCH)	1q41.3 <i>LYST</i> (53) <i>LYST</i> o <i>CHS1</i>	AR	Fase: secreción gránulos densos. Clínica: Albinismo óculocutáneo, sangrado leve, infecciones piógenas, neuropatía e inmunodeficiencia. Transformación a LHL en el 85% de los casos. Laboratorio: Protis: cuerpos de inclusión. LTA patológica ADP, Epinefrina y Colágeno. CMF: defecto captación mepacrina, serotonina y liberación CD63. ME: gránulos lisosomales gigantes. [110]. Correlación genotipo-fenotipo: las mutaciones <i>nonsense</i> y <i>frameshift</i> dan lugar a un cuadro más grave y de inicio precoz en la infancia, mientras que las <i>missense</i> se relacionan con una clínica más leve [110].
Síndrome de Griscelli (SG)	15q21.2 <i>MYO5A</i> (41) <i>MYH12</i>	AR	Fase: secreción gránulos densos. Clínica: albinismo óculo-cutáneo, pelo plateado, alteraciones neurológicas y riesgo de LHL. Laboratorio: LTA patológica Colágeno, Epinefrina y ADP. CMF: defecto captación mepacrina, serotonina y liberación CD63. ME: ausencia gránulos densos [111]. Tipo 1: alteraciones neurológicas. Tipo 2: inmunodeficiencia, diátesis hemorrágica leve. Tipo 3: hipopigmentación.
	15q21.3 <i>RAB27A</i> (6) GTPasa <i>Rab27a</i>		
	2q37.3 <i>MLPH</i> (16) Melanofilina		
LHL familiar	Cr 9 <i>PRF1</i> (3) <i>UNC13D</i> (32) <i>STX11</i> (2) <i>STXBP-2</i> (19)	AR	Fase: defecto combinado de gránulos densos y α . Clínica: fiebre, esplenomegalia, citopenias en el primer año de vida. Laboratorio: aumento ferritina, triglicéridos, descenso fibrinógeno. LTA patológica combinada: Colágeno, Epinefrina y ADP. ME: defecto o ausencia de gránulos α y densos. Niveles IL-2 elevados [112].
Síndrome de Scott	12q12 <i>ANO6</i> (20) Proteína Transmbr.16F	AD / AR	Fase: procoagulante. Menor generación de trombina y formación de fibrina. Laboratorio: CMF: descenso anexina V. Deficiente externalización de fosfatidilserina. Menor activación local de la coagulación [113].

Abreviaturas. VPS33B: Vacuolar protein sorting 33 homologue B; VIPAS39: VPS33B interacting protein; LTA: light transmission aggregometry; ADP: adenosin difosfato; ME: microscopía electrónica; CMF: Citometría de Flujo; BLOC: Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex; LHL: Linfocitosis hemofagocítica, AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante; Pr. Transmbr.: proteína transmembrana.
El número entre (n) se corresponde al número de exones que tiene cada gen.

1.2. Trastornos de la coagulación hereditarios

Los trastornos de la coagulación hereditarios comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades provocadas por el defecto de los factores de la coagulación relacionados con la hemostasia secundaria, fase de contacto, fibrinógeno y fibrinólisis (Tabla 7) [114].

1.2.1. Fisiología de la hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria consiste en la activación secuencial de una serie de proteínas precursoras inactivas (zimógenos) a enzimas activas (“cascada” enzimática) que permite la amplificación de la respuesta para generar la fibrina, componente estructural del coágulo [115]. Se basa en tres fases (Figuras 6-8):

- Fase 1 de iniciación: el daño endotelial provoca la exposición del factor tisular (FT) que se une y activa al Factor VII circulante (FVII). Se forma el complejo FT/VIIa que activa los factores (F) IX y X. El FXa se combina con el FVa (complejo protrombinasa) para producir pequeñas cantidades de trombina (FIIa) que activará el FXI, generando mayor cantidad de trombina (Retroalimentación positiva) (Figura 6) [115].

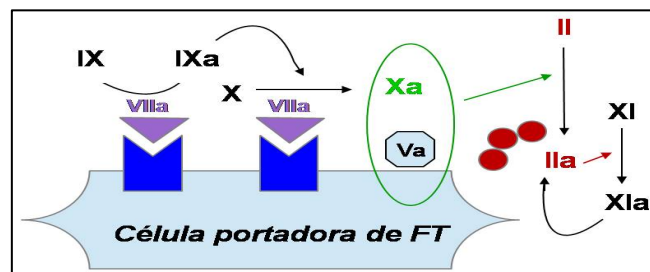


Figura 6. Fase de iniciación. El FT aparece en azul, FVIIa en morado, FIIa o trombina en rojo. El círculo verde muestra el complejo protrombinasa sobre la superficie de la célula que expresa FT.

- Fase 2 de amplificación: la pequeña cantidad de trombina generada en la fase anterior incrementa la activación y la adhesión de las plaquetas al endotelio dañado. Se exponen sus fosfolípidos en la superficie de membrana permitiendo la adherencia de los cofactores de la coagulación y el ensamblaje de los complejos macromoleculares de membrana. Estos complejos potencian la generación de trombina, que activa a los FV, FVIII y FXI [116]. Además, el FV es liberado por los gránulos α de las plaquetas durante la activación de las mismas y es escindido por la trombina para formar el FVa, que es el factor más importante para el ensamblaje del complejo protrombinasa [115]. La trombina libera al FVIII de su

unión con el FvW. El FvW unido al FVIII se une a las plaquetas a través del complejo GP Ib/V/IX haciendo más eficiente la activación del FVIII por la trombina y también participa en la adhesión y agregación plaquetaria en el lugar del daño endotelial (Figura 7).

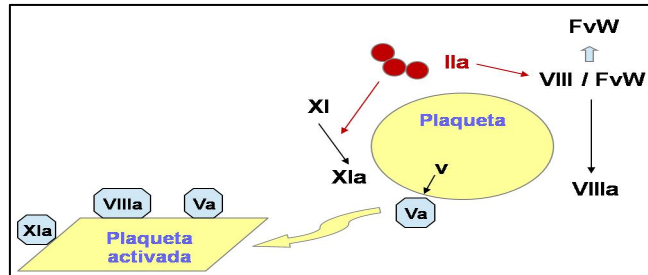


Figura 7. Fase de amplificación: el FIIa separa el complejo FvW/FVIII y activa al FXI, potencia la activación y adhesión de la plaqueta, que expone los fosfolípidos en la membrana para facilitar la unión de los factores de la coagulación y amplificar la activación de la cascada de la coagulación.

- Fase 3 de propagación: el complejo tenasa (FIXa/FVIIIa) genera rápidamente FXa sobre que se une al FVa formando el complejo protrombinasa. Este complejo cataliza, a nivel de la superficie plaquetaria, la conversión de la protrombina en grandes cantidades de trombina (“explosión de trombina”) (Figura 8). La trombina favorece la transformación del fibrinógeno en monómeros de fibrina (fibrina soluble) formando una malla que se estabiliza por el FXIIIa. Además, la trombina generada activará al FXIII y a un inhibidor fibrinolítico (TAFI) que son necesarios para la formación de un coágulo de fibrina resistente a la lisis [117]. La activación del FXIII es promovido por la formación del complejo de trombina, fibrina y el propio factor FXIII.

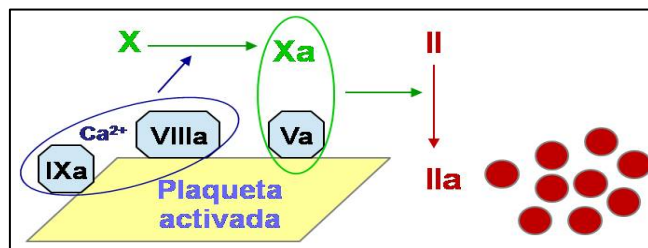


Figura 8. Fase de propagación: el complejo tenasa (FIXa/VIIIa/Ca²⁺) rodeado en azul activa al FX al unirse con el FVa forma el complejo protrombinasa (rodeado en verde) generando grandes cantidades de trombina.

La finalización del proceso y la permeabilización del vaso o fibrinólisis están reguladas por los anticoagulantes naturales como la antitrombina, proteína C activada, proteína S y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). La fibrinólisis consiste en la degradación de la fibrina por la plasmina, derivada de su precursor inactivo o plasminógeno [117].

1.2.2. Clasificación de los trastornos de la coagulación hereditarios

Tabla 7. Trastornos de la coagulación hereditarios y enfermedad de von Willebrand (EVW):

Enfermedad (Proteína)	Cromosoma Gen / Exones	Herencia	Características clínico-biológicas
Trastornos del fibrinógeno (subunidades alfa, beta y gamma)	4q (31.3 y 32.1) <i>FGA</i> (5), <i>FGB</i> (8), <i>FGG</i> (10)	AR / AD	Tipo 1: ausencia o descenso de niveles de fibrinógeno [118]: -Afibrinogenemia: mayor gravedad, menor prevalencia. Sangrado SNC, GI, genitourinario, cordón umbilical. Abortos 1er trimestre. Hemorragia puerperal. Trombosis arteriales y venosas. -Hipofibrinogenemia: asintomáticos o clínica leve. Tipo 2: (Hipo)Disfibrinogenemia: trastorno cualitativo. Clínica impredecible.
Deficiencia FII	11p11.2 / <i>F2</i> (14)	AR	Muy infrecuente. Difícil diagnóstico. Hemorragias fatales [119,120].
Parahemofilia (FV)	1q24.2 / <i>F5</i> (25)	AR	Heterogeneidad clínica. No relación con los niveles de factor. Hemartrosis, sangrado GI y hematomas [120,121].
Deficiencia FVII	13q34 / <i>F7</i> (9)	AR	Los heterocigotos suelen ser asintomáticos. Heterogeneidad clínica. Las mutaciones en el exón 8 que codifica el dominio catalítico son las más frecuentes (<i>hotspot</i>) [122].
Hemofilia A (FVIII)	Xq28 / <i>F8</i> (26)	Ligada X	Hemofilia más frecuente (1/5.000 varones). Niveles FVIII: Leve (5-10%); Moderada (1-5%), Grave (<1%). Clínica característica: hemartrosis y sangrados espontáneos. Correlación fenotipo/genotipo. La IVS-22 es la más recurrente en hemofilia grave (hasta 50%). El genotipo predice el riesgo de desarrollar un inhibidor [123].
Hemofilia B (FIX)	Xq27.1 / <i>F9</i> (8)	Ligada X	Frecuencia: (1/30.000 varones). Niveles FIX: Leve (5-10%); Moderada (1-5%), Grave (<1%). Hemartrosis y sangrados espontáneos. Correlación fenotipo/genotipo [124].
Deficiencia FX	13q34 / <i>F10</i> (8)	AR	Hemorragias graves del cordón umbilical, hematuria y hemartrosis. Depende del nivel plasmático del factor. Descartar amiloidosis [121].
Hemofilia C (FXI)	4q35.2 / <i>F11</i> (15)	AD / AR	Es característico el sangrado postquirúrgico, infrecuente el espontáneo. Incidencia en judíos askenazis es del 8% [125].
Deficiencia FXII	5q35.3 / <i>F12</i> (14)	AR	Asintomáticos. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) alargado [121].
Deficiencia FXIII (Subunidades A y B)	6p25.1 / <i>F13A1</i> (15)	AR	Hemorragia del cordón umbilical (80%). Hemorragia intracanal (25-30%), sangrado de tejidos blandos, hematomas, hemartrosis (20%) y abortos espontáneos recurrentes. Mala cicatrización. Sospechar en paciente con clínica hemorrágica y estudio de coagulación normal [126].
	1q31.3 / <i>F13B</i> (12)		
Deficiencia combinada FV y FVIII	18q21 <i>LMAN1</i> (13)	AR	Consanguinidad. Epistaxis, hematomas, hemorragias postquirúrgicas o postparto y menorragia leves. Pueden ocurrir hemartrosis y hematomas musculares [121].
	2p21 <i>MCFD2</i> (4)		
Deficiencia combinada Factores Vitamina K	2p12 <i>GGCX</i> (15)	AR	Déficit combinado de FII, FVII, FIX y FX. También afecta a las proteínas C, S y Z. Descartar causas adquiridas. Prevalencia desconocida. 30 familias afectas. Casos más graves: periodo neonatal. Asocian malformaciones esqueléticas y del desarrollo (acortamiento de las falanges, osteoporosis y pseudoxantoma elástico) [121].
	16p11.2 <i>VKORC1</i> (13)		
Deficiencia Precalicreína	4q35.2 / <i>KLKB1</i> (15)	AR	TTPa muy prolongado. Asintomáticos [127].
Enfermedad de von Willebrand (EVW) (Tabla 9)	12p13.2 <i>VWF</i> (52)	AD / AR	Tipo 1: más frecuente y leve. No se recomienda estudio genético (influye el grupo sanguíneo, etnia y otros genes). Tipo 2: cualitativo. Alteración en los multímeros. Subtipos: 2A: AD, exón 28 y 52. 2B: AD, exón 28 y trombocitopenia, DD con EVW-TP; pérdida multímeros de gran tamaño. 2N: AR, exones 18-24 y DD con Hemofilia A, no alteración multímeros. 2M: AD, exones 18, 27 y 28. Tipo 3: Cuantitativo, infrecuente y más grave. AR [128].

Abreviaturas. AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante; SNC: sistema nervioso central; GI: gastrointestinal; IVS: inversión intrón; DD: diagnóstico diferencial. EVW-TP: enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario. El número entre (n) se corresponde al número de exones que tiene cada gen.

II. DIAGNÓSTICO DE LAS DIÁTESIS HEMORRÁGICAS HEREDITARIAS

El diagnóstico correcto de los pacientes con DHH se basa en la realización de una historia clínica exhaustiva, el análisis de las pruebas de laboratorio, así como la confirmación de la alteración molecular que provoca dicha patología [1,119]. Siempre se deben descartar causas adquiridas de trombocitopenia, trombocitopatía y alteraciones en la hemostasia secundaria [118,129].

2.1. Diagnóstico de los Trastornos Plaquetarios Hereditarios

2.1.1 *Historia clínica familiar, personal y exploración física*

La historia clínica de sangrado y/o la trombocitopenia, tanto familiar como personal, son esenciales para sospechar una trombocitopatía [86,130] y/o trombocitopenia hereditaria [32]. Algunos signos de alarma que deben hacernos sospechar estas patologías son la presencia de:

- Hemorragias desproporcionadas ante traumatismos o intervenciones quirúrgicas.
- Hemorragias tras caída del cordón umbilical, o en la primera infancia (como tras la circuncisión) o a partir de la adolescencia.
- Aparición de hematomas generalizados e inexplicables.
- Epistaxis de más de 30 minutos que requiera atención hospitalaria o que produzca anemización.
- Meno-metrorragia, sobre todo desde la menarquia.
- Sangrados excesivos en el parto, en la cavidad oral, o tras extracción dental u otros procedimientos invasivos, que requieran la transfusión de concentrados de hematíes o la re-intervención para llevar a cabo la cauterización y hemostasia local.
- Falta de respuesta a tratamientos para la Trombocitopenia Inmune (PTI) [131].

En cuanto a la historia familiar es necesario conocer si existen antecedentes de consanguinidad y de los familiares afectos para establecer el árbol genealógico y por tanto el patrón de herencia.

Algunos de los problemas de la historia clínica hemorrágica son su alta prevalencia en la población sana [132], la variación de la clínica del sangrado con la edad y la aparición de eventos que pueden incrementar el riesgo hemorrágico [133]. Para objetivar la intensidad, frecuencia y gravedad de los trastornos hemorrágicos, la

Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) ha establecido un sistema de puntuación denominado ISTH-BAT (Bleeding Assessment Tools) para facilitar la identificación de este tipo de pacientes [133]. Es un método útil para caracterizar la cronología de eventos hemorrágicos. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido capaz de correlacionar el perfil hemorrágico con las alteraciones en las pruebas de laboratorio [84].

La exploración física permite detectar posibles malformaciones que se asocian a estas patologías [34] (Figura 9).

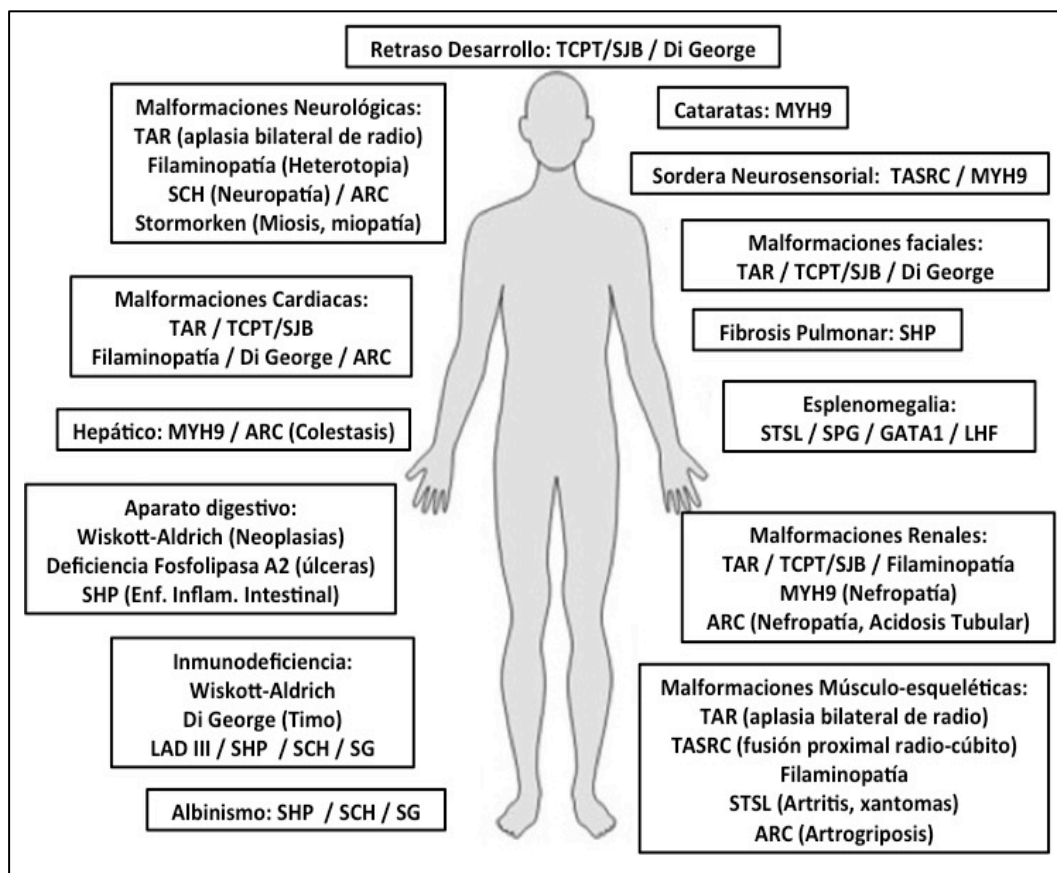


Figura 9. Principales manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos en la exploración física asociadas a los trastornos plaquetarios hereditarios (modificado de Balduini et al) [34].

Las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de los TPHs son [134]:

2.1.2 Pruebas de Screening

- Hemograma: es la primera prueba que se realiza. Permite la identificación de las alteraciones en otras líneas celulares, del volumen plaquetario medio (VPM) que puede discriminar entre trombocitopenias adquiridas y hereditarias [135,136] y el índice de plaquetas inmaduras o reticuladas (IPF) que puede predecir el grado de recuperación plaquetaria [137].

- Frotis de sangre periférica: esencial para objetivar las alteraciones morfológicas características de algunos síndromes (ej. cuerpos de Dhöle en la enfermedad relacionada con *MYH9*) y el VPM (ej, plaquetas gigantes, fantasmas o grises) [34].
- Test de Coagulación: determinación del tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), fibrinógeno, los niveles de los factores de la coagulación y el factor von Willebrand (FVW) [128].
- Tiempo de Hemorragia: es un procedimiento invasivo que determina la duración del sangrado in vivo tras una incisión en el antebrazo [138]. Actualmente en desuso [130] (Tabla 8).
- Analizador de la función plaquetaria o Tiempo de Obturación o PFA100®: se utiliza como *screening* en más del 50% de los laboratorios [134]. Valora automáticamente la adhesión y agregación plaquetaria que es inducida por la velocidad de flujo y la presencia de agonistas como son el Colágeno-ADP y/o Colágeno-Epinefrina [139]. Es un método útil en la población pediátrica y en el *screening* de la EVW [128, 140]. Existen otros autoanalizadores con el mismo fundamento (VerifyNow®, Plateletworks® e IMPACT-R®) [141]. No se recomienda su uso (Tabla 8). [139,142,143].

2.1.3 Pruebas específicas de laboratorio

- Agregometría: es la técnica clásica para el diagnóstico de las alteraciones de la función plaquetaria [143]. Existen varios tipos de agregometría en función del tipo de muestra y de la técnica empleada. La *Light Transmission Aggregometry* (LTA): es el “estándar oro” y consiste en la determinación de la agregación plaquetaria mediante la transmisión de luz a través de un plasma rico en plaquetas (PRP) tras la inducción con agonistas plaquetarios [144]. La ISTH recomienda la utilización de cinco agonistas: Colágeno, ADP, Ácido Araquidónico, Epinefrina y Ristocetina [145]. La segunda línea de agonistas incluye trombina, agonista de PAR1, PAR4, U46619 o agonista estable del receptor del tromboxano (TRAP), péptido relacionado con el colágeno (CRP), acetato de forbol miristato (PMA) y A23287 [143]. Debido a los numerosos inconvenientes que pueden influir en los resultados, la ISTH ha establecido unas recomendaciones para la estandarización de la técnica [145]. Otras técnicas como el Multiplate® (basado en la impedanciometría) y la

lumiagregometría, que permite el estudio de la agregación plaquetaria y la secreción granular, no se recomiendan como técnicas de cribado [141,143,146] (Tabla 8).

- Citometría de Flujo (CMF): analiza las características de tamaño y volumen plaquetario, glicoproteínas de membrana (GP) y gránulos plaquetarios [147]. En el estudio de las GP, en un primer paso, se utilizan anticuerpos contra GPIIb/IIIa (CD41), GPIIIa (CD61), GPIb (CD42b), GPIb/IX (CD42a) y frente a plaquetas activadas GPIIb/IIIa (PAC-1), mientras que en un segundo paso se usan los anticuerpos frente a GPIa/IIa (CD31 y CD49b), GPIV (CD36) y GPVI [143, 148]. En el estudio de los gránulos densos y α se determina la expresión de CD63 (tras la estimulación con ADP o TRAP6) y CD62P (P-selectina), respectivamente [143, 148]. Otras determinaciones que se recomiendan son la detección de la anexina V y la externalización de la fosfatidilserina, el estado conformacional del complejo α IIB/ β 3 (tras la activación con ADP y con PMA) y las alteraciones del receptor P2Y₁₂ (añadiendo un fosfoproteína estimulante vasodilatadora o VASP) [141, 149]. Las ventajas e inconvenientes se especifican en la Tabla 8.
- Microscopía Electrónica (ME): es la prueba recomendada para el estudio morfológico y estructural de los gránulos α y densos, así como para el estudio de las alteraciones bioquímicas plaquetarias [146,150]. Sin embargo, sólo se utiliza como estudio específico de las alteraciones en los gránulos (Tabla 8) [143].
- Ensayos bioquímicos: utilizados para el estudio de los gránulos plaquetarios (mediante la detección de serotonina o 5-HT) así como para objetivar alteraciones en el tromboxano (determinación sérica de Tx_{B2}) [141]. Se utilizan varias técnicas como la detección de Mepacrina por CMF, HPLC y ELISA que permiten la detección de los componentes de los gránulos α (PF4 y beta-tromboglobulina), del metabolismo del ácido araquidónico y de la liberación de Tx_{A2} [146]. Se recomienda el estudio con ME para confirmar las alteraciones detectadas por los ensayos bioquímicos [150].
- Isótopos radioactivos: consiste en el marcaje de los gránulos densos con un isótopo radiactivo (¹⁴Serotonina) [151].
- Tromboelastografía (TEG): es una técnica muy específica para objetivar la formación dinámica y la calidad del trombo. Hasta el momento se emplea en la predicción del sangrado operatorio y del tratamiento con factores de la coagulación

[141]. Existe poca experiencia de uso en los trastornos plaquetarios hereditarios [152].

- Estudios moleculares: son la única prueba de laboratorio específica y que permite la confirmación diagnóstica de los trastornos de base genética conocida [2,153,154].

La técnica clásica es la secuenciación del gen candidato mediante secuenciación convencional (Sanger). Para llevar a cabo la identificación de una mutación responsable es necesario seleccionar el gen candidato que se va a secuenciar. Para ello, la historia clínica y las pruebas de laboratorio específicas orientan hacia un fenotipo clínico-biológico del paciente concordante con un trastorno hemorrágico hereditario. Por tanto, la secuenciación va dirigida al gen candidato probable tras la identificación del fenotipo específico [85].

La secuenciación convencional ha permitido alcanzar hitos tan relevantes para la Genética Humana como la secuenciación del primer genoma humano en el año 2001 o la caracterización del primer haplotipo humano por el consorcio *HapMap* [155,156]. Esta técnica detecta variantes genéticas de pequeño tamaño, realizando de 96 a 384 reacciones en paralelo, lo que conlleva un incremento en el tiempo y repercute en el incremento del precio por base secuenciada [157].

Además, los mapas genéticos mediante el análisis de ligamiento (*linkage analysis*) y la utilización de marcadores microsatélites en familias consanguíneas, detectan la relación lineal entre genes localizados en un mismo cromosoma para estudiar la segregación de un carácter. Sin embargo, estas técnicas no permiten la detección de nuevas variantes patogénicas. Los estudios de asociación genómica (*Genome-Wide Association Studies* o GWAS) son capaces de identificar la localización cromosómica de genes potencialmente candidatos, en aquellas familias con numerosos miembros afectados [153,158,159]. Estas técnicas se centran en el análisis de pequeños grupos de genes que son seleccionados previamente sobre la base de una historia clínica y pruebas funcionales [85].

En la última década se han desarrollado plataformas de secuenciación masiva o secuenciación de última generación o de alto rendimiento o *Next-Generation Sequencing* (NGS) que posibilitaron la secuenciación de un genoma por 1.000\$ [160].

El proyecto *1000 Genomes* fue pionero en emplear esta tecnología, determinado la localización y frecuencias alélicas de más de 15 millones de *Single Nucleotide Variants* (SNVs), un millón de inserciones y deleciones y 20.000 variantes estructurales [161].

Tabla 8. Principales características de los métodos clásicos de diagnóstico de trastornos hereditarios de la hemostasia primaria, la frecuencia de uso y su indicación actual:

Técnica (Frec)	Valoración	Ventajas	Inconvenientes	Indicación
Tiempo hemorragia (28%)	Global	Hemostasia fisiológica	Invasiva. Poco reproducible. Escasa S y E.	No
PFA100® (53%)	Formación tapón plaquetario	Simple, rápido, útil en pediatría. Defectos graves y cribado de la EVW.	Requiere la repetición del estudio. Poca S y E para los trastornos leves/moderados. Influenciable (plaquetas y Htco).	No se recomienda
LTA (60%)	Adhesión Activación Agregación Gránulos	PRP. Patrón de onda. Información dinámica. Elevada S y E. “Gold standar”.	Caro, laborioso, complejo. Gran volumen de muestra. Poco reproducible.	Screening y Diagnóstico específico
Multiplate (12%)	Activación Agregación	Impedancia. Sangre total. Antiagregantes.	Menos sensible. Falta de estudios en trastornos plaquetarios hereditarios.	No
LumiLTA (21%)	Agregación Secreción	PRP o sangre total. Estudio combinado.	No diferencia los problemas intrínsecos de la secreción.	No se recomienda
CMF (24%)	Agregación Secreción Pro-coagulante	Escasa muestra. Gran S y E. Múltiples aplicaciones.	Procesamiento caro, laborioso, complejo. Variabilidad.	Screening y Diagnóstico específico
ME (4%)	Secreción	Morfología plaquetaria gránulos. Gran S y E.	Procesamiento caro, laborioso, complejo. Variabilidad	Diagnóstico específico
R. coágulo (10%)	Agregación	TG y Stormorken.	Variabilidad.	No se recomienda
ELISA HPLC Mepacrina (5%)	Secreción	Gran S y E para el estudio de secreción.	Variabilidad. Centros y equipamiento especializados, caros y complejos. Requiere confirmación por ME.	Diagnóstico específico
Isótopos (1%)	Secreción	Gran S y E. Estudio secreción.	Centros acreditados. Radioactividad.	No
TEG (3%)	Pro-coagulante	Velocidad y calidad en la formación del trombo.	Poca experiencia.	No
Análisis molecular	Genética	Hot-Spot. Familiares. Diagnostico correcto. Consejo genético.	Fenotipo inespecífico. Múltiples exones. Heterogeneidad molecular.	Diagnóstico Final

Abreviaturas. LTA: light transmission aggregometry; CMF; Citometría de flujo; Htco: hematocrito; R: retracción; LumiLTA: lumiagregometría; ME: microscopía electrónica; ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*; HPLC: *High Performance liquid chromatography*; TEG: tromboelastografía; PRP: plasma rico en plaquetas; S: sensibilidad; E: especificidad.
Entre paréntesis se muestra la frecuencia con que se realiza el estudio en los laboratorios a nivel mundial [134].

2.1.4 Algoritmo diagnóstico actual y nuevas técnicas diagnósticas

El diagnóstico de estas enfermedades se basa en las recomendaciones actuales de la ISTH que consiste en la utilización de un algoritmo de tres pasos (Figura 10) [143]. De acuerdo con esta directriz, la primera proyección debe incluir una frotis de sangre periférica, LTA (utilizando un número limitado de agonistas), el análisis de las principales glicoproteínas de la superficie plaquetaria por CMF y la evaluación de la

liberación de gránulos de las plaquetas. Estas pruebas están disponibles actualmente en la mayoría de los laboratorios de todo el mundo [134]. El segundo escalón debe incluir un panel con un mayor número de agonistas para realizar LTA y CMF con anticuerpos adicionales, la retracción del coágulo, la medición de tromboxano en suero y la microscopía electrónica. Sin embargo, estas técnicas sólo están disponibles en laboratorios especializados [134]. El último paso debe incluir los estudios bioquímicos como los ensayos de unión al receptor y los estudios de genética molecular. Hasta la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (NGS), la caracterización molecular de estos trastornos se consigue en menos del 50% de los casos [85,148,162].

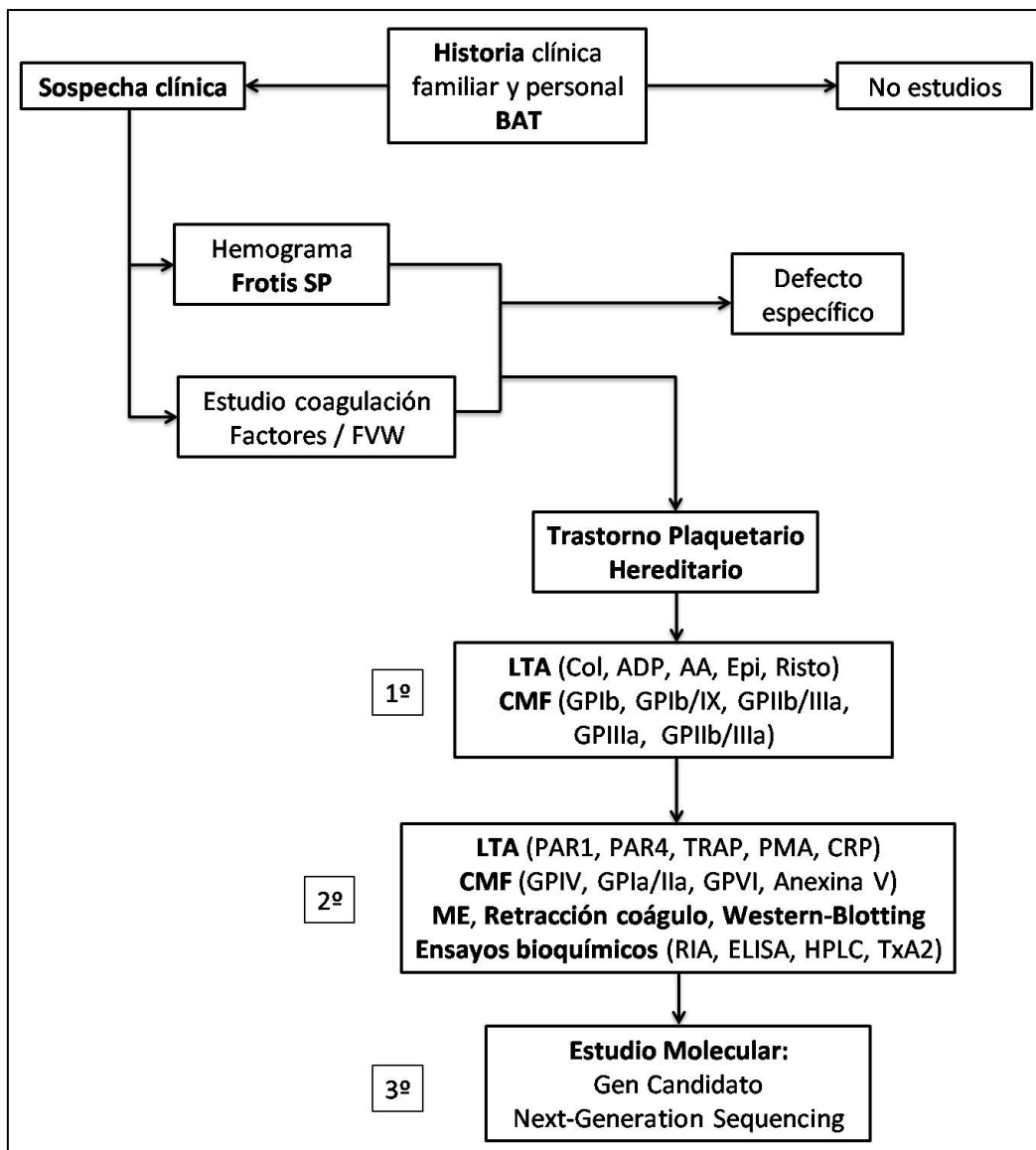


Figura 10. Algoritmo diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios, según las recomendaciones de la ISTH (modificado de Gresele et al) [143].

Actualmente, existen nuevas técnicas diagnósticas para el estudio funcional de estos trastornos que pretenden mejorar el rendimiento diagnóstico de estas patologías [88]:

Se ha desarrollado una prueba específica para detectar las alteraciones en el receptor P2Y₁₂ del ADP (INNOVANCE® PFA 2Y*) [163]. Así mismo, el método de alto rendimiento *Optical Multichannel* (Optimul®), basado en PRP y LTA, disminuye la necesidad de grandes volúmenes de muestra al emplear una plataforma para 96 muestras y reactivos liofilizados. Emplea siete agonistas (añade PAR-1 y U46619, a los recomendados por la ISTH) y ha demostrado una gran sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo para trastornos leves comparado con la LTA tradicional [164].

También, se han desarrollado métodos de fijación para facilitar el diagnóstico por CMF. Así, el fijador *AggFix* estabiliza la muestra durante nueve días, una vez añadidos los agonistas (ADP, AA, colágeno y PAR1); mediante la CMF se comprueba el descenso en el conteo de las plaquetas (*Single platelet counting* modificado) [88]. Otro fijador que también estabiliza la muestra durante nueve días es el PAMFix; permite la realización de una agregometría diferida (*Remote platelet function*) y valora principalmente los gránulos densos y los gránulos α . Sin embargo, no se considera útil para el diagnóstico por el limitado número de agonistas que emplea, aunque sí que podría utilizarse en el cribado previo a la realización de la LTA [165].

Una técnica muy compleja es el doble marcaje con dos anticuerpos específicos de los agregados de plaquetas, que sólo se ha utilizado en la TG [149]. Otra técnica de CMF para detectar específicamente la fosfatidilserina (Síndrome de Scott) es la unión de lactadherina, que no requiere el uso de plaquetas lavadas [88].

2.2. Diagnóstico de los Trastornos de la Coagulación Hereditarios

En los trastornos de la coagulación hereditarios, al igual que en los TPHs, la historia clínica y familiar de sangrado patológico, así como la exploración física, son esenciales para establecer la sospecha diagnóstica. De la misma forma, se deben llevar a cabo las pruebas de laboratorio de cribado como son un hemograma y un test básico de coagulación en el que se determine el TP, TTPa y el fibrinógeno. Si los tiempos de coagulación se ven afectados, una de las primeras consideraciones a tener en cuenta es la valoración de que las condiciones pre-analíticas (correcto llenado, concentración de

anticoagulante, muestra hemolizada, contaminada con heparina, fármacos anticoagulantes) se ajustan al resultado de la prueba [166].

El test de mezclas es una prueba sencilla que diferencia una deficiencia de factores de un posible inhibidor. Consiste en combinar el plasma del paciente con un plasma normal. En caso de que exista un déficit de un factor de la coagulación, el nuevo estudio, tras la adición del plasma normal, se corregirá, mientras que si la alteración persiste, estaremos ante un inhibidor [167].

Tras confirmar que estamos ante una deficiencia de factor, se analizan de forma selectiva los factores que pueden estar alterados en función de la prolongación del estudio básico de coagulación. Podemos encontrar varios escenarios [168]:

- Prolongación aislada de TTPa. Indica una anormalidad de la vía intrínseca: deficiencia de precalicreína, quinínógeno de alto peso molecular (HMWK), FVIII, FVW, FIX, FXI y/o FXII.
- Prolongación aislada de TP. Indica una anormalidad de la vía extrínseca: FVII, FII, FV y FX (FX) o déficit combinado de factores vitamina K dependientes (FII, FVII, FIX y FX).
- Prolongación de ambos TTPa y TP. Indica una anormalidad de la vía final común, que consiste en FV, FX, FII, y fibrinógeno. También se puede observar en el déficit combinado de factores como FV/FVIII y en los factores vitamina K dependientes.
- En casos con clínica de sangrado y tiempos normales de la coagulación, se puede determinar el FXIII [169].

La determinación del factor específico de la coagulación que se sospeche, se lleva a cabo según las recomendaciones actuales [170]. En la mayoría de los casos, la determinación de la actividad (Ac) del factor específico es suficiente para valorar el déficit (cuantitativo), sin embargo, en los trastornos del fibrinógeno, de la protrombina (FII) y la enfermedad de von Willebrand, es necesario medir los niveles de antígeno (Ag) para poder identificar una alteración cualitativa [170].

En la actualidad, las pruebas que evalúan la capacidad hemostática global como el test de generación de trombina (TGT) y la tromboelastografía (TEG) puede proporcionar una evaluación más precisa y “in vivo” de la hemostasia y de la respuesta

a los tratamientos [169]. De momento, es necesaria su estandarización antes de su uso clínico generalizado [169].

En cuanto al estudio del FVW, se siguen las recomendaciones de la *British Committee for Standards in Haematology* (BSCH) (Figura 11) [171]. Se puede realizar un *screening* con el PFA100® (Tabla 8) y aplicar las siguientes pruebas específicas para clasificar los diferentes tipos de EVW (Tabla 9): actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCo), FVW antigénico (FVW:Ag), FVIII coagulante (FVIII:C), aglutinación de PRP con ristocetina (RIPA). Además, se pueden incluir la capacidad de unión del FVW al colágeno y al FVIII (FVW:CB y FVW:VIII). En los laboratorios de referencia se lleva a cabo el análisis de los multímeros del FVW por electroforesis y permite el diagnóstico con certeza de los diferentes tipos de la enfermedad [171].

Tabla 9. Principales características clínico-biológicas de la EVW:

Prueba	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2M	Tipo 2N	Tipo 3
FVIII:C (U/dL)	Variable	Bajo	Normal Bajo	Normal Bajo	Bajo	Muy Bajo
FVW:Ag	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Normal Bajo	Muy Bajo
FVW:RCo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Normal Bajo	Bajo
Ratio FVW RCo/Ag	>0,6	<0,6	<0,6	<0,6	>0,6	No Valorable
RIPA	Normal Bajo	Bajo	Alto	Normal Bajo	Normal	Ausente
Multímeros	Normal	Ausentes o disminuidos	Ausentes o disminuidos	Presentes	Presentes	Ausentes
Frecuencia	75-80%	10-15%	<5%	<1%	<1%	1-5 x 10 ⁶
Deficiencia	Cuantitativa	Cualitativa	Cualitativa	Cualitativa	Cualitativa	Cuantitativa
Herencia	AD	AD	AD	AD	AR	AR
Mutaciones frecuentes	<i>missense</i>	<i>missense</i>	<i>missense</i>	<i>missense</i>	<i>missense</i>	<i>frameshift</i>
Domínios afectados	Variable	D2, D3, A1, A2, C	A1	A1	D' y D3	Variable

Abreviaturas. FVW: factor von Willebrand; FVW:Ag: antigénico; FVW:RCo: actividad; RIPA: agregación plaquetaria inducida por Ristocetina; AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante.

El diagnóstico molecular se realiza mediante secuenciación convencional del gen candidato, relacionado con la deficiencia del factor, que confirma el diagnóstico final. Estos datos amplían el conocimiento y el el espectro mutacional (Tabla 7), con las mismas consideraciones referidas a los TPHs. En los pacientes con hemofilia A grave se analiza la inversión del intrón 22 (IVS-22) y del intrón 1 (IVS-1) y en aquellos casos negativos, así como en los casos con hemofilia A leve moderada, y los pacientes con hemofilia B se analizan por secuenciación directa [172]. La caracterización molecular de los trastornos de la coagulación muestra que las mutaciones missense son las más frecuentes, lo que representa del 50% al 80% de las mutaciones identificadas. En la EVW, el diagnóstico molecular, mediante NGS puede ser de gran utilidad en la correcta caracterización fenotípica y genotípica en este trastorno [173].

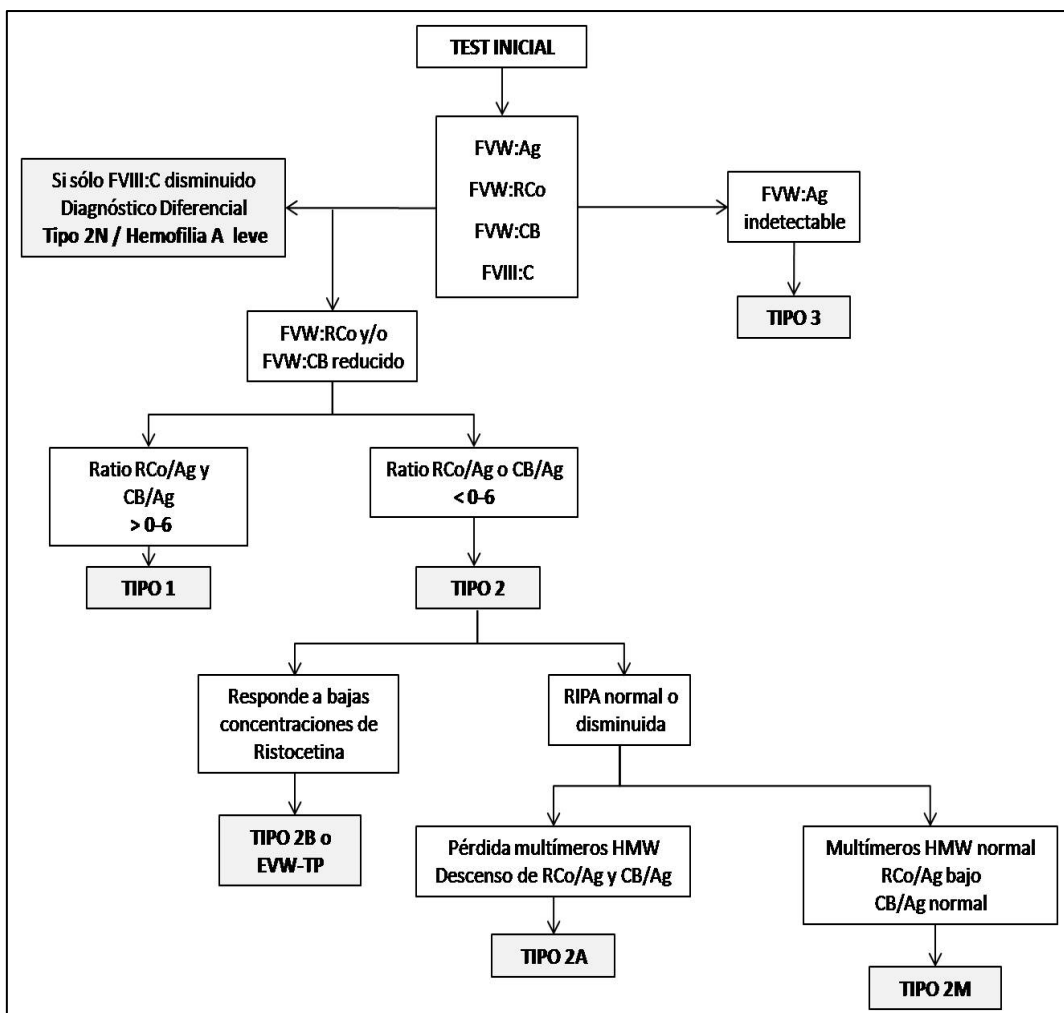


Figura 11. Algoritmo diagnóstico con las pruebas de laboratorio de la EVW (modificado de Laffan MA et al) [171].

III. APLICACIONES DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA

Desde el año 2005, existe un gran avance en las técnicas moleculares. El desarrollo de la secuenciación masiva de alto rendimiento (NGS) permite la secuenciación en paralelo de múltiples fragmentos de ADN que, a diferencia de otras técnicas de secuenciación, generan una gran cantidad de datos en un tiempo más reducido y a un coste menor y constituyen una alternativa eficaz en el diagnóstico molecular [174,175]. Además, tiene la capacidad de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones (InDels), y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones) [176].

De manera general, todas las plataformas de NGS comparten las siguientes características:

- Se genera una librería donde el ADN se fragmenta al azar y se unen adaptadores específicos (index) para identificar cada muestra, posteriormente se purifican los segmentos a partir de los que se secuencian.
- La amplificación de la librería (mediante PCR) se produce tras el anclaje del fragmento de ADN, a través de sus adaptadores, a una superficie sólida como son las microesferas o directamente a la placa de secuenciación [177]. Esos fragmentos se agrupan juntos (*Clusters*) para su posterior secuenciación.
- La secuenciación y la detección de las bases ocurren al mismo tiempo en todas las moléculas de ADN (secuenciación masiva y paralela).
- Las lecturas generadas (*reads*) son cortas y apareadas. Existen dos tipos: “*mate-pairs*” de > 600 pares de bases (pb) (a partir de fragmentos conocidos de ADN) o “*paired-end*” de < 300 pb (de los cuales se secuencia el final de ambos extremos). Un aspecto importante es la denominada profundidad de lectura (*coverage*), que es el número de veces que cada base del genoma está presente en las lecturas. Es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma [178].
- El análisis computacional es esencial. Los datos de la secuencia generada se alinean frente a una secuencia de referencia, que es el genoma de referencia humano (GRCh37/HG19), elaborado por el Centro Nacional para la Innovación Biotecnológica (NCBI) [179]. Este paso es esencial, debido a que la calidad del

alineamiento y del ensamblaje respecto a la referencia evita tanto falsos positivos (secuencias alineadas incorrectamente) o falsos negativos (secuencias no alineadas).

- Debido a la gran cantidad de datos generados se requieren algoritmos probabilísticos bioinformáticos (Picard, GATK) para filtrar las variantes [180] y programas de anotación [181]. Estos algoritmos emplean modelos bayesianos calculando la probabilidad condicional de los nucleótidos en cada posición en función de variables como el número de lecturas y la calidad en la asignación de la base, entre otros parámetros [182].
- Las variantes seleccionadas se filtran y se comparan con diferentes bases de datos (*Minor allele frequency* < 1% y *Exome Variant Server*) (NHLB) y los resultados obtenidos se visualizan con determinadas herramientas como *Integrative Genomics Browser (IGV)* [183] y se confirman mediante Sanger [184].

Cada plataforma de NGS se basa en principios químicos distintos que generan diferencias cualitativas y cuantitativas. Recientemente han aparecido versiones de equipos de NGS con características más limitadas en cuanto a su rendimiento y capacidad de secuenciación, pero con mayor facilidad de manejo como por ejemplo *MiSeq Personal Sequencer* de Illumina.

Existen una serie de consideraciones para determinar las indicaciones de esta nueva tecnología para el diagnóstico de enfermedades genéticas [185]:

- Heterogeneidad genética: varios o múltiples genes son responsables de un fenotipo similar (ocurre en la mayoría de enfermedades genéticas con herencia mendeliana).
- Heterogeneidad clínica: en el contexto de las enfermedades hereditarias, múltiples genes pueden dar una sintomatología similar o formar parte de un síndrome con diferente presentación (ej: miocardiopatía, cataratas congénitas) [186,187].
- El estudio de los genes candidatos ha sido negativo, por lo que otros genes desconocidos o no identificados pueden ser los determinantes patogénicos.
- El estudio del genoma puede ser más coste-eficiente que el análisis consecutivo de los genes candidatos.

Esta tecnología ofrece múltiples aplicaciones como la secuenciación del transcriptoma completo (RNA-Seq), identificación de microRNAs, estudios de interacción proteína-DNA (ChIP-seq) o estudios de metilación entre otros [188-191].

Las tres aplicaciones principales y de mayor interés científico son las siguientes [192]:

- Paneles de Genes: en ellos se secuencian un subconjunto limitado de genes (en torno a 10-100 genes) que constituyen una porción del genoma conocida. Las lecturas generadas se alinean respecto a un genoma de referencia conocido [193]. Se utiliza cuando existen múltiples genes candidatos conocidos que pueden producir una determinada enfermedad. Las principales ventajas son su capacidad de optimización, ya que disminuye los riesgos de hallazgos de significado incierto, así como el coste, la facilidad en el manejo de datos y la interpretación de los resultados. Sin embargo, dado que es un diseño fijo será necesario actualizar e introducir nuevos genes identificados [194].
- Secuenciación del exoma (*Exome Sequencing*): consiste en secuenciar las regiones codificantes del genoma, lo que implica el 1,5-2% de todo el genoma (es decir, alrededor de 30 megabases) [195]. Es un procedimiento útil ya que en el 85% de las situaciones las mutaciones causantes de enfermedad se localizan en los exones. Sus principales ventajas son que no requiere ser actualizada, puede ser reinterpretada y los resultados que revela pueden no guardar relación con el fenotipo clínico estándar asociado a la enfermedad [196]. Sus principales inconvenientes son el coste, que aporta mayor información (lo que dificulta su análisis y por tanto la fiabilidad diagnóstica) y que las regiones ricas en contenido de guanina-citosina no están bien cubiertas. En los casos en los que no se detectase ninguna mutación, se podría aplicar la secuenciación del genoma completo [185,197].
- Secuenciación del genoma completo (*Whole Genome Sequencing*): consiste en secuenciar 3,3 gigabases de toda la información genética. Aporta mayor información sobre secuencias no reguladoras, intrones o regiones no codificantes del ADN y lugares flanqueantes [198]. Tiene una gran sensibilidad y potencia para detectar variaciones estructurales como inserciones, deleciones y translocaciones. Sin embargo, es un proceso costoso por la complejidad del análisis. Debido a la gran cantidad de información que genera y la dificultad de la interpretación no se recomienda como herramienta diagnóstica [199].

Una de las limitaciones de la NGS es la interpretación de los resultados, principalmente a la hora de identificar una mutación nueva como causante de una determinada enfermedad [200]. Para ello se requiere el uso de guías clínicas, la

comparación con las bases de datos (ClinVar, ClinGen o Genome Connect, etc.), las simulaciones *in silico* y los programas bioinformáticos que ayudan establecer que una mutación sea patogénica [201].

En el contexto actual, gracias al avance en el conocimiento genético-molecular y al desarrollo de la tecnología de NGS de alto rendimiento, parece razonable el empleo de estas herramientas para el diagnóstico de enfermedades con elevada heterogeneidad genética.

Si a ello añadimos que ya se encuentran los primeros datos, en algunas publicaciones, sobre la utilización de la NGS, tanto, en los trastornos plaquetarios hereditarios, como en la Hemofilia A y en la EVW [172,173,202], consideramos aplicable, si no necesaria, la utilización de paneles de genes en el diagnóstico molecular de las DHH de forma rutinaria.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IV. HIPÓTESIS

Las diátesis hemorrágicas hereditarias (DHH) constituyen un grupo amplio y heterogéneo de trastornos hereditarios y/o congénitos poco frecuentes, relacionados con la alteración en la hemostasia primaria y en la hemostasia secundaria. Como consecuencia, el paciente experimenta episodios de sangrado con distintos grados de gravedad. No es infrecuente encontrar pacientes con estas características en la práctica clínica habitual. La gran heterogeneidad de las DHH, principalmente en los trastornos plaquetarios hereditarios, proviene de que las alteraciones en diferentes genes pueden producir un fenotipo clínico similar para cada una de ellas. Para su correcto diagnóstico es preciso, en la actualidad, combinar varias metodologías, lo que requiere un esfuerzo considerable, en tiempo y en dinero. A pesar de ello, en bastantes ocasiones no se llega a un diagnóstico de certeza.

Cuando los síntomas de sangrado hacen sospechar la existencia de una DHH (especialmente en niños, pero también en adultos en los que la patología no se haya manifestado en la infancia), se aplica un algoritmo que consiste en la caracterización clínica, fenotípica y funcional o del laboratorio del paciente [143,203]. Todos estos estudios son necesarios para poder dirigir el análisis molecular a un gen candidato y, así, poder confirmar el diagnóstico.

Esta estrategia supone un reto diagnóstico debido a que, en bastantes ocasiones, el diagnóstico de estas enfermedades es difícil, sobre todo en los casos con fenotipos hemorrágicos leves o fenotipos indeterminados. La falta de acuerdo en su clasificación, la presencia de fenotipos clínicos-biológicos coincidentes, la ausencia de estandarización, la gran heterogeneidad clínica y molecular y la complejidad en las herramientas diagnósticas incorporables a la rutina diaria son las principales limitaciones para la detección de estos trastornos. Para su diagnóstico se requiere una gran cantidad de pruebas, una validación interna e interlaboratorial y la repetición del estudio para que desaparezcan posibles factores intercurrentes adquiridos. Esta heterogeneidad fenotípica dificulta la identificación del gen candidato y, por tanto, el diagnóstico molecular. Por ello, sólo es factible identificar el gen afectado en el 40-50% de los trastornos plaquetarios hereditarios [85,148]. Además, en muchas ocasiones, el fenotipo clínico no es claro, lo que dificulta la búsqueda de mutaciones en un gen candidato. Incluso en aquellos casos con un gen candidato bien definido, como ocurre

principalmente en los trastornos de la hemostasia secundaria, o en casos como en la hemofilia A, una vez descartada las mutaciones recurrentes (inversión del intrón 22 o IVS-22), la secuenciación de un gran número de exones supone otra dificultad en tiempo y coste, por lo que sería un método inapropiado para la rutina clínica diaria [175].

La carencia de métodos diagnósticos sencillos e incorporables a la rutina diaria, motiva que, en ocasiones, al clínico le resulte complicado, a veces imposible, emitir un diagnóstico certero. En consecuencia, existe el riesgo de la prescripción de tratamientos inapropiados que no solucionarán el problema, por lo que el paciente no mejorará y podrá tener efectos secundarios no deseados. Además, se multiplicarán los gastos inherentes a su tratamiento y a la identificación de la anomalía causante del trastorno, al tener que emplear métodos gravosos complejos desde el punto de vista clínico y dilatados en el tiempo.

Hasta hace poco tiempo, la búsqueda de información genética a gran escala aplicada al diagnóstico clínico era, desde el punto de vista técnico, compleja, y, desde el económico, poco viable. Sin embargo, en la actualidad se dispone de un nuevo conjunto de métodos de alto rendimiento denominados secuenciación masiva o *Next-Generation Sequencing* (NGS), que son herramientas valiosas tanto para la investigación como para la evaluación de trastornos clínicos causados por mutaciones genéticas. Estas plataformas de alto rendimiento, en sus distintas modalidades como paneles amplios de genes (*targeted genes panel* o paneles de genes customizados), exoma completo (*Whole-Exome Sequencing*) o incluso en todo el genoma (*Whole-Genome Sequencing*) tienen la capacidad de secuenciar gran cantidad de información genética de manera paralela, simultánea y de forma precisa para identificar las mutaciones causantes de las enfermedades de base genética [197]. Esta tecnología ha evolucionado rápidamente durante la última década hasta el punto de constituir hoy una alternativa atractiva, tanto a nivel práctico como económico, con la que abordar el diagnóstico de patologías con alta complejidad [204].

De este modo, en el momento actual, es razonable plantearse el uso de la NGS tanto para explorar cambios en todos los genes que con alta probabilidad pueden causar un fenotipo clínico y de laboratorio concreto, como para buscar la causa no conocida de patologías plaquetarias de fenotipo inespecífico que son, por otra parte, las más comunes y difícilmente abordables. Además, como bien es conocido, si los

fenotipos de estas entidades pueden solaparse, es lógico pensar que el diseño de un panel de genes que incluya a todos aquellos genes conocidos que se relacionan con cualquiera de la totalidad de las DHH descritas hasta el momento podría contribuir a un mejor diagnóstico de estas enfermedades. Incluso, a igualdad de tiempo y coste, estas plataformas pueden rastrear mutaciones en muchos más genes que la secuenciación clásica de Sanger.

Por lo tanto, la secuenciación masiva parece una herramienta idónea para avanzar en el diagnóstico de estas enfermedades. Por ello, hemos planteado el análisis simultáneo de un gran número de genes y exones mediante dos tipos de paneles, uno encaminado a los trastornos de la hemostasia primaria y otro, a la secundaria. Como veremos más adelante, hemos empleado la captura de secuencia que es idónea para secuenciar alteraciones genéticas hereditarias que ocurren en el 50-100% de las células, de manera precisa y asequible económicamente.

De hecho, existen precedentes que demuestran cómo la tecnología NGS no sólo es capaz de identificar mutaciones ya descritas con alta eficiencia, sino que también ha logrado encontrar nuevas mutaciones responsables de los síntomas observados en el diagnóstico de las DHH, pretendiendo su incorporación al algoritmo diagnóstico de la ISTH [143,172,173,205].

Como conclusión de lo expuesto, proponemos como hipótesis de trabajo que la NGS permitirá la búsqueda sistemática de mutaciones incluidas en un extenso panel de genes relacionados con alguna de las múltiples manifestaciones de las DHH lo que contribuirá al diagnóstico correcto de estos pacientes.

La finalidad de este panel es su aplicación rutinaria en el diagnóstico de todos los pacientes con sospecha de DHH. De este modo, se incrementará notablemente la posibilidad de obtener un diagnóstico correcto de estos enfermos.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Mejorar la caracterización molecular y el rendimiento diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias.

Objetivos específicos:

1. Determinar la presencia de mutaciones genéticas en enfermos con trastornos plaquetarios hereditarios y en los trastornos de la coagulación hereditarios mediante secuenciación masiva.
2. Comparar la presencia de mutaciones genéticas mediante secuenciación masiva en los enfermos con trastornos plaquetarios hereditarios y de la coagulación con la secuenciación convencional.
3. Analizar la presencia de mutaciones genéticas en los enfermos con diátesis hemorrágica no asociada con un fenotipo clínico característico.

MATERIAL Y MÉTODOS

VI. PACIENTES

Se seleccionaron un total de 75 pacientes con sospecha de DHH en los que previamente se habían descartado causas adquiridas y/o alteraciones del tejido conectivo. Se establecieron dos grupos de pacientes en función de los criterios de inclusión que cumplían. Cincuenta pacientes fueron etiquetados de un trastorno plaquetario hereditario y 25 pacientes de un trastorno de la coagulación hereditario (Figura 12).

6.1. Criterios de inclusión

Para ser incluidos en uno de los dos grupos debían cumplir al menos dos de los siguientes criterios [114,143,171].

6.1.1. Trastornos plaquetarios hereditarios

- Antecedentes familiares de primer o segundo grado con clínica hemorrágica y o trombocitopenia (Plaquetas $<150 \times 10^9/L$).
- Manifestaciones clínicas sindrómicas asociadas al sangrado y/o a la trombocitopenia (Plaquetas $<150 \times 10^9/L$).
- Escala de sangrado patológico ≥ 2 , definido por la *International Society of Thrombosis and Hemostasis Bleeding Assessment Tool* (ISTH-BAT).
- Hemograma patológico con trombocitopenia (Plaquetas $<120 \times 10^9/L$).
- Niveles del antígeno y actividad de FVW normales (FVW:Ag; FVW:Ac) y niveles de actividad normales de los factores de la coagulación.
- PFA100® Colágeno-Epinefrina >300 segundos y/o Colágeno-ADP >170 segundos.
- Test de agregación plaquetaria mediante *Light-Transmission-Aggregometry* (LTA) patológico.
- Citometría de Flujo (CMF) patológica en relación a la alteración de las glicoproteínas de membrana plaquetaria.
- Microscopía electrónica (ME) patológica a nivel de los gránulos α y/o densos plaquetarios.
- Médula ósea que descarta hemopatía maligna y/o cariotipo normal.

6.1.2. Trastornos de la coagulación hereditarios

- Sangrado patológico espontáneo y/o tras un traumatismo leve o y/o procedimiento invasivo, a nivel intracraneal, gastrointestinal, urológico, mucocutáneo, menorragia y/o hemartrosis.
- Hemograma sin alteraciones y alteración en los test básicos de coagulación: TP, TTPa y fibrinógeno.
- Test de mezcla compatible con deficiencia de factor de la coagulación [168].
- Niveles patológicos de FVW:Ag y FVW:Ac [171,206].
- Niveles del antígeno y/o actividad del factor específico de la coagulación [170].

6.2. Población a estudio

Se establecieron cinco subgrupos de pacientes en base a los criterios de selección:

- Población 1 (P1): diez pacientes en los que se habían detectado las mutaciones causantes de su enfermedad mediante secuenciación convencional.
- Población 2 (P2): veinte pacientes que presentaban sospecha de trombocitopenia hereditaria, o bien con un fenotipo específico o bien incierto.
- Población 3 (P3): catorce pacientes que presentaban sospecha de trombocitopatía hereditaria o bien con un fenotipo específico o bien incierto.
- Población 4 (P4): seis pacientes que presentaban clínica hemorrágica leve y PFA100® alterado.
- Población 5 (P5): veinticinco pacientes con deficiencia de factores de la coagulación, EVW, alteraciones en la fase de contacto e hipo/disfibrinogenemias.

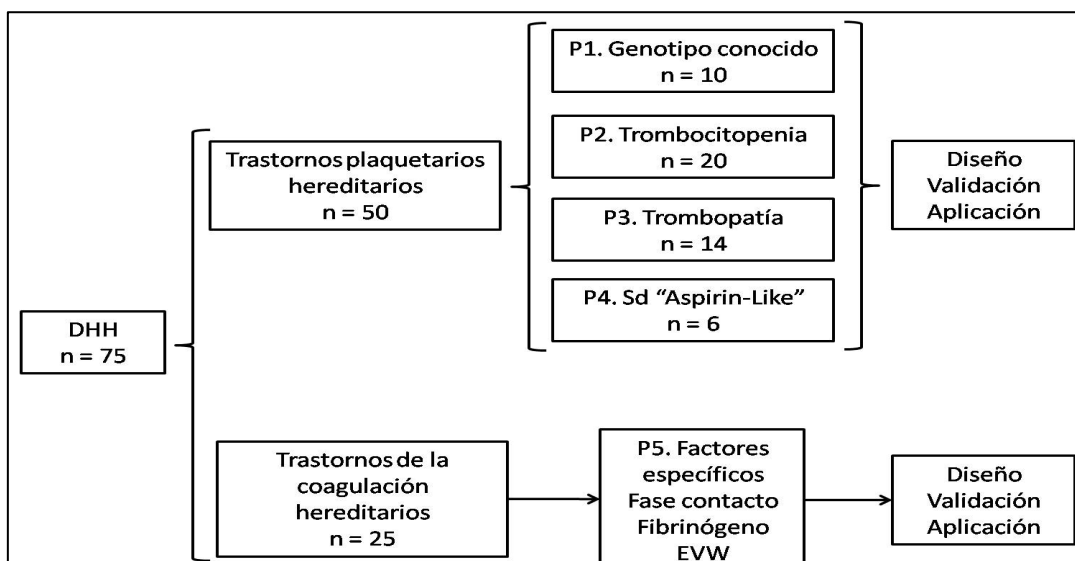


Figura 12. Población con sospecha de DHH incluida en el estudio.

6.3. Datos registrados

En todos los sujetos se recogieron los datos clínicos y biológicos relacionados con factores de riesgo hemorrágico (Tabla 10).

Tabla 10. Información obtenida de cada paciente incluido en el estudio:

Demográficos
<ul style="list-style-type: none"> - Hospital de procedencia - Lugar de nacimiento - Edad / Fecha de Nacimiento - Sexo (Varón [V] o Mujer [M]) - Antecedentes familiares hemorrágicos, de trombocitopenia, de leucemia mieloblástica aguda, síndrome mielodisplásico
Características clínicas
<ul style="list-style-type: none"> - Clínica hemorrágica (referida por el paciente) - BAT (objetivada por el médico) (Anexo 1, puntuación 0-3 por cada ítem) - Clínica asociada (ej. inmunodeficiencia, sordera, retraso mental, nefropatía, hipopigmentación, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis pulmonar, etc.) - Exploración física (dismorfias faciales, malformaciones musculoesqueléticas, cardíacas, neurológicas, renales, xantomias, esplenomegalia, etc.) - Ingesta de fármacos y dieta
Pruebas de laboratorio
<ul style="list-style-type: none"> - Hemograma con recuento de plaquetas - Frotis de sangre periférica - Estudio básico de coagulación (TP, TTPa y fibrinógeno) - Niveles FVW Ag (%), FVW Ac (%) - Niveles factores de coagulación específicos - PFA100® - Agregometría (LTA) - Citometría de Flujo (CMF) - Microscopía Electrónica (ME) - Análisis molecular (Sanger)

VII. MÉTODOS

7.1. Estudios fenotípicos funcionales/morfológicos

- Tiempos básicos de coagulación: se realizaron por técnicas estándar utilizando aparatos automatizados (Diagnostica Stago, Taverny, Francia). Los rangos normales fueron: TP (70%-120%), TTPa (27"-40") y Fibrinógeno (150-350 mg/dL).
- Niveles plasmáticos del FVW. Antígeno (Ag): se obtuvieron mediante método inmunturbidimétrico (Siemens), mientras que la actividad (Ac) se llevó a cabo utilizando partículas de látex en combinación con GPIb recombinante (Siemens). Los rangos de normalidad fueron 50-200 IU/dL [206].
- Medición de la actividad coagulativa de los factores: se realizó mediante método coagulativo en una fase, medido con BCS XP Systemm (Siemens, Healthcare Diagnostics). El rango normal del laboratorio fue 60-120% de actividad. Se consideró deficiencia de un factor de coagulación según las guías *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH) [170].
- Tiempo de obturación o PFA100®: se realizó a partir de un tubo de sangre total anticoagulada con citrato sobre una membrana con Colágeno-ADP y Colágeno-Epinefrina según las recomendaciones actuales [139].
- Test de agregación plaquetaria o *Light Transmission Aggregometry* (LTA): se realizó con PRP en el agregómetro (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Alemania), en el Centro Regional de Hemodonación (CRH), Murcia, por los Dres. J. Rivera y M.L. Lozano, según las guías de estandarización [145-148].
- Citometría de Flujo (CMF): se emplearon los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (BD Biosciences, San José, EE.UU), para la detección de glicoproteínas de superficie: FITC*CD42b (GPIb), FITC*CD42a (GPIb/IX), PE*CD41 (GPIIb/IIIa), FITC*CD61 (GPIIIa), FITC*PAC-1 (en plaquetas activadas, GPIIb/IIIa), FITC*CD49b (GPIIa), FITC*CD31 (GPIa); mientras que los utilizados para el estudio de los gránulos α y densos fueron: PE*CD62 (P-selectina) y PE*CD63 (*granulophysin*). Se llevó a cabo en el CRH, Murcia, por los Dres. J. Rivera y M.L. Lozano y las determinaciones se realizaron con el citómetro FacsCalibur (BD Biosciences, San José, EE.UU) [148].
- Microscopía Electrónica (ME): se llevó a cabo en el CRH, Murcia, por los Dres. J. Rivera y M.L. Lozano, mediante las técnicas de *whole-mount* para visualización de

gránulos densos o de microscopía electrónica convencional para el análisis ultraestructural completo de la morfología plaquetaria [146,150].

7.2. Estudios moleculares

7.2.1. Aislamiento de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial QIAmp® DNA Mini kit (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del ADN se determinó mediante la migración en geles de agarosa. Para comprobar el nivel de degradación, el ADN se visualizó tras la tinción con bromuro de etidio. La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante fluorimetría con Qubit 2.0 (Quiagen).

7.2.2. Next-Generation Sequencing (NGS)

a) Selección de genes candidatos en hemostasia primaria y secundaria

Para la elaboración del panel de genes, se realizó una búsqueda bibliográfica, a partir de fuentes primarias y secundarias en las principales bases de datos genéticas y biomédicas: *Pubmed, Medline, OMIM, Orphanet, Embase, The Cochrane Library, Genecards, Ensembl Genome Browse* [207]. Se han consultado los artículos y documentos más relevantes publicados en los últimos años (desde el 2000 hasta la actualidad), todos relacionados con las diátesis hemorrágicas hereditarias (trombocitopenias y trombocitopatías hereditarias, coagulopatías, trastornos del fibrinógeno y fibrinólisis). Se ha incidido principalmente en aquellos artículos que describían los genes implicados en la etiopatogenia de las diátesis hemorrágicas hereditarias y su espectro mutacional así como los genes implicados en la hemostasia primaria y secundaria. La búsqueda ha sido mediante las siguientes palabras clave en inglés: *inherited thrombocytopenias, rare bleeding disorders, coagulation factor deficiencies, inherited platelet disorders, platelet function diseases, genotype, molecular diagnosis*.

Los operadores booleanos utilizados han sido: “AND”, “OR”, “NOT”. Se han combinado las palabras clave con los conectores para poder encontrar artículos válidos para el objetivo de trabajo [207]. Cabe destacar que el conector “NOT” no se utilizó demasiado, para evitar confusiones en el buscador de base de datos; que el conector “OR” se utilizó juntando las palabras que significaban casi lo mismo y que el conector

“AND” se utilizó entre todas las palabras para conseguir una mayor sensibilidad y especificidad de la búsqueda. Además, se activó el término de búsqueda Medical Subject Headings (MeSH) [207].

Se determinaron 102 genes responsables de las diátesis hemorrágicas hereditarias identificadas hasta la fecha y dichos genes se clasificaron según la alteración que provocan o su mecanismo de acción (Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Clasificación según el mecanismo de acción de los genes relacionados con los trastornos plaquetarios hereditarios identificados en la revisión bibliográfica:

Mecanismo de acción	Gen implicado
Factores transcripcionales	<i>CYCS, FLI1, GATA1, GFI1B, HOXA11, MPL, RBM8A, RUNX1, STIM1, USF1</i>
Receptores de agonistas	<i>P2RX1, P2RY1, P2RY12, TBXA2R, ADRA2A, GP6, CD36, ITGA2, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, A2M, ITGA2B, ITGB3</i>
Secreción de gránulos	<i>NBEAL2, PLAUI, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, LYST, MLPH, BLOC1S3, BLOC1S6, DTNBP1, AP3B1, VIPAS39, VPS33B, RAB27A, MYO5A, PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2, ANO6</i>
Proteínas del citoesqueleto y estructurales	<i>ACTN1, WAS, MYH9, FLNA, ANKRD26, ABCA1, FERMT3, MASTL, TUBB1, PRKACG, ABCG5, ABCG8</i>
Síntesis enzimática y señalización	<i>GNAI3, GNAQ, GNAS, PLA2G4, TBXAS1, PTGS1, PLCB2, PTS, DPAGT1, DHCR24, RGS2, RASGRP2</i>

Tabla 12. Clasificación según el mecanismo de acción de los genes relacionados con los trastornos de la coagulación hereditarios identificados en la revisión bibliográfica:

Mecanismo de acción	Gen implicado
Vía intrínseca	<i>KLKB1, HRG, KNG1, F12, F13A1, F13B, F11, F8, F9, VWF</i>
Vía extrínseca	<i>F2, F3, F5, F7</i>
Carboxilación Vitamina K dependiente	<i>GGCX, VKORC1, F10</i>
Síntesis combinada de factores	<i>MCFD2, LMAN1</i>
Fibrinólisis	<i>PLAT, PLAUR, PLG, PLGRKT, TFPI</i>
Síntesis de fibrinógeno	<i>FGA, FGB, FGG, FIBCD1</i>
Sistema del complemento	<i>C1QBP, CLEC3B, CPB2</i>

b) Diseño experimental:

Consistió en la secuenciación masiva de las regiones génicas enriquecidas mediante captura de secuencia. La captura se realizó con la metodología Nextera Rapid Capture Enrichment Custom y la secuenciación en la plataforma MiSeq de Illumina. Se llevaron a cabo los siguientes pasos (Figura 13):

- I. *Síntesis de las sondas de captura para las regiones de interés.*

La selección de las regiones génicas a secuenciar así como la elaboración del diseño personalizado se realizó a través del software *Design Studio* de Illumina, disponible en la web (<https://my.illumina.com/>). El panel diseñado permitió capturar las regiones codificantes de los 102 genes identificados previamente por la búsqueda bibliográfica (Tablas 11 y 12). El tamaño total de ambos paneles fue de 400 kb. Para el panel de hemostasia primaria se utilizaron 1.399 sondas para analizar 1.106 regiones correspondientes a 71 genes relacionados con la hemostasia primaria, mientras que 501 sondas cubrieron el análisis de 343 regiones relacionadas con los 31 genes implicados en la hemostasia secundaria.

- II. *Generación de la librería de ADN.*

• Tagmentación del ADN genómico.

Ha consistido en la fragmentación del ADN genómico de cada paciente en fragmentos de aproximadamente 300pb y la inserción mediante transposones de unos extremos comunes en cada fragmento.

Procedimiento:

1. El ADN de cada paciente se diluyó hasta una concentración de 5ng/mL en un volumen final de 10ul. En cada pocillo de la placa *Nextera Library Tagment Plate* (NLT) se incluyeron, por tanto, 50ng totales de ADN de cada paciente.
2. Añadimos 25mL del buffer de tagmentación sobre cada pocillo y después 15mL de la enzima de tagmentación. Se agitó la placa a 1.800 rpm durante 1 minuto y se centrifugó a 280g durante 1 minutos más. A continuación se incubó a 58°C durante 10 minutos en el termociclador previamente programado a dicha temperatura.
3. Se añadió 15mL del buffer de parada de reacción a cada pocillo. Posteriormente se agitó a 1.800 rpm durante 1 minuto y se centrifugó a 280g durante otro minuto más. Se incubó a temperatura (T^a) ambiente durante 4 minutos.

- Primer Lavado.

Después de cada paso a realizar fue imprescindible la eliminación de restos que pudieran impedir el buen funcionamiento de la técnica.

Procedimiento:

1. Añadimos 65mL de bolas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter Danvers, MA, USA) a cada pocillo y se agitó la placa a 1.800 rpm durante 1 minuto. Se incubó a temperatura ambiente durante 8 minutos. Luego se centrifugó a 280g otro minuto más.
2. Colocamos la placa sobre un imán magnético que permitió que las bolas (con nuestro ADN pegado a las mismas) se adhieran a la pared de cada pocillo y de esta manera se eliminó el sobrenadante.
3. Añadimos 200mL de etanol al 80%, incubamos a T^a ambiente 30 segundos y eliminamos el sobrenadante nuevamente. Repetimos este paso en dos ocasiones.
4. Dejamos que el “pellet” de bolas se seque a temperatura ambiente.
5. Se añadieron 22,5mL del buffer de resuspensión a cada pocillo, agitándose a 1.800 rpm durante 1 min. Posteriormente se incubó a T^a ambiente 2 minutos más y se centrifugó a 280g durante 1 min. En este paso, el buffer de resuspensión permitió separar el ADN de interés de las bolas magnéticas a las que estaba unido. Se traspasó 20mL del sobrenadante a una nueva placa nombrada como *Nextera Library Amplification Plate* (NLA).

- Primera amplificación por PCR.

El ADN de cada paciente fue etiquetado con un adaptador (*Index*) diferente que permitió diferenciar la procedencia del material genético cuando este fue secuenciado de manera conjunta con el resto de muestras.

Procedimiento:

1. Añadimos 5mL del Index 1, luego el index 2 y por último el *Nextera Amplification Mix* a cada pocillo.
2. Se agitó la placa NLA a 1.200 rpm durante 1 minuto, se centrifugó a 280g un minuto y se colocó en el termociclador programado con las siguientes condiciones de PCR:
 - 72°C durante 3 minutos.

- 98°C durante 30 segundos.
- 10 ciclos de: 98°C 10 segundos; 60°C 30 segundos; 72°C 30 segundos.
- 72°C durante 5 minutos.
- Mantener a 10 °C.

- Segundo lavado.

Se llevó a cabo un lavado con las indicaciones previamente descritas, obteniendo 25mL de sobrenadante y se añadieron a una nueva placa *Nextera Index Library Plate* (NIL).

- Primera Hibridación.

Durante esta etapa se añadieron sondas complementarias a las regiones de interés que hibridaron por complementariedad de bases a dichas regiones.

Procedimiento:

1. Se midió mediante Qubit la concentración de cada muestra amplificada en el paso anterior.
2. Se generaron dos pooles de 12 muestras cada uno y en cada pool añadimos 500ng de cada muestra. En cada carrera de secuenciación estuvieron incluidas un total de 24 muestras.
3. Se concentró el volumen de los pooles hasta alcanzar 40ml mediante las columnas de filtro Amicon Ultra-0,5.
4. Añadimos 50mL del buffer de enriquecimiento y 10mL de las sondas Custom Selected Oligos (CSO). La mezcla se agitó a 1.200 rpm durante 1 minuto, centrifugamos a 280g otro minuto más y se dejó incubando en el termociclador siguiendo el siguiente programa:
 - 95°C durante 10 minutos.
 - 18 ciclos de incubación de duración 1 minuto, comenzando a 94°C y disminuyendo 2°C por cada ciclo.
 - Mantener a 58°C durante al menos 90 minutos hasta un máximo de 24 h.

- Primera Captura.

Este paso consistió en conservar todo el material genético que se había hibridado a las sondas (regiones de interés) y descartar el resto.

Procedimiento:

1. Sobre dos nuevos *eppendorfs* (*Nextera Enrichment Was Plate 1* o NEW1), se añadieron 250mL de las bolas magnéticas de estreptavidina y el producto del paso anterior. Se agitó durante 5 minutos a 1.200 rpm. Se incubó a T^a ambiente durante 25 minutos, y posteriormente se centrifugó a 280g durante 1 minuto.
2. Colocamos el *eppendorf* sobre un imán magnético que permitirá que las bolas (con nuestro ADN pegado a las mismas) se adhieran a la pared de cada pocillo y de esta manera eliminar el sobrenadante.
3. Se añadió la solución de lavado (200mL) y se agitó a 1.800 rpm durante 4 minutos. La mezcla se mantuvo en el termociclador a 50°C durante 30 minutos.
4. Posteriormente se colocó el *eppendorf* sobre el imán magnético para descartar nuevamente el sobrenadante. Este procedimiento se llevó a cabo en 2 ocasiones.
5. Para cada uno de los dos pools se llevó a cabo una mezcla con los siguiente componentes: 28,5mL del buffer 1 de enriquecimiento y 1,5mL de NaOH 2N. Una vez agitado, añadimos 23 mL de esta mezcla al tubo NEW1. Se agitó a 1.800 rpm durante 2 minutos y reposó a T^a ambiente 2 minutos más.
6. Se colocó en el sistema magnético y se transfirieron 21mL del sobrenadante a los tubos *Nextera Enrichment Hyb Plate 1* (NEH2).
Finalmente, se añadieron 4 ml del buffer 2 de elución, se agitó a 1.200 rpm un minuto y se centrifugó a 280g un minuto más.

- Segunda hibridación y captura.

Una de las características principales de la secuenciación (Illumina) consiste en la realización de una segunda hibridación y captura que permite aumentar la especificidad del material genético capturado. Esta segunda hibridación se llevó a cabo de la misma manera que la primera. Sin embargo, en este caso la incubación a 58°C se realizó durante al menos 14,5 horas y hasta un máximo de 24. La segunda captura se hizo de la misma manera que la primera, previamente descrita.

- Segunda amplificación por PCR.

En este caso sólo se amplificó el ADN capturado previamente mediante sondas (ADN de interés).

Procedimiento:

1. Añadimos 5mL de *primers* y 20mL de Nextera Enrichment Amplification Mix en el *epENDORF* procedente de la segunda captura. Lo agitamos a 1.200 rpm durante 1 minuto, centrifugamos a 280g un minuto y lo colocamos en el termociclador programado con las siguientes condiciones de PCR:

- 98°C durante 30 segundos.
- 12 ciclos de: 98°C 10 segundos; 60°C 30 segundos; 72°C 30 segundos.
- 72°C durante 5 minutos.
- Mantener a 10 °C.

- Tercer lavado.

Se llevó a cabo un lavado con las indicaciones previamente descritas. Se obtuvieron 30mL de sobrenadante para cada pool de 12 muestras.

- Cuantificación de la librería.

Se llevó a cabo con el kit de ensayo Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Una vez medida la concentración, convertimos los ng/ml en nM mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{(concentration in ng/ul)}}{\text{(660 g/mol x average library size)}} \times 10^6$$

Diluimos la librería hasta una concentración de 4nM.

- Desnaturalización del ADN.

Para conseguir la desnaturalización, se añadieron 5ml de NaOH 0,2N a 5ml de nuestra librería (a 4nM) y se incubó durante 5 minutos a T^a ambiente.

Posteriormente, se combinaron los 10mL de ADN desnaturalizado con 990mL de la solución HT1 (buffer de hibridación), obteniendo la librería a una concentración de 20pM. En nuestro caso concreto se determinó que la concentración óptima para la secuenciación era de 12pM, por lo que fue necesario diluir más nuestra librería. Para esta dilución final también se utilizó la solución HT1.

c) Generación de *clusters* y secuenciación.

Se realizó con la plataforma MiSeq de Illumina que puede alcanzar una cobertura media de 400 lecturas. Se utilizó el kit de reactivos de 300 ciclos, y específicamente, las muestras se secuenciaron usando “paired 150nt reads”.

d) Análisis de datos generados por NGS.

El software de análisis principal integrado realizó el primer análisis en tiempo real (RTA) de imágenes y las llamadas de bases (*variant calling*). Asimismo, asignó una puntuación de calidad a cada base en cada ciclo de secuenciación. Una vez finalizado el análisis principal, el software *MiSeq Reporter* del instrumento MiSeq inició el análisis secundario, que incluía el “demultiplexado”, la generación de archivos FASTQ, la alineación, las llamadas de variantes y la generación de archivos VCF que contenían la información sobre las variantes que se encontraron en las posiciones específicas en un genoma de referencia.

- Demultiplexado.

Fue el primer paso en el análisis, consistente en separar los datos de las muestras agrupadas en función de las diferentes secuencias de índices asignados previamente a cada una de ellas. En este paso, no se consideró ningún valor de calidad.

- Generación de archivos FASTQ.

Tras el demultiplexado, MiSeq Reporter generó los archivos intermedios en formato FASTQ, que es un formato de texto empleado para representar las secuencias. Los archivos FASTQ contenían las lecturas de cada muestra y las puntuaciones de calidad, excepto las lecturas de los grupos que no hubieran superado el filtro. La puntuación de calidad (Q) se calculó del siguiente modo: $-10 \log_{10} P$, donde P es la probabilidad de que la llamada de bases sea incorrecta.

- Alineación.

El programa alineó las secuencias de acuerdo al genoma humano de referencia, versión hg19, mediante el algoritmo *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) asignando una puntuación en función de las regiones de similitud entre ambas secuencias. Las lecturas alineadas se escribieron en archivos con formato BAM (*Binary-Alignment*).

- Llamadas de variantes o *Variant Calling*.

El programa *Genome Analysis Toolkit* (GATK) fue empleado para la identificación de las variantes. Asimismo, MiSeq Reporter realizó el resumen de la profundidad y la probabilidad de cada posición en el genoma. Se generaron los archivos de texto delimitados por las tabulaciones con variantes en formato VCF (.vcf), que se cargaron en la aplicación *Variant Studio*. Esta aplicación permitió obtener información de la calidad de la variante, la frecuencia con la que se observaba en la población celular, su impacto funcional o si existía o no una asociación de dicha variante con una enfermedad conocida. El principal recurso de esta aplicación fue el *Variant Effect Predictor* que aprovechaba las múltiples bases de datos (*RefSeq, PolyPhen, SIFT, COSMIC, ClinVar database, Ensembl, 1000 Genomes Project...*) para generar información sobre el transcrito, el gen y la localización de la variante de interés, además del cambio en la proteína al que puede dar lugar y la consecuencia de dicho cambio.

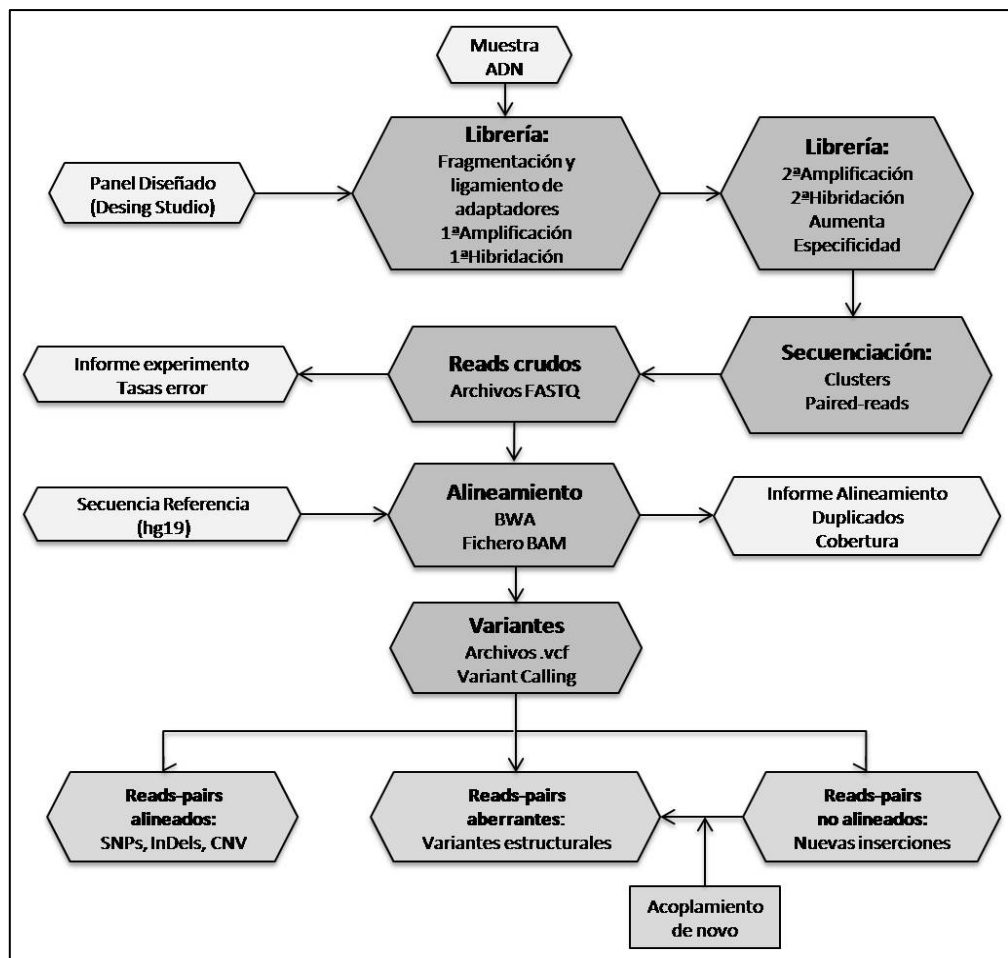


Figura 13. *Work-flow* de la NGS: las librerías se generaron a partir de fragmentos de ADN. Las regiones capturadas se secuenciaron y las lecturas obtenidas (*reads*) se procesaron y se alinearon frente a la secuencia de referencia del genoma humano (hg19). Se creó un fichero BAM y se anotaron las variantes. En función de su alineación se detectaron los posibles tipos de variantes genéticas (adaptado de Koboldt et al) [208].

De forma general, los filtros que se aplicaron para seleccionar las posibles variantes fueron los siguientes:

- Cobertura mínima de 100 lecturas, en la que los filtros de calidad consistieron en *Phred score* > 20, *Quality* > 20 y *Read coverage* > 30.
- Sólo se tomaron en cuenta aquellas variantes que daban lugar a un cambio de aminoácido en su secuencia proteica o que tenían algún tipo de consecuencia en la conformación de la proteína.
- Se eliminaron aquellas variantes ya descritas previamente en las bases de datos dbSNP132, Ensembl y ClinVar.
- Sin embargo, dado que algunas variantes patogénicas vienen definidas como polimorfismos (publicadas en dbSNP132), se reconsideraron, en aquellas que existía una alta sospecha clínica de un gen candidato.

La visualización de cada variante para identificar regiones complejas se ha realizado mediante el software *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

- La frecuencia alélica de las posibles mutaciones patogénicas se compararon con las bases de datos de exomas: *Exome Variant Server* (EVS), *NHLBI GO Exome Sequencing Project* (ESP) y *1000 Genomes*.
- Finalmente, las mutaciones potencialmente patogénicas se cotejaron con diferentes bases de datos como: HGMD profesional, *Locus Specific Mutation Databases* (<http://www.hgvs.org/locus-specific-mutation-databases/>), *PubMed y Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) para comprobar si han sido descritas previamente en la literatura [209].
- Se utilizaron modelos *in silico* como *Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), para predecir el efecto funcional y patogénico de las mutaciones nuevas.
- Las posibles mutaciones patogénicas se diferenciaron por sus posibilidades de ser causantes de la enfermedad según las guías de práctica clínica de la *Association for Clinical Genetic Science* (<http://www.acgs.uk.com/committees/quality-committee/best-practice-guidelines/>) [200]:

- Improbable: aparecen en dbSNP en baja frecuencia. Los modelos *in silico* no lo define como patogénica. No hay datos en la literatura.
- Significado desconocido: no se incluyen en las bases de datos y existe un conflicto en los modelos *in silico*, no hay datos de co-segregación, ni referencias en la literatura. Se incluyen en este apartado mutaciones de novo que no aparecen en familiares o son un hallazgo incidental.
- Probablemente patogénica: no se describen en las bases de datos, o están presentes con baja frecuencia (<1%) y el modelo *in silico* predice patogenicidad. El estado (homocigoto/heterocigoto) es concordante con la herencia aunque no se demuestre en familiares. Puede estar descrita en la literatura sin haberse realizado el estudio funcional.
- Claramente patogénica: no se describen en las bases de datos, o están presentes con baja frecuencia (<1%) y el modelo *in silico* predice patogenicidad. El estado (homocigoto/heterocigoto) es concordante con la herencia aunque no se demuestre en familiares. Además, ha sido descrita previamente en la literatura y con evidencia de alteración funcional.
 - Si la variante produce un codón stop prematuro (*nonsense*) o cambia el marco de lectura (inserciones/deleciones), se considera claramente patogénica si concuerda con el mecanismo de herencia. En caso de mutaciones tipo *in-frame* (inserciones-deleciones que no generan un codón stop) debe ser descrita previamente como patogénica más de una vez.

7.2.3. Secuenciación Sanger

Se empleó la secuenciación tipo Sanger para validar todas las mutaciones identificadas como patogénicas mediante la tecnología de NGS:

1. Diseño de *primers* mediante el programa Primer3 Input (versión 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)
2. Amplificación de los fragmentos mediante PCR, utilizando la polimerasa FastStart High Fidelity de Roche y siguiendo las especificaciones del proveedor.
3. Secuenciación en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, secuenciador ABI3130.

4. Visualización de las secuencias obtenidas mediante el software Chromas Lite v2.1.1 (Technelysium) y alineamiento con la secuencia de referencia utilizando DS Gene v1.5 (Accerlys).

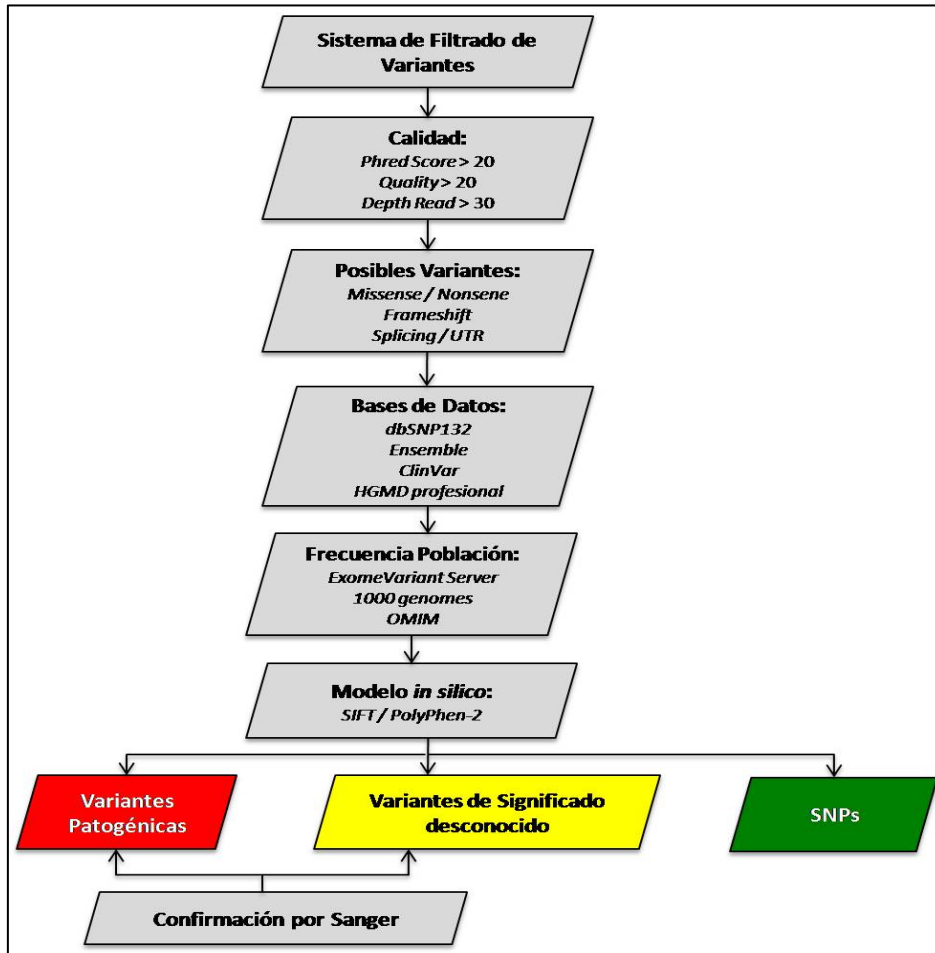


Figura 14. Sistema de filtros aplicados para la detección de las posibles variantes patogénicas.

7.3. Aspectos éticos

El estudio cumplía con las Normas de Buena Práctica Clínica respetando la Declaración de Helsinki, así como las Normas del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, las de la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos y los requisitos establecidos en la Ley 14/2007, de 3 de julio de investigación biomédica. Además, el estudio fue aprobado por el comité bioético local del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL, Salamanca, España). Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron el consentimiento informado, al igual que los familiares que fueron estudiados.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1. DESIGN AND VALIDATION OF A 71-GENE NEXT-GENERATION DNA SEQUENCING PANEL FOR THE DIAGNOSIS OF INHERITED PLATELET DISORDERS

Authors: Bastida JM¹, Rivera J², Del Rey M³, Benito R³, Lozano ML², Riesco S⁴, Fisac R⁵, García-Frade LJ⁶, Aguilar C⁷, Pardal E⁸, Peñarrubia MJ⁹, Alonso MT¹⁰, Bermejo N¹¹, González-López T¹², González B¹³, Marneth AE¹⁴, Cid AR¹⁵, Sedivas T¹⁶, López MF¹⁷, van der Reijden BA¹⁴, Morgan N¹⁸, Watson SP¹⁸, Vicente V², Hernández-Rivas JM^{1,3}, González-Porras JR¹.

Affiliations: ¹Department of Hematology, H. Universitario de Salamanca-IBSAL, Salamanca. ²CRH, H. Reina Sofía, H. Universitario Morales Meseguer, IMIB-Arrixaca, Murcia. ³IBSAL, IBMCC, CIC, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca. ⁴Department of Pediatría. H. U. de Salamanca-IBSAL. ⁵Department of Hematology, H. G. de Segovia. ⁶Department of Hematology, H. U. Río Hortega, Valladolid. ⁷Department of Hematology, CA de Soria. ⁸Department of Hematology, H. Virgen del Puerto, Plasencia. ⁹Department of Hematology, H. C. U. Valladolid. ¹⁰Department of Pediatrics, H. C. U. Valladolid. ¹¹Department of Hematology, H. San Pedro de Alcántara, Cáceres; ¹²Department of Hematology, H. U. de Burgos. ¹³Department of Pediatrics, H. U. La Paz, Madrid. ¹⁴Department of Laboratory Medicine and Hematology, RadboudUMC, Nijmegen, Netherlands. ¹⁵Department of Hematology, H. U. La Fe, Valencia. ¹⁶Department of Hematology, Centro Hospitalar de Coimbra, Portugal. ¹⁷Department of Hematology, C.H.U. A coruña. ¹⁸Birmingham Platelet Group, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, UK.

Abstract

Background: Due to the large number of genes implicated in Inherited Platelet Disorders (IPDs), the identification of the genetic cause using conventional Sanger sequencing is very time consuming and costly. Also, in many cases a molecular diagnosis cannot be attained by the conventional approach of Sanger sequencing. Next generation sequencing (NGS) enables the simultaneous analysis of large groups of candidate genes and could therefore be a feasible diagnostic tool to rapidly identify affected genes in IPDs.

Objective: To design and validate a NGS panel of 71 genes related to IPDs and to explore the application of this approach to the diagnosis of these disorders.

Methods: A total of 48 unrelated patients with known or suspected IPDs entered the study: ten patients for validation purposes of our targeted sequencing strategy, and thirty-five molecularly uncharacterized patients with clinical and/or phenotypically suspicion of IPDs. We developed a clinical NGS panel with 1106 targets regions, including all exons, 3'UTR and flanking regions, of each of the 71 genes that have already been associated to IPDs.

Results: In the validation group, all thirteen mutations that were previously identified by conventional sequencing were confirmed by NGS. Among the previously undiagnosed patients, potential pathogenic variants were identified in 22 of 38 patients (58%). A total of 29 potential pathogenic variants were identified within 15 different genes, including 22 pathogenic variants previously unreported. In patients with inherited thrombocytopenia (IT), pathogenic mutations were found in 74% of these patients (14/19). In six patients who presented mild bleeding complications and only prolonged PFA100, any pathogenic mutation was found. Finally, in those patients with high suspicious of inherited platelet function disorders (IPFDs) pathogenic mutations were found in 62% of these patients (8/13).

Conclusion: These findings demonstrate the usefulness of NGS in a clinical setting as a faster, accurate, reproducible and reliable tool for the molecular characterization of patients with IPDs.

Introduction

Inherited Platelet Disorders (IPDs) are a heterogeneous group of rare bleeding diseases of variable clinical severity [1]. They may be caused by genetic defects affecting the platelet production resulting in thrombocytopenia or alternatively, mutations might affect development or maintenance of the platelet ultra-structure, formation and cargo of granules, or platelet responses to agonists, eliciting platelet dysfunction. Many IPDs are both characterized by thrombocytopenia and impaired platelet function [2]. Although fatal hemorrhage is usually infrequent, serious bleeding symptoms are common, such as mucocutaneous bleedings and excessive blood loss after trauma or surgery. Currently, clinical evaluation of index patients, investigation of their family background and appropriate platelet phenotyping are essential steps in the workflow of diagnosing patients with IPDs [3,4]. The use of established bleeding assessment tools (BAT's) such as the one proposed by the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH-BAT) could be useful to assess a standardized bleeding history [5]. However, this score has failed to correlate with platelet defects by lumiaggregometry assays in patients with suspected IPDs [6]. Laboratory diagnosis of IPDs relies on a combination of platelet function assays including mainly platelet count and morphology, light transmission aggregometry (LTA) and flow cytometry (FCM) assays. In many patients, second step assays such as transmission electron microscopy (EM), clot retraction, or specific biochemical studies may also be useful for the diagnosis of specific IPDs [7,8]. However, most of these assays are technically challenging, insufficiently standardized and poorly reproducible, which may restrict their reliable application to specialized centers.

Molecular analysis has been essential to unravel the genetic basis of many IPDs and has significantly increased our understanding of these diseases [9]. However, genotyping of candidate genes by classical Sanger sequencing (SS) results in more than half of the patients remaining undiagnosed at the molecular level, mainly due to the fact that nonspecific laboratory phenotype prevent identification of candidate gene [10,11]. Consequently, a novel approach for the genetic testing of IPDs is clearly needed. Currently, targeted Next-Generation sequencing (NGS) allows the sequencing of large amounts of genomic material at manageable cost, and facilitates genotyping in diseases with many potential causative genes. Although translating NGS to clinical settings remains a challenge [12-14], it has recently been proposed as a novel

alternative tool in the molecular diagnosis of IPDs [15,16]. In this study we designed, validated and implemented a NGS platform for multiplex genetic analysis of a large number of genes that successfully allowed molecular diagnosis of IPDs.

Patients and Methods

Patients

A total of 48 unrelated patients with known or suspected IPDs entered the study. Validation studies included 10 patients that had previously been molecularly characterized by SS for the pathogenic mutation causing IPD (Table 1) [17,18]. The remaining 38 patients entered the study as they presented with abnormal bleeding diathesis, as assessed and quantified by the referring doctors using the ISTH-BAT, no evidence of coagulation defects or acquired disorders, and clinical and laboratory data compatible with the suspicion of IPDs (Table2). These patients underwent targeted analysis of 71-selected genes associated with platelet/bleeding disorders by NGS as the first genotyping procedure.

Written informed consent was obtained from all patients and healthy controls entering the study. Investigations were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and were approved by the Local Ethical Committees of Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL, Salamanca, Spain), Hospital Universitario Reina Sofía (Murcia, Spain) and Radboud UMC (Nijmegen, Netherlands).

Blood sampling, platelet phenotyping and DNA isolation

Venous blood was drawn from each patient into commercial 7.5% K3 EDTA tubes (for complete blood count [CBC], and DNA isolation), and into buffered 3.2% sodium citrate for platelet studies. Platelet function testing had been performed mainly in citrated platelet-rich-plasma as detailed elsewhere [17]. Genomic DNA from peripheral blood samples was isolated using a DNeasy blood and tissue kit, following the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was measured using a Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Custom NSG Panel Design, Library Preparation and Sequencing

We developed a clinical NGS panel with 1399 probes to target 1106 regions, including all exons, 3'UTR and flanking regions, of each of the 71 genes that have already been associated to IPDs. As depicted in Table 3, the panel included genes encoding for

platelet transcription factors, integrin and other platelet surface receptors, proteins involved in granule formation and/or function, cytoskeletal and structural proteins, and signal transduction proteins.

The design of the NGS panel was performed using Design Studio (Illumina, San Diego, CA). NGS was performed on a MiSeq Instrument, running MiSeq Control Software and according to a Nextera sequencing design (Illumina). Fifty ng of the DNA was sequenced following Illumina's standardized protocol. DNA libraries were normalized to 4 nM and pooled in equal volumes. We used the 300-cycle reagent kit. Specifically, the sample was sequenced using paired 150 nt reads, multiplexing twelve, dual indexed samples per run. Each run performed in this study contained twenty-four samples.

NGS Data Analysis

Sequence data generated by NGS was mapped to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS; GenBank ID NC_012920.1) using the MiSeq's integrated computer software platform (MiSeq Reporter, Illumina), which uses a Burrows-Wheeler-Aligner (BWA) and the Genome Analysis Tool Kit (GATK) for variant calling of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and short InDels [19,20]. Secondary data analysis, sequence alignment and variant detection were carried out using Variant Studio Data Analysis (<https://www.illumina.com/informatics/research/biologicaldatainterpretation/variantstudio.html>) and Integrative Genomics Viewer (IGV) (BroadInstitute, Massachusetts, NE) software. Minimum coverage per base was 100 reads. First step consisted of a quality filters based on Phred score of > 20, Quality > 20 and Read coverage > 30 at each position within the reads indicating high sequence quality. Then, we filtered the data, only those variants that led to amino acid change in the protein sequence were considered as causative mutations. Single nucleotide variants (SNVs)/InDels previously described in different sources, such the dbSNP132, the catalog of somatic mutations in cancer (Cosmic), or the National Center for Biotechnology Information (NCBI) ClinVar were disregarded [21]. Furthermore, allelic frequency was consulted in Exome Variant Server and 1000 genomes databases. Searching against HGMD professional database [22], PubMed, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) and locus specific mutation databases identified mutations known to cause IPDs. *In silico* models, Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) were used to predict the functional effects and the pathogenicity of the novel mutations identified.

Sanger sequencing

To verify candidate mutations found in NGS panel and to examine their segregation among available family members, we performed standard Sanger sequencing (SS). In brief, specific forward and reverse primers were designed using Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) (sequences available on request). Genomic DNA was amplified with the Fast Start High Fidelity PCR System (Roche, Basel, Switzerland) following the manufacturer's instructions, with some variations in the annealing temperature. DNA sequences were evaluated using Chromas Lite v2.1.1 (Technelysium, South Brisbane, Australia) and DS Gene v1.5 (Accerlys, San Diego, USA) softwares. Data were analyzed using annotations of genome version hg19/GRCh37.

Results

General performance of the NGS assay

All 71-genes were analyzed for all patients. We successfully sequenced 95.6% of the 1106 targets regions to a minimum coverage depth of 100 at every base-pair position of interest. The remaining 4.4% of regions could not be sequenced with adequate coverage using the NGS platform. If mutations were not found, we performed SS assays for those regions.

Validation of the NGS panel

The 71-gene panel was validated using samples from the 10 patients that had been previously molecularly characterized by SS of a single gene based on clinical suspicion (Table 1) [17,18]. All samples were blinded for NGS, and the sequencing component of the NGS was validated by comparing results with previous SS. Sequencing results were 100% concordant, and included the detection of 12 single base substitutions (9 missense variants and 3 nonsense changes) and 1 deletion within 8 different genes. Analytical sensitivity and specificity of the NGS was therefore 100%. Reproducibility studies were also performed, where in 4 DNA samples were run in triplicate per batch, across 3 different batches. The data showed 100% concordant calls, which demonstrated intra-batch and inter-batch reproducibility panel.

Genetic analysis of patients with clinical suspicion of IPDs using the NGS panel

As the 71-gene NGS panel demonstrated high sensitivity and specificity in the validation trial, we used this assay as the first genotyping method in a cohort of 38 patients with suspected IPDs. We detected 620 molecular changes within the 71 genes (range, 580–655), that once filtered using the bioinformatics tools described in the Methods section, resulted in 29 different molecular variants among 22 of the 38 index cases (58%) (Table 4). SS and when possible segregated through the family members subsequently confirmed each mutation. As summarized in Table 4, we identified a total of 29 variants in which *in silico* model predicted disrupted proteins, 22 novel mutations (one repeat) and 7 previously reported mutations: 18 missense mutations, 7 frameshift mutations, 1 mutant initiation codon and 3 SNPs within 15 genes. The deleterious variants identified in this cohort were inherited in a homozygous/hemizygous manner in 6 patients (four cases due to consanguineous marriages and two males with X-linked disorder), as compound heterozygous defects in 4 and the rest were mono-allelic heterozygotes (Het).

In this series of patients, 19 patients were referred to us with suspicions of inherited thrombocytopenia (IT) such as Bernard-Soulier Syndrome (BSS), *MHY9*-related disorder (*MYH9*-RD), Gray platelet syndrome (GPS), or not so obvious clinical suspicion of specific IT. Thirteen cases (11 to 23) had macrothrombocytopenia and 6 cases (24 to 29) had normal or small platelet size). Molecular variants were found in 74% of these patients (14/19). On the other hand, another 13 patients were evaluated such as inherited platelet function disorders (IPFDs). Molecular variants were found in 62% of these patients (8/13). Moreover 6 patients only had prolonged PFA100® and any mutations were identified.

In two BSS patients (cases 11 and 12), platelet phenotyping showed variable impairment of ristocetin-induced LTA (RIPA) and/or reduced platelet GPIIb/IIIa expression (Table 2). The NGS panel identified homozygous missense mutations in *GP1BA* (ENSG00000185245) that encodes for the Iba subunit of the GPIIb/IIIa complex. Patient 11 carried the described missense mutation p.Cys225Ser (c.673T>A) [23,24]. In contrast, the *GP1BA* variant p.Leu155Val (c.463C>G) identified in case 12, had not been previously reported. This missense mutation is at the sixth leucine-rich glycoprotein repeat (LRR) of the GPIIb N-terminal domain [25],

and the damaging score provided by the bioinformatics' tools support that this novel mutation could cause destabilization of the Iba normal structure preventing its correct interaction with the other subunits.

In cases 13 to 15, clinical suspicion of *MYH9*-related disease (*MYH9*-RD) was established because of the combination of moderate thrombocytopenia, large platelets and Döhle-like basophilic inclusions in neutrophils (table 2). Correspondingly, genetic analysis revealed mutations located in *MYH9* in all three cases (ENSG00000100345). Family studies were consistent with de novo mutations in cases 13 and 14. Patient 13 carried a previously unreported c.220A>G mutation in exon 2 of *MYH9*, (p.Lys74Glu). This variant was considered deleterious since it was predicted to affect the SH3-like motif/motor domain interface (SH3/MDi) of the head domain of the heavy chain of the non-muscle myosin IIA (NMMHC-IIA). Patient 14, who also displayed a mild clinical phenotype of *MYH9*-RD, carried a heterozygous deletion (c.5773delG) in exon 41 of *MYH9*, which produced a described frameshift with a premature stop codon (p.Asp1925Thr fs*23) [26]. The other patient (case 15) and his father, who showed a mild clinical phenotype, had a novel heterozygous mutation c.4250G>A in exon 31 of the *MYH9* gene (p.Arg1417Gln). This variant (described as somatic SNV in Cosmic) resulted in a change to a charged amino acid in the coiled coil region of the tail domain that was expected to disrupt protein function that would affect the molecule assembly [27]. *In silico* model predicted this variant to have a potentially damaging effect on the protein (Table 4).

Two young patients (cases 16 and 17) were referred to us with suspicion of GPS (Table 2). In the case 16, we identified a novel homozygous insertion (c.3422_3423insC) in exon 24 in the *NBEAL2* gene (ENSG00000160796) using NGS, confirming the presumptive diagnosis of GPS. This mutation produced a frameshift and premature stop codon 49 amino acids downstream of the mutation (p.Gly1142Arg fs*49) and reduced level of α granules. Two variants c.6161C>T (p.Ser2054Phe) and c.6212G>C (p.Arg2071Pro) in exons 39 and 40, respectively, were found in patient 17 and would presumably alter the *NBEAL2* function, as supported by the pathogenicity prediction of PolyPhen-2 and SIFT. However, the first variant had been previously described as SNPs and pArg2071Pro to our knowledge, this variant has never been found in healthy controls (dbSNP, 1000 genomes, ExAC browser) (Table 4).

Another four patients (cases 18-21) had dominant IT with normal expression of GPIb/IX/V. The NGS panel revealed heterozygous mutations in 3 out of 4 patients. Mutations in cases 18 and 19 affected to the GPIb/IX receptor, concordant with heterozygous BSS. In case 18, we found a unreported mutation c.1A>T (p.Met1Leu), causing disruption of the sequence for the start codon of *GP1BB* (ENST00000366425). Additionally, two heterozygous variants in GPIba were found in patient 19: c.463C>G (p.Leu155Val) and c.673T>A (p.Ser341Cys) (Table 4). As the patient had mild macrothrombocytopenia but nearly normal ristocetin-induced LTA and GPIb/IX expression (80-85%), we speculated that these mutations would be located on the same allele. In case 20, we detected a new unreported missense mutation c.319A>C (p.Thr107Pro) in exon 4 of *TUBB1* gene (ENST00000217133). The *in silico* model predicted this variant to have a potentially damaging effect on the protein. No mutations were found in case 21.

The following seven out of eight cases (22 to 29) were referred to us with suspicion of unknown IT. Refractory immune thrombocytopenia (ITP) had been diagnosed in case 22 (Table 2). All exons of *RUNX1* and exons 1-3 and 10 of *WAS* were wild type sequencing previously by SS. However, NGS approach allowed detecting a novel deletion (c.802delC) in exon 9 of *WAS* (ENST00000376701), which produced a frameshift with premature stop codon 40 amino acids downstream of the mutation (p.Arg268Gly fs*40) (Figure 1). Decreased of WAS protein (WASp) was confirmed by FCM, consequently Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) was diagnosed (WASp: Patient: 18% vs Control 98%) (Figure 2). His mother was a carrier (Figure 3). She showed mild thrombocytopenia and slightly reduced of WASp. Case 23 carried a novel c.476A>G (p.Asn159Ser) mutation in exon 3 of *RUNX1* (ENST00000344691) (Table 4) with no obvious known family history of myeloid malignancies. The mutation was predicted to affect the conserved Runt domain (RHD) near the N-terminus of the protein, resulting in impaired binding of Runx1 to cis-regulatory DNA sequences. Case 24 presented severe clinical bleeding, platelet function disorder and mild thrombocytopenia. Consanguinity was presented in his family and his aunt and cousin had a similar phenotype. A novel missense mutation c.865C>T (p.His289Tyr) in exon 4 of *GATA1* (ENST00000376670) were identified. This variant (probably pathogenic) affected to C-terminal zinc finger (C-finger), which is essential for GATA1 function, since it is responsible for the recognition of the GATA consensus sequence and consequent

binding to DNA [28]. Case 25 with macrothrombocytopenia and hemolytic anemia showed 2 SNPs (rs11887534 and rs4148211) in *ABCG8* gene (ENST00000272286). Rs11887534 are associated with a more efficient transport of cholesterol into the bile (cholesterol gallstones) while rs4148211 are associated with higher plasma total cholesterol and LDL cholesterol [29,30]. These variant could play a role in a rare disorder such as sitosterolemia [31]. Case 26 had syndromic thrombocytopenia since birth and 45XY -21 karyotype (table 2). No mutations were found with this NGS approach. However, array comparative genome hybridization (aCGH) showed a deletion 21q22.11 including the gene *RUNX1* and associated anomalies depending on which adjacent genes are absent or disrupted [32]. Case 27 presented high suspicion of WAS because of the combination of microthrombocytopenia, recurrent infections and eczema. However, no mutations were identified in this case such as cases 28 (macrothrombocytopenia) and 29 (macrothrombocytopenia and combined storage pool deficiency).

Four patients (Cases 30 to 33) were enrolled in the study with an initial clinical suspicion of Glanzmann Thrombasthenia (GT). Cases 30 and 31 were reported to exhibit markedly impaired aggregation to different agonists and reduced α IIB β 3 expression level confirmed GT suspicion. In contrast, we discarded a GT diagnosis in patients 32 and 33 because platelets displayed normal TRAP, arachidonic acid, and collagen inducible LTA responses, as well as normal α IIB β 3 expression by FCM and Western blot analysis (data not shown) (Table 2). Analysis using the NGS panel confirmed a GT causing homozygous mutation, c.2333A>C (p.Gln778Pro) in exon 23 of *ITGA2B* (ENSG0000005961) in patient 30. This reported mutation had been previously identified in six unrelated Japanese Glanzmann Thrombasthenia patients (<https://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann>) and resulted in the change in the Calf-1 domain of α IIB [33]. In contrast, in patient 31, despite an obvious type I GT phenotype, we did not detect pathogenic variants in *ITGA2B* or *ITGB3* (ENSG00000259207), or in other genes using our NGS panel. No mutations were found in cases 32 and 33.

Another signaling/secretion defects were catalogued in 6 patients (Cases 34 to 39). We identified 2 novel frameshift mutations causing premature stop codons affecting the GPVI collagen receptor in cases 34 and 35. Patient 34 and her mother and sister had a heterozygous deletion of four nucleotides (c.708_711delCGAA) in exon 6 of *GP6*

(ENSG00000088053), while patient 35 exhibited a heterozygous insertion in exon 8 (c.1752_1753insTCCC) (Table 4). Cases 36 and 37 had a heterozygous mutation in the only coding exon 3 of *P2RY12* (ENST00000302632) and in exon 1 of *TBX42R* gene (ENST00000375190), respectively (Table 4). The variant (c.835G>A) in *P2RY12* disrupted the protein's extracellular loop just before the seventh trans-membrane domain [34]. Moreover, the variant (c.620C>T) in *TBX42R* was identified also in her son and one brother (also presenting with bleeding tendency). In case 38, a novel variant (c.1205C>T) in exon 6 of *RUNX1* gene was found (p.Ser402Phe). This variant affected to transactivation domain (TAD). No mutations were identified in the rest of signaling or secretion defects (case 39 and 40).

From different point of view, two patients (cases 41 and 42) shared clinical manifestations and laboratory findings such as albinism and reduced dense granules (Table 2). In case 41, Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) was suspected and *HPS1* wild type gene was previously sequencing by SS. Our NGS test identified a reported frameshift deletion (c.2054delC) in exon 13 of *HPS4* (ENST00000398145) [35]. This finding confirmed HPS in the “propositus” and his sister. EM showed reduced dense granules in affected family members (Figure 4). Chediak-Higashi syndrome (CHS) was suspected in case 42 because a combination of albinism and neutrophil inclusion bodies (Table 2). A compound heterozygous consisted of two missense mutations (c.7136T>C and c.10095G>C) in exon 23 and 42, and one deletion (c.10100delA) in exon 42, were identified in *LYST* gene (ENST00000389793) by this NGS approach. First variant affected to HEAT/ARM domain that mediated membrane interactions and the latter affect to BEACH domain, which predicted to disrupt interaction proteins [36].

In the remaining 6 females included (cases 43 to 48), only presented mild bleeding complications (BAT $2.5 \pm 0,5$) and prolonged PFA100® (Col-Epi/Col-ADP) (Table 2). Any mutations were identified in these types of patients.

Discussion

In this study we demonstrate the feasibility and utility of an in-house designed NGS platform including 71 genes that have been formerly identified to play a role in platelet physiology. This innovative diagnostic approach achieved faster genetic characterization of patients with IPDs. Validation analysis, by enrolling a cohort of 10

patients who had been previously identified for the genetic basis of their disease demonstrated a strong analytical sensitivity and specificity of the panel [17,18].

The remaining index cases were prospectively recruited for genetic analysis from different Spanish hospitals, within the collaborative project “Functional and Molecular Characterization of Patients with Inherited Platelet Disorders” undertaken under the scientific sponsorship of the Spanish Society of Thrombosis and Hemostasis. This cohort included 38 patients with clinical suspicion of IPDs. Noteworthy, 29 genetic variants were detected in the total cohort of patients with suspected IPDs. Remarkably, 22 of the 29 variants (76%) had not been previously reported.

About variants in genes encoding for the GPIb/IX/V complex, interestingly, the missense change p.Cys225Ser found in case 11, had been previously identified in 6 other BSS families including 3 unrelated Spanish individuals [17,37] suggesting a common ancestry. Moreover, the previously unreported *GP1BA* variant, p.Leu155Val, in case 12 was detected by NGS. Platelets from the patient carrying the p.Leu155Val displayed 30% of the normal amount of Iba molecules, indicating that this mutation is similar to the nearby p.Leu145Pro change, one of the few *GP1BA* variants that allows expression of the mutant protein on the platelet surface, albeit at a lower density [24]. Two dominant thrombocytopenia were according to monoallelic BSS that has been associated with a scarce number of variants in *GP1BA* (p.Asn57His, p.Tyr70Asp, p.Leu73Phe and p.Ala172Val) [24] and *GP1BB* (p.Arg42Cys) [38] which are inherited as fully penetrant autosomal dominant traits. Except the p.Ala172Val allele (Bolzano variant), which is common in the Italian population [39], the remaining variants have only been found in single pedigrees. However, the Bolzano variant was first recognized in a classic biallelic BSS [40] and its severe pathogenic effect in homozygous status was later demonstrated in another patient [41] It is remarkable that, resembling the Bolzano variant, the novel missense mutation p.Leu155Val that we identified in two of the patients, also gives rise to both, severe biallelic BSS (patient 12) and asymptomatic monoallelic BSS (patient 19). Furthermore, we would expect that the mutation c.1A>T affecting the start codon (p.Met1Leu) of *GP1BB*, resulted in no expression of the protein from the correspondent allele, but the expression level of GPIb/IX in platelets from this patient was only reduced by less than 20%. The identification of two novel monoallelic BSS patients in this series suggests that this condition might be far

more common than previously recognized as well as mutation on *TUBB1*, which only 2 SNPs were associated with this disorder [42].

As *MYH9* is a large gene (41 exons), classical SS is labor intensive and certainly not applicable to many centers. NGS was used to sequence the entire *MYH9* gene. Deafness, cataracts and renal disease have variable penetrance and severity in this disease, but in general the upstream mutations up to amino acid 1400 are more often associated with syndromic manifestations than the downstream mutations [26]. Patient 13 carried a *de novo* mutation affecting the SH3/MD substitution at a domain that typically associated with an “auditory” phenotype before 60 years of age. Since the patient is still an infant, close follow-up for occurrence of sensorineural hearing loss would be highly recommended [26]. Similarly close follow-up of patient 15 presenting with the p.Arg1417Gln is required, since other mutations also causing charge change in nearby residues (D1424) are expected to alter ionic interactions and associate with a significant incidence of extra-hematological manifestations [26].

Our NGS panel was very useful in patients with unknown IT (cases 22 to 29). This approach enabled us to identify genetic variants in four cases. Interestingly, patient 22 had severe bleeding symptoms and received 6 lines of ITP treatment. Mutational analysis showed a 1bp deletion (c.802delC), resulted in frameshift and premature stop codon. Wiskott-Aldrich syndrome was diagnosed. Misdiagnosis had major consequences such as inappropriate treatments [43]. The limitation suspicious in this patient were normal size platelets and mild eczema and infectious. However, he had severe thrombocytopenia and bleeding, and depletion of naïve T cells, and reduced T-cell memory formation (data not showed) [44]. Two variants were found in *RUNX1* (cases 23 and 38), which affected to different domains (RHD and TAD) that explained the mild thrombocytopenia and platelet dysfunction, respectively [45]. In these cases is extremely important to detect developing of myeloid malignancies [45]. The variant identified in exon 4 in *GATA1* affected to C-finger. However, causative mutations related to *GATA1* are infrequent and affect to N-finger [46]. These preliminary findings are being evaluated in a murine gene to confirm a novel pathogenic mechanism. In case 25, two SNPs were found in *ABCG8* gene and were involved in transport of cholesterol and associated with higher plasma total cholesterol and LDL cholesterol [29,30]. These data were consistent with the phenotype of the patient (Table 2) and probably Sitosterolemia could be established [31].

Cases 34 and 35 presented 2 heterozygous frameshift mutations in *GP6* gene. In contrast to previously reported [47], our results suggest that similar to heterozygous BSS and mild macrothrombocytopenia, monoallelic mutations in *GP6* may also associate with a mild bleeding phenotype. In the same way, patient 36 carried a heterozygous novel missense variant in the P2Y12 receptor, resembling a previous case of signaling defect due to a missense mutation in the gene encoding for this protein [48]. A new missense mutation affecting the thromboxane A2 receptor (p.Ser207Leu) was identified in case 37 and additional affected family members. This variant produced a hydrophobic change and could disrupt the function of the protein.

Finally, this NGS approach was very usefulness to rapid molecular diagnosed of HPS and CHS in patients 41 and 42. Mainly, HPS is a rare heterogeneous genetic disorder, in which 9 genes are involved; therefore, molecular analysis is difficult to perform [49]. In this patient, *HPS1* had previously wild type SS and NGS allowed to detect a reported deletion in *HPS4* [35]. Until now, only 36 mutations were described in *LYST/CHS1* gene [50]. In addition, molecular diagnostic is essential to confirm CHS because there is a strong correlation between genotypes/phenotype [50]. So, frameshift and nonsense mutations result in more severe and early childhood onset forms [50]. But, It have recently published two exceptions related missense mutations with a severe form of childhood onset and the leading cause of death is accelerated phase or hemophagocytic lymphohistiocytosis (LHL) [51]. *LYST* gene has 51 coding exons without hotspot, in which SS is difficult and time consuming [50]. Moreover, allogeneic transplant is the only curative option [50]. In this case, NGS enabled to rapidly identify a compound heterozygous mutation in 1-year-old boy. Consequently, prognostic and an accurate treatment could be early established.

In contrast with this type of patients, we analyzed 6 patients with mild clinical bleeding and only prolonged PFA100 tested. This approach was not critically usefulness, due to any evidence of variants were identified in these patients. These results led to according with last recommendations about the use of PFA100 in screening IPDs [4].

Although NGS technology, as the panel implemented in this study, may result in a cost-efficient approach in the clinical setting, it is necessary to be aware of some limitations. One limitation is the detection of gross abnormalities such as case 26 [52]. In this case, NGS was unable to detect any pathogenic mutation but aCGH analyses detected a 21q22 deletion resulting in *RUNX1* haploinsufficiency that could produce a

thrombocytopenia and associated anomalies depending on which adjacent genes are absent or disrupted. Another limitation of our panel was a lack of analysis in deep introns [52]. In case 27 with WAS suspicious, NGS did not find any mutation in *WAS* gene. It is well known that the most common type of mutations in *WAS* are splice site mutations, including one variant splice site mutation and five invariant splice site mutations scattered in four introns [53]. Currently, introns and splicing regions are being analyzed in this case. Moreover, in those cases without variants identified by our NGS panel whole-exome sequencing is in process. In case 29, a recently *SFLN4* gene reported in families with dominant thrombocytopenia and reduced number of dense granules in affected patients platelets, may be a candidate gene to evaluate [54]. However, a big advantage of this NGS approach is that when new IPD genes will be identified, they can be easily added to the panel [55]. As well, NGS cannot replace the clinical evaluation and platelet phenotyping as this might result in misdiagnosis of some patients. For instance, no pathogenic variants were detected in patient 31, despite an obvious GT type I platelet phenotype and absence of detectable levels of *ITGB3* mRNA by qRT-PCR [17]. This case, as well as those few GT patients described in the literature in whom no mutation in *ITGA2B* and *ITGB3* are detected, might benefit from whole genome analysis with the aim to uncover defects in regulatory elements that adversely affect the transcription or post-translational modifications and trafficking of α IIb β 3. In the same line, case 33 with high suspicion of IPD is being analyzing by whole-exome sequencing. In addition, mutations identified by targeted sequencing strategies should be validated by Sanger sequencing, and detection of deleterious variants requires the use of established bioinformatics tools and applications, and well-curated SNPs and locus specific mutation databases.

Our findings illustrate how a NGS approach including 71-candidate genes, for targeted analysis, can be used to successfully molecularly characterize most patients with IPDs, increasing the diagnostic accuracy in IT (74%) and IPFDs (62%), although, especially in mild phenotypes, remains a challenge due to most of genes have not been identified yet. It is expected that this tool can help to better understand phenotype-genotype relationships in these diseases and result in the improvement in the management of the affected patients. In addition to our NGS panel, other similar platforms are being successfully applied for selective diagnosis of IPDs, such as ThromboGenomics (<http://ThromboGenomics.org.uk>) or the NGA in the GAPP project [15].

In summary, we have successfully developed a 71-gene Next Generation DNA sequencing panel for IPD testing and identified novel genetic variants in 73% of the cases included. Our NGS approach is an accurate, reproducible and reliable tool that could assist in attaining more rapid genetic diagnosis and together with functional studies could facilitate to gain deeper insight into the molecular and genetic mechanisms underlying these defects.

Author contributions

MDR and RB performed molecular studies in the patients and drafted the article. JR, and MLL contributed to interpretation of the clinical and laboratory data. MJP, RF, LJGF, CA, MPM, EP, CA, MTA, NB, AM, TGL, BG, AEM, ARC, TS, MFL, BAR and VV provided patient samples and clinical data. NM and SP Watson contributed to critical review of the manuscript. JMB, MLL, JR, JRGP and JMHR were the principal investigators, and were responsible of the design of the study, analysis and interpretation of the data, and final writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Israels SJ, El-Ekiaby M, Quiroga T, Mezzano D. Inherited disorders of platelet function and challenges to diagnosis of mucocutaneous bleeding. *Haemophilia*. 2010;16:152-9.
2. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br J Haematol*. 2014;165:165-78.
3. 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.
4. Gresele P; Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2015;13:314-22.
5. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller B, James P, et al. ISTH/SSC joint VWF and Perinatal/Pediatric Hemostasis Subcommittees Working Group. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost*. 2010;8:2063-5.
6. Lowe GC, Lordkipanidzé M, Watson SP; UK GAPP study group Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1663-8.
7. Carubbi C, Masselli E, Nouvenne A, Russo D, Galli D, Mirandola P, Gobbi G, Vitale M. Laboratory diagnostics of inherited platelet disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52:1091-106.
8. Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br J Haematol*. 2015;170:150-61.
9. Hinckley J, Di Paola J. Genetic basis of congenital platelet disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014:337-42.
10. Watson SP, Lowe GC, Lordkipanidzé M, Morgan NV; GAPP consortium. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost*. 2013;11:351-63.
11. Daly ME, Leo VC, Lowe GC, Watson SP, Morgan NV. What is the role of genetic testing in the investigation of patients with suspected platelet function disorders? *Br J Haematol*. 2014;165:193-203.

12. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res.* 2012;5:887-900.
13. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013;369:1502-11.
14. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med.* 2014;370:2418-25.
15. Leo VC, Morgan NV, Bem D, Jones ML, Lowe GC, Lordkipanidzé M, et al; UK GAPP Study Group. Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2015;13:643-50.
16. Westbury SK, Turro E, Greene D, Lentaigne C, Kelly AM, Bariana TK, et al; BRIDGE-BPD Consortium. Human phenotype ontology annotation and cluster analysis to unravel genetic defects in 707 cases with unexplained bleeding and platelet disorders. *Genome Med.* 2015;7:36.
17. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, Velasco F, Lucia JF, Lozano M, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:213.
18. Monteferrario D, Bolar NA, Marneth AE, Hebeda KM, Bergevoet SM, Veenstra H et al. A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med.* 2014;370:245-53.
19. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999;23:147.
20. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26:589-95.
21. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011;43:491-8.
22. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet.* 2014;133:1-9.

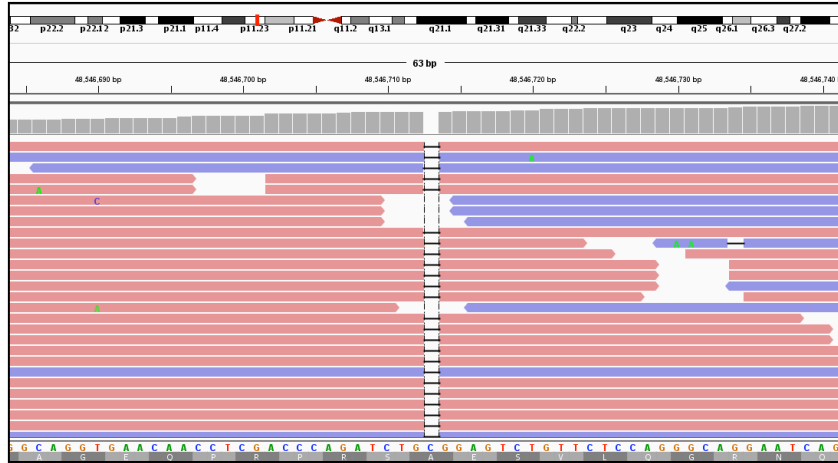
23. González-Manchón C, Larrucea S, Pastor AL, Butta N, Arias-Salgado EG, Ayuso MS, Parrilla R. Compound heterozygosity of the GPIIb/IIIa gene associated with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost.* 2001;86:1385-91.
24. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N et al. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat.* 2014;35:1033-45.
25. Blenner MA, Dong X, Springer TA. Structural basis of regulation of von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 2014;289:5565-79.
26. Pecci A, Klersy C, Gresele P, Lee KJ, De Rocco D, Bozzi V et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2014;35:236-47.
27. Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol.* 2011;154:161-74.
28. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2005;25:1215-27.
29. Buch S, Schafmayer C, Völzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H et al. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet.* 2007;39:995-9.
30. Qing L, Rui-Xing Y, Xian-Liang W, Ting-Ting Y, Lynn Htet Htet A, Dong-Feng W et al. ATP-Binding Cassette Transporter G5 and G8 Polymorphisms and Several Environmental Factors with Serum Lipid Levels. *PLoS One.* 2012; 7:e37972.
31. Wang Z, Cao L, Su Y, Wang G, Wang R, Yu Z, Bai X, Ruan C Specific macrothrombocytopenia/hemolytic anemia associated with sitosterolemia. *Am J Hematol.* 2014;89:320-4.
32. Christensen RD, Wiedmeier SE, Yaish HM. A neonate with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia associated with a chromosomal microdeletion at 21q22.11 including the gene RUNX1. *J Perinatol.* 2013;33:242-4.
33. Ambo H, Kamata T, Handa M, Kawai Y, Oda A, Murata M et al. Novel point mutations in the alphaIIb subunit (Phe289-->Ser, Glu324-->Lys and Gln747-->Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients. *Br J Haematol.* 1998;102:829-40.

34. Cattaneo M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*. 2011;117:2102-12.
35. Bachli EB, Brack T, Eppler E, Stallmach T, Trüeb RM, Huizing M, Gahl WA. Hermansky-Pudlak syndrome type 4 in a patient from Sri-Lanka with pulmonary fibrosis. *Am J Med Genet A*. 2004;127:201-7.
36. Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:22-9.
37. 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.
38. Kunishima S, Naoe T, Kamiya T, Saito H. Novel heterozygous missense mutation in the platelet glycoprotein Ib beta gene associated with isolated giant platelet disorder. *Am J Hematol*. 2001;68:249-55.
39. Noris P, Perrotta S, Bottega R, Pecci A, Melazzini F, Civaschi E, Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIb α (Bolzano mutation). *Haematologica*. 2012;97:82-8.
40. Ware J, Russell SR, Marchese P, Murata M, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest*. 1993;92:1213-20.
41. Margaglione M, D'Andrea G, Grandone E, Brancaccio V, Amoriello A, Di Minno G. Compound heterozygosity (554-589 del, C515-T transition) in the platelet glycoprotein Ib alpha gene in a patient with a severe bleeding tendency. *Thromb Haemost*. 1999;81:486-92.
42. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2014;92:276-82.
43. Bader-Meunier B, Proulle V, Trichet C, Debray D, Gabolde M, Yvart J, Dreyfus M. Misdiagnosis of chronic thrombocytopenia in childhood. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003; 25:548-52.
44. Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1285:26-43.
45. Songdej N, Rao AK. Hematopoietic transcription factor mutations and inherited platelet dysfunction. *F1000Prime Rep*. 2015;7:66.

46. Campbell AE, Wilkinson-White L, Mackay JP, Matthews JM, Blobel GA. Analysis of disease-causing GATA1 mutations in murine gene complementation systems. *Blood*. 2013;121:5218-27.
47. Matus V, Valenzuela G, Sáez CG, Hidalgo P, Lagos M, Aranda E et al. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1751-9.
48. Daly ME, Dawood BB, Lester WA, Peake IR, Rodeghiero F, Goodeve AC et al. Identification and characterization of a novel P2Y₁₂ variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study. *Blood*. 2009;113:4110-3.
49. Sánchez-Guiu I, Torregrosa JM, Velasco F, Antón AI, Lozano ML, Vicente V, Rivera J. Hermansky-Pudlak syndrome. Overview of clinical and molecular features and case report of a new HPS-1 variant. *Hamostaseologie*. 2014;34:301-9.
50. Lozano ML, Rivera J, Sánchez-Guiu I, Vicente V. Towards the targeted management of Chediak-Higashi syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:132.
51. Sánchez-Guiu I, Antón AI, García-Barberá N, Navarro-Fernández J, Martínez C, Fuster JL, et al. Chediak-Higashi syndrome: description of two novel homozygous missense mutations causing divergent clinical phenotype. *Eur J Haematol*. 2014;92:49-58.
52. Weaver JM, Edwards PA. Targeted next-generation sequencing for routine clinical screening of mutations. *Genome Med*. 2011;3:58.
53. Zhang Z-Y, Xiao H-Q, Jiang L-P, Zhou Y, Zhao Q, Yu J et al. Analysis of clinical and molecular characteristics of Wiskott–Aldrich syndrome in 24 patients from 23 unrelated Chinese families. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21:522-32.
54. Fletcher SJ, Johnson B, Lowe GC, Bem D, Drake S, Lordkipanidzé M et al. SLFN14 mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest*. 2015;125:3600-5.
55. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, van Spaendonck-Zwarts KY et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat*. 2013;34:1035-42.

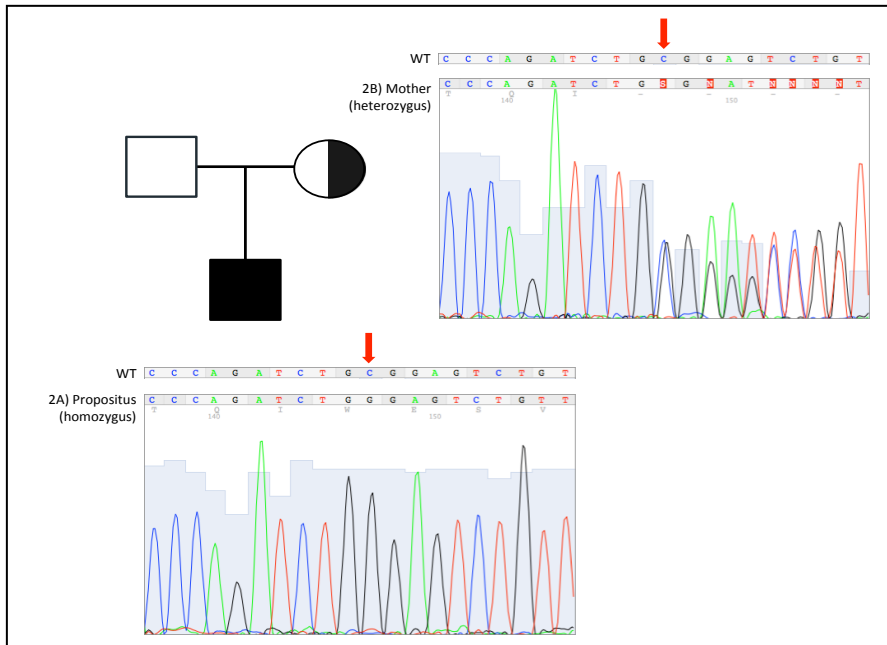
Figures and Tables

Figure 1. Mutational Analysis by Next Generation Sequencing: Hemizygous deletion 1pb (c.802delC) by Integrative Genomics Viewer.



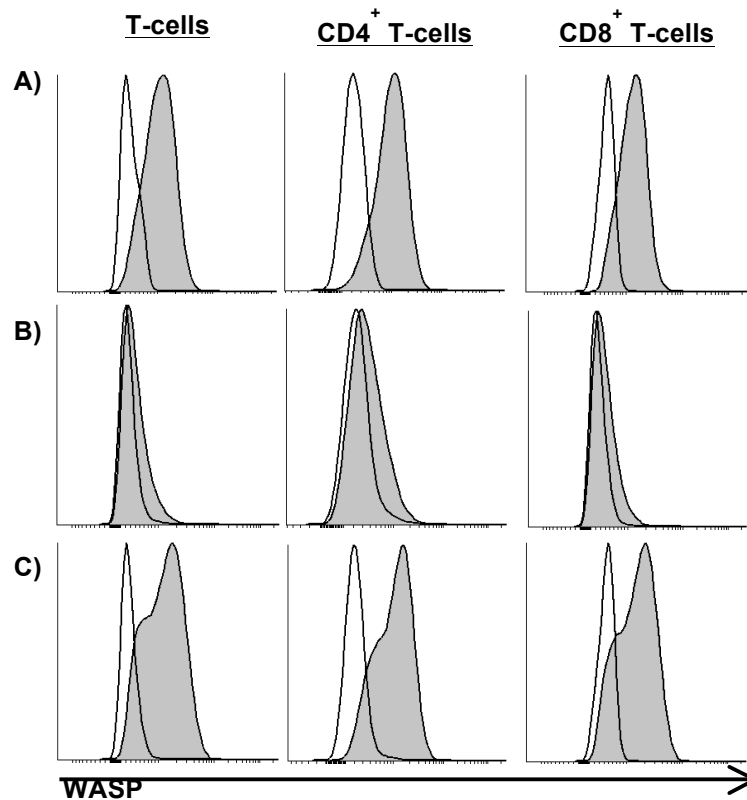
Red and blue lines represented number of reads of the sequence. Absence of reads (white) represented the cytosine deletion (c.802delC).

Figure 2. Family pedigrees (2A) and WAS mutation confirmed by Sanger Sequencing (A: patient; B: mother) (2B).



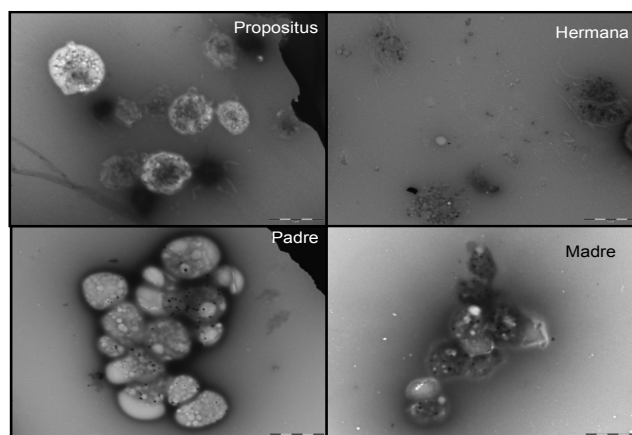
Mutation (c.802delC) was represented in hemizygous (2A) and heterozygous (2B) manner (Red arrow). The first sequence showed Wild Type (WT) sequence.

Figure 3. Analysis of WASP expression by flow cytometry:



WASp expressed in the total T-cells (left panels), CD4⁺ T-cells (middle panels) and CD8⁺ T-cells (right panels), from a healthy control (A), the patient (B) and the patient's mother (C).

Figure 4. Analysis of dense granules by electron microscopy (EM):



Dense granules were absent in “propositus” and his sister. However, dense granules were normal in parents.

Table 1. Genotype of the patients in the validation group:

Case	Diagnosis	Gene	Status	Sanger Sequencing	
				cDNA Mutation	Protein Change
1	CAMT	<i>MPL</i>	Hom	c.304C>T	p.Arg102Cys
2	CHS	<i>LYST</i>	Hom	c.11173G>A	p.Gly3725Arg
3	CHS	<i>LYST</i>	Hom	c.772T>C	p.Cys258Arg
4	GT	<i>ITGA2B</i>	C. Het	c.2944G>A c.2965G>A c.1612G>T	p.Val982Met p.Ala989Thr p.Glu538*
5	GT	<i>ITGB3</i>	C. Het	c.647A>G c.665T>C	p.Tyr216Cys p.Leu222Pro
6	BSS	<i>GP1BA</i>	Hom	c.673T>A	p.Cys225Ser
7	BSS	<i>GP9</i>	Hom	c.212T>C	p.Phe71Ser
8	BSS	<i>GP1BA</i>	Het	c.268_276delGG GACGCTG	p.Gln90_Leu92del
9	HPS	<i>HPS1</i>	Hom	c.610G>T	p.Glu204*
10	GPS	<i>GFI1B</i>	Het	c.859C>T	p.Gln287*

Abbreviations: CAMT: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia; CHS: Chediak-Higashi Syndrome; GT: Glanzmann Thrombasthenia; BSS: Bernard Soulier Syndrome, HPS: Hermansky-Pudlak Syndrome; GPS: Gray Platelet Syndrome; Hom: Homozygous; Het: Heterozygous. *: stop codon.

Table 2. Clinical and laboratory findings of patients with suspected IPDs:

Case	Age / Gender	Family history	Clinical bleeding	BAT	Platelet count (x10 ⁹ /L)	Platelet Phenotype, Other findings	Former suspicion of IPDs
11	62 / F	No	Epistaxis Skin Dental procedures	6	25	Severely impaired ristocetin-induced LTA Large platelets Absence of GPIb α	BSS
12	4 / F	No	Skin	1	89	Severely impaired ristocetin-induced LTA Large platelets 70% decrease in GPIb α expression	BSS
13	1 / M	No	-	0	20	Macrothrombocytopenia Neutrophil inclusion bodies	<i>MYH9</i> -RD
14	37 / M	No	Postoperat. bleeding	3	50	Macrothrombocytopenia Neutrophil inclusion bodies	<i>MYH9</i> -RD
15	11 / M	Yes Father	Epistaxis	2	90	Macrothrombocytopenia Neutrophil inclusion bodies	<i>MYH9</i> -RD
16	11 / F	No	Skin Menorrhagia Postoperat. bleeding	8	11	Macrothrombocytopenia Gray appearance of platelets Reduced α granules by EM	GPS
17	15 / F	Yes Sister	Skin Menorrhagia	6	80	Macrothrombocytopenia Gray appearance of platelets Reduced α granules by FCM and EM	GPS
18	35 / F	Yes Father	Epistaxis	1	138	Large platelets Slightly reduced ristocetin-induced LTA Normal expression of GPs	Dominant IT
19	53 / F	Yes Father Sibling	Menorrhagia	2	101	Large platelets Slightly reduced collagen, ADP, and epinephrine-induced LTA Normal expression of GPs	Dominant IT
20	14 / F	Yes Mother	Skin	1	85	Large platelets Normal expression of GPs	Dominant IT
21	3 / F	Yes Mother	Epistaxis	1	90	Slightly reduced ristocetin-induced LTA. Large platelets Normal expression of GPs	Dominant IT
22	5 / M	Yes Mother	Skin Epistaxis Hypovolemic shock	11	15	Thrombocytopenia with normal size. Impaired LTA. Normal expression of GPs. Refractory ITP treatments	Unknown IT
23	42 / F	No	Skin Menorrhagia	5	59	Slightly reduced collagen, ADP, and epinephrine-induced LTA Normal expression of GPs	Unknown IT
24	35 / M	Yes Aunt Cousin	Skin Epistaxis Postoperat. bleeding	14	145	Thrombocytopenia with normal size. Reduced collagen, ADP, and epinephrine-induced LTA	Unknown IT
25	3 / F	No	Skin	3	19	Thrombocytopenia with normal size. Anemia + reticulocytes. Reduced all agonist induced LTA. Reduced dense granules by FCM	Unknown IT

Resultados

26	1 / M	No	Skin Epistaxis	4	25	Thrombocytopenia with normal size. Bilateral hearing loss, corpus callosum hypoplasia, facial and cardiac anomalies.	Unknown IT
27	4 / M	Yes Mother	Skin Epistaxis	4	35	Microthrombocytopenia. Recurrent infections, eczema. Decrease of GPs	WAS
28	32 / M	No	Skin	2	43	Slightly reduced ristocetin-induced LTA. Large platelets	Unknown IT
29	6 / M	No	Skin	3	86	Large platelets. Mildly reduced ADP and TRAP-induced LTA. Reduced α and dense granules by FCM	Unknown IT
30	27 / F	Yes Sibling	Postpartum hemorrhage Postoperat. bleeding Menorrhagia	7	175	Severely reduced collagen, ADP, and epinephrine-induced LTA. 30% α IIbb3 integrin expression.	GT II
31	45 / M	No	Skin Epistaxis GI bleeding	7	160	Absent collagen, ADP, and epinephrine-induced LTA Absence α IIbb3 integrin expression	GT I
32	17 / F	No	Epistaxis bleeding gums Menorrhagia	5	280	Mildly reduced collagen, and epinephrine-induced LTA Normal expression of GPs	Signaling defect
33	49 / F	Yes Brother	Epistaxis Dental procedures GI bleeding	6	189	Slightly reduced ADP and epinephrine induced LTA. Normal expression of GPs. Normal α and dense granules by FCM	Signaling defect
34	21 / F	Yes Mother Sister	Skin Menorrhagia	3	324	Slightly reduced collagen, and epinephrine-induced LTA Normal expression of GPs	Signaling Secretion defect
35	79 / M	No	Postoperat. bleeding	3	140	Mildly reduced collagen, and epinephrine-induced LTA Normal expression of GPs	Signaling Secretion defect
36	21 / F	Yes Mother Sister	Skin Bleeding gums Menorrhagia	3	215	Slightly reduced collagen, ADP, and epinephrine-induced LTA Normal expression of GPs	Signaling Secretion defect
37	54 / F	Yes Brother Son	Postpartum Postoperat. bleeding Menorrhagia	5	193	Slightly reduced collagen, and epinephrine-induced LTA Normal expression of GPs	Signaling Secretion defect
38	16 / M	No	Skin Dental procedures Bleeding umbilical cord	4	302	Slightly reduced collagen, ADP and Ristocetine-induced LTA Normal expression of GPs	Signaling Secretion defect
39	9 / F	Yes Mother	Epistaxis	3	215	Slightly reduced Ristocetine and epinephrine -induced LTA	Signaling Secretion defect
40	27 / F	No	Bleeding gums Menorrhagia	3	320	Slightly reduced collagen, ADP and Ristocetine-induced LTA Normal expression of GPs	Signaling Secretion defect

41	18 / F	Yes Brother	Skin Postoperat. bleeding Bleeding umbilical cord	12	201	Albinism, granulomatous colitis. Reduced ADP and epinephrine -induced LTA. Reduced dense granules by FCM and EM	Hermansky- Pudlak Syndrome (HPS)
42	1 / M	No	Skin	1	180	Albinism, Neutrophil inclusion bodies, Reduced ADP and epinephrine - induced LTA. Reduced dense granules by FCM	Chediak- Higashi Syndrome (CHS)
43	35 / F	No	Menorrhagia	3	315	PFA100 Col-Epi > 300; Col-ADP=110	PFDs
44	29 / F	No	Menorrhagia Dental procedures	3	198	PFA100 Col-Epi > 300; Col-ADP=123	PFDs
45	20 / F	No	Skin Menorrhagia	2	205	PFA100 Col-Epi > 300; Col-ADP=102	PFDs
46	42 / F	No	Menorrhagia	2	273	PFA100 Col-Epi > 300; Col-ADP=134	PFDs
47	45 / F	No	Menorrhagia Postoperat. bleeding	3	178	PFA100 Col-Epi > 300; Col-ADP=175	PFDs
48	32 / F	No	Skin	2	210	PFA100 Col-Epi > 300; Col-ADP=180	PFDs

Abbreviations: BAT: Bleeding Assessment Tool; IPD: Inherited Platelet Disorder; LTA: Light Transmission Aggregometry; BSS: Bernard Soulier Syndrome, *MYH9*-RD: *MYH9* related disease; GT: Glanzmann Thrombasthenia, GPs: Glycoproteins (include GPIIb, GPIX, GPIIb, GPIIIa, GPIa); WAS: Wiskott-Aldrich Syndrome; Postoperat.: Postoperative GI: gastrointestinal; TRAP: Thrombin related activating peptide; IT: inherited thrombocytopenia; PFDs: platelet function disorders.

Table 3. 71-gene included in the NGS panel for inherited platelet disorders:

Target protein	Genes
Transcription Factors	<i>HOXA11, MPL, RBM8A, RUNX1, GATA1, FLI1, STIM1, GFI1B, CYCS, USF1</i>
Agonist platelet receptors	<i>P2RX1, P2RY1, P2RY12, TBXA2R, ADRA2A, GP6, CD36, ITGA2, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, A2M, ITGA2B, ITGB3</i>
Platelet granules	<i>NBEAL2, PLAU, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, LYST, MLPH, DTNBP1, BLOC1S3, BLOC1S6, AP3B1, VIPAS39, VPS33B, RAB27A, MYO5A, PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2, ANO6</i>
Cytoskeletal Assembly and Structural Proteins	<i>ACTN1, WAS, MYH9, FLNA, ANKRD26, ABCA1, FERMT3, MASTL, TUBB1, PRKACG, ABCG5, ABCG8</i>
Signal transduction	<i>GNAI3, GNAQ, GNAS, PLA2G4, TBXAS1, PTGS1, PLCB2, PTS, DPAGT1, DHCR24, RGS2, RASGRP2</i>

Resultados

Table 4. Molecular analysis by NGS panel related to patients only in whom variants were found:

Id	IPD	Gene	Stat.	cDNA Mutation	Protein Change	In Silico Pred		db SNP	ExAC	1000 genome
						Poly	SIFT			
11	BSS	<i>GP1BA</i>	Hom	c.673T>A	p.Cys225Ser	Ben	Del	R [23]	No Data	No Data
12	BSS	<i>GP1BA</i>	Hom	c.463C>G	p.Leu155Val	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	No Data
13	<i>MYH9</i> -RD	<i>MYH9</i>	Het	c.220A>G	p.Lys74Glu	Ben	Del	Novel	No Data	No Data
14	<i>MYH9</i> -RD	<i>MYH9</i>	Het	c.5773delG	p.Asp1925Thr fs*23	---	---	R [26]	No Data	No Data
15	<i>MYH9</i> -RD	<i>MYH9</i>	Het	c.4250G>A	p.Arg1417Gln	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	Somatic SNV Cosmic
16	GPS	<i>NBEAL2</i>	Hom	c.3422_3423 insC	p.Gly1142Arg fs*49	---	---	Novel	No Data	No Data
17	GPS	<i>NBEAL2</i>	C. Het	c.6161C>T c.6212G>C	p.Ser2054Phe p.Arg2071Pro	Poss. Dam.	Del	rs2305637 Novel	No Data	rs2305637 No Data
18	Dominant IT	<i>GP1BB</i>	Het	c.1A>T	p.Met1?	Unk.	Tol.	Novel	No Data	No Data
19	Dominant IT	<i>GP1BA</i>	C. Het	c.463C>G c.1022C>G	p.Leu155Val p.Ser341Cys	Poss. Dam.	Del	Novel Novel	No Data	No Data
20	Dominant IT	<i>TUBB1</i>	Het	c.319A>C	p.Thr107Pro	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	No Data
22	Unknown IT	<i>WAS</i>	Hem	c.802delC	p.Arg268Gly fs*40	---	---	Novel	No Data	No Data
23	Unknown IT	<i>RUNX1</i>	Het	c.476A>G	p.Asn159Ser	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	No Data
24	Unknown IT	<i>GATA1</i>	Hem	c.865C>T	p.His289Tyr	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	No Data
25	Unknown IT	<i>ABCG8</i>	C. Het	c.55G>C c.161A>G	p.Asp19His p.Tyr54Cys	Poss. Dam. Ben	Del Del	rs11887534 rs4148211	0.0561 0.4287	rs11887534 rs4148211
30	GT	<i>ITGA2B</i>	Hom	c.2333A>C	p.Gln778Pro	Ben	Tol.	R [33]	No Data	rs7747541
34	Signaling Defect	<i>GP6</i>	Het	c.708_711 delCGAA	p.Asn236Lys fs*105	---	---	Novel	0.000083	No Data
35	Signaling Defect	<i>GP6</i>	Het	c.1752_1753 insTCCC	p.Gly585Ser fs*7	---	---	Novel	0.002002	No Data
36	Signaling Defect	<i>P2RY12</i>	Het	c.835G>A	p.Val279Met	Poss. Dam.	Unk.	Novel	No Data	No Data
37	Signaling Defect	<i>TBX42R</i>	Het	c.620C>T	p.Ser207Leu	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	No Data
38	Signaling defect	<i>RUNX1</i>	Het	c.1205C>T	p.Ser402Phe	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	No Data
41	HPS	<i>HPS4</i>	Hom	c.2054delC	p.Pro685Leu fs*17	---	---	R [35]	No Data	No Data
42	CHS	<i>LYST</i>	C. Het	c.10100delA c.10095G>C c.7136T>C	p.Lys3367Arg fs*34 p.Lys3365Asn p.Leu2379Pro	Poss. Dam.	Del	Novel	No Data	No Data

Abbreviations: Id: identification of case; IPD: Inherited Platelet Disorder; BSS: Bernard Soulier Syndrome, MYH9-RD: MYH9 related disease; GPS: gray platelet syndrome; GT: Glanzmann Thrombasthenia; HPS: Hermansky-Pudlak syndrome; CHS: Chediak-Higashi syndrome; Stat.: status; Hom: homozygous; Hem: hemizygous; Het: Heterozygous; C: compound. IT: inherited thrombocytopenia; ExAC: ExAC browser with allele frequency; Poss. Dam. Possible damaging; Del.: deleterious; Tol: Tolerated; Unk: unknown; Ben: Benign; Pred.: prediction; Poly: PolyPhen-2; R: reported; dsSNP: database Single Nucleotide Polymorphism; SNV: single nucleotide variant.

CAPÍTULO 2. DESIGN AND APPLICATION OF A THIRTY ONE-GENE PANEL BY NEXT-GENERATION SEQUENCING FOR INHERITED BLEEDING COAGULATION DISORDERS

Authors: Bastida JM¹, del Rey M², Lozano ML³, Sarasquete ME¹, Benito R², Fontecha ME⁴, Fisac R⁵, García-Frade LJ⁴, Aguilar C⁶, Martínez MP⁷, Pardo E⁸, Aguilera C⁹, Pérez B¹⁰, Ramos R¹¹, Cardesa MR¹¹, Martín-Antorán JM¹², Silvestre LA¹², Cebeira MJ¹³, Bermejo N¹⁴, Riesco S¹⁵, Mendoza MC¹⁵, García-Sanz R¹, González-Díaz M¹, Hernández-Rivas JM^{1,2}, González-Porras JR¹.

Affiliations: ¹Department of Hematology, H. U. de Salamanca, IBSAL, Salamanca. ²IBSAL, IBMCC, CIC, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca. ³CRH, H. Reina Sofía, H. U. Morales Meseguer, IMIB-Arrixaca, Murcia. ⁴Department of Hematology, H. U. Río Hortega de Valladolid. ⁵Department of Hematology, H. G. de Segovia. ⁶Department of Hematology, C.A. de Soria. ⁷Department of Hematology, C.A. de Ávila. ⁸Department of Hematology, H. Virgen del Puerto de Plasencia, Cáceres. ⁹Department of Hematology, H. de El Bierzo, Ponferrada. ¹⁰Department of Hematology, C. A. de León. ¹¹Department of Hematology, H. de Mérida, Badajoz. ¹²Department of Hematology, H. Río Carrión, Palencia. ¹³Department of Hematology, H. C. U. de Valladolid. ¹⁴Department of Hematology, H. San Pedro de Alcántara, Cáceres. ¹⁵Department of Pediatrics, H. U. de Salamanca.

Abstract

Introduction. Molecular testing of Inherited bleeding coagulation disorders (IBCDs) not only offers confirmation of diagnosis, but also aids in genetic counseling, prenatal diagnosis and in certain cases genotype–phenotype correlations are important for predicting the clinical course of the disease and to allow tailor-made follow up of individuals. Until recently, genotyping has been mainly performed by Sanger sequencing, a technique known to be time consuming and expensive. Currently, Next-Generation Sequencing (NGS) offers a new potential approach that enables the simultaneous investigation of multiple genes at manageable cost.

Aim. To design and to analyze the applicability of a 31-gene NGS panel in the molecular diagnosis of patients with IBCDs.

Methods. A custom target enrichment library was designed to capture thirty-one genes known to be associated with IBCDs. Probes were generated for 343 targets to cover 101.2 kb regions (all exons and flanking regions) of these genes. Twenty-five patients with an IBCDs phenotype were studied using NGS technology.

Results. In twenty-four of twenty-five patients, our NGS approach detected causative mutations. Only, one mild type von Willebrand disease and group 0 showed any mutations. Twenty-six pathogenic mutations were found; while most of them were missense (22), four deletions were also identified. Six novel mutations affecting *F8*, *FGA*, *F11*, *F12* and *VWF*, and twenty previously reported mutations were detected. NGS and Sanger sequencing were 100% concordant.

Conclusion. Our results demonstrated that this approach could be an accurate, reproducible, and reliable tool in the rapid genetic diagnosis of IBCDs.

Introduction

Inherited bleeding coagulation disorders (IBCDs) are a heterogeneous group of coagulation factor deficiencies comprising the most prevalent Hemophilias A and B, but also rare bleeding disorders (RBDs) that involve factor II, V, VII, X, XI, XII and XIII deficiencies, prekallikrein, high molecular weight kininogen (HMWK) and fibrinogen disorders [1]. These conditions can be difficult to diagnose due to a variety of reasons, including the lack of the precise understanding of the genetic, laboratory, and clinical characteristics of the defects, in part due to the heterogeneity of the data available in the literature, and also to their low prevalence [2]. The International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) currently established varying grades of bleeding severity according to the coagulant activity of the deficient factor, although a clear correlation between laboratory phenotype and bleeding symptoms has not been well-established [3]. Although molecular testing is essential to confirm the accurate diagnosis of IBCDs, genetic characterization of patients is usually hampered by the large size and complex genomic organization of the genes involved, and by the heterogeneity of the mutations underlying these disorders. Moreover, the pattern of inheritance is also heterogeneous, since Hemophilias A and B are X-linked recessive disorders, while RBDs are generally transmitted as autosomal recessive traits, although in some cases a specific mutation might exert a dominant negative effect leading to a pattern of dominant transmission [4]. Classically, genotyping has been based in Sanger sequencing (SS) of candidate genes. However, this strategy is time consuming and expensive, due to the wide range of exons that could be involved in these disorders [5]. Currently, high-throughput genetic testing such as Next-Generation Sequencing (NGS) has revolutionized DNA sequencing technologies since it allows the simultaneous rapid investigation of multiple genes at manageable cost [6]. Additionally, NGS could help to identify genetic defects in patients who do not fall into known categories of IBCDs (eg. combined FVIII and FV deficiency, or to distinguish type 2N von Willebrand Disease (VWD) from mild/moderate hemophilia A), to have clearer understanding of genotype-phenotype relationships, and to identify affected family members as well as benefit patients from genetic counseling [7]. To address this need, the aims of this study were (a) to design a panel of genes related to inherited coagulation bleeding disorders by NGS, and (b) to evaluate the application of NGS on an IlluminaMiSeq platform for detecting mutations in 25 patients clinically diagnosed

with IBCDs. The evaluation of the genetic analysis demonstrates that this approach can reliably and accurately identify pathogenic variants in a substantial proportion of patients with IBCDs.

Materials and Methods

Patients and Samples collection

We enrolled a total of 25 patients (14 males and 11 females; median age, 28 years, ranging from 1 to 61 years old). Twenty had previously confirmed deficiencies of coagulation factors, the most common of which was FVIII (n=8, 40%), followed by fibrinogen (n=3, 15%). Of the remaining cases, 4 had decreased factor VII or XI levels (2 each), and 5 additional patients had factor IX, X, XII, XIII, or prekallikrein deficiencies (Table 1). Finally, five patients had a partial decrease in VWF levels (four cases were classified such as type 1 VWD and one patient such as type IIA VWF). All patients had isolated congenital coagulation factor deficiencies. Detailed history of bleeding tendency was taken from both the patients and their relatives. Validation studies included 5 patients that had previously been molecularly characterized by Sanger sequencing (SS) for the pathogenic mutation causing IBCD (patients 3, 10, 11, 14 and 15) (Table 1). In this validation group, all samples were blinded for NGS. The sequencing component of the NGS was validated by comparing results with previous SS. The remaining 20 patients underwent targeted analysis by NGS as the first genotyping procedure and their mutations were further confirmed by SS. Venous blood was drawn from each patient, and whole blood samples collected into commercial 7.5% K3 EDTA tubes (for DNA tests), and plasma isolated from buffered 3.2% sodium citrate (for coagulation studies) were delivered to Salamanca, Spain, where all further studies were done.

All individuals gave informed consent; the sampling from the children was carried out with the permission of the parents. Controls, patients, and relatives were fully informed of the aim of this study, which was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and it was approved by the Local Ethical Committee of Instituto de Investigacion Biomedica de Salamanca (IBSAL, Salamanca, Spain).

DNA isolation

Genomic DNA from subject samples was isolated using a DNeasy blood and tissue kit, following the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was measured using a Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Custom Panel Design, Library Preparation and Sequencing

A custom target enrichment library was designed to capture the 31 genes known to be associated with coagulation cascade disorders (Table 2). Probes were generated for 343 targets to cover 101.2 kb of the regions. It included all exons, promoter region, 3'UTR and flanking regions of each of the 31 genes. The design was performed using DesignStudio (Illumina, San Diego, CA) and the algorithm used to design probes (DesignStudio) ensured that these probes were specific to capture regions of interesting genes and therefore, not hybridized to homologous regions of the pseudogenes. The study was performed by NGS on a MiSeq Instrument, running MiSeq Control Software and according to a Nextera sequencing design (Illumina). Fifty ng of the DNA was sequenced following Illumina's standardized protocol. DNA libraries were normalized to 4 nM and pooled into equal volumes. We used the 300-cycle reagent kit. Specifically, samples were sequenced using paired 150 nt reads, multiplexing twelve dual indexed samples per run.

NGS Data Analysis

Sequenced data generated by NGS were mapped to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS; GenBank ID NC_012920.1) using the MiSeq's integrated computer software platform, MiSeq Reporter (Illumina), which uses a Burrows-Wheeler Aligner (BWA) and the Genome Analysis Tool Kit (GATK) for variant calling of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and short insertion and deletions (InDels) [8-9]. Secondary data analysis, sequence alignment and variant detection were carried out using Variant Studio Data Analysis (Illumina) and Integrative Genomics Viewer (IGV) software (BroadInstitute, Massachusetts, USA). Minimum coverage per base was 100 reads following the manufacturer's instructions (Illumina). We were successfully able to sequence 95.2% of the 343 targets regions to a minimum coverage depth of 100x at every base-pair position of interest. The full coding regions plus the promoter region, 3'UTR and non-coding DNA flanking each exon were sequenced for each of the

genes in all patients. In order to develop good quality scores for the data, we first set quality filter based on Phred score of > 20, Quality > 20 and Read coverage > 30 at each position within the reads. Then, we filtered the data, removing those variants that didn't led to amino acid change in the protein sequence. Single nucleotide variants (SNVs), InDels and splicing regions within the default quality thresholds according to phenotype were considered as causative mutations [10]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that may have an effect on coagulation factors were also considered. Allelic frequency of the variants identified was obtained from exome databases (Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA, and 1000 genomes database, Massachusetts, USA). Mutations known to cause ICBDs were identified by searching against HGMD professional database, PubMed and the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), and locus specific mutation databases such as coagulation factor variant databases (<http://www.eahad-db.org>), hemophilia A (<http://hemobase.com> and <http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>), hemophilia C (<http://www.factorxi.org>), von Willebrand disease (ISTH-SSC VWF Online Database) and fibrinogen disorders (<http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Base-de-donnees-Fibrinogene/>) [11]. To define the structural impact of novel missense mutations on protein function and their pathogenicity, different bioinformatics tools (Poly-Phen2, SIFT, SNPs&GO <http://snps.biofold.org/snps-and-go>, HANSA (<http://www.cdfd.org.in/HANSA/>) and SNAP (<https://roslab.org/services/snap/submit>) were used [12-13].

Sanger sequencing

Sanger sequencing was performed to validate all causative mutations identified by NGS. Primers were designed using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Genomic DNA was amplified with the Fast Start High Fidelity PCR System (Roche, Basel, Switzerland) following the manufacturer's instructions and including some variations of the annealing temperature. DNA sequences were evaluated using Chromas Lite v2.1.1 (Technelysium, South Brisbane, Australia) and DS Gene v1.5 (Accerlys, SanDiego, CA) softwares. Data were analyzed using annotations of genome version hg19/ GRCh37.

Results

The use of this 31-gene panel approach allowed us to identify the causative mutations of the IBCDs in all patients (Table 3). Overall, 26 pathogenic mutations were found, including six novel mutations. Of the twenty-six variants, 22 were missense mutations, and 4 were frameshift changes due to microdeletions. The 31-gene panel was validated using samples from the five patients that had been previously molecularly characterized by Sanger sequencing of a single gene (Table 1). Sequencing results were 100% concordant, and included the detection of 5 single base substitutions within 5 different genes (*F8*, *FGG*, *F7*, *F11* and *F13A1*). Analytical sensitivity and specificity of the NGS was therefore 100%. As the 31-gene NGS panel demonstrated high sensitivity and specificity in the validation trial, we used this assay as the first genotyping method in a cohort of 20 patients with functionally characterized IBCDs, and mutations were in every case confirmed by subsequent Sanger sequencing. Regarding patients with factor VIII deficiency, hemophilia A was confirmed in seven out of 8 patients, being severe in one case (patient 1, in whom introns 1 and 22 inversions had been previously excluded), and mild in the other six (mean FVIII:C levels of 30%, range 25-40%). Out of seven mutations identified causing hemophilia A, two were novel variants (table 3). One of them was a microdeletion (c.5803delT) that led to a premature stop codon 10 amino acids downstream the mutation (p.Tyr1935fs*10). The other novel missense mutation (c.197A>T) in exon 2 of *F8*, identified in patient 2, induced an aminoacid change (p.Lys66Ile). This aminoacid substitution was predicted to have a potentially damaging effect on the protein. The molecular characterization of the other five patients, all diagnosed with mild hemophilia A, resulted in the identification of five previously described missense mutations (Table 3). In the only patient not exhibiting a mutation in *F8* gene, a female who was suspected to be a symptomatic carrier of Hemophilia A (case 20) (Table 1), our NGS panel identified a homozygous missense mutation (c.2561G>A) in exon 20 of the *VWF* gene, which consisted of a protein change (p.Arg854Gln) in the FVIII-binding domain of VWD.

Amongst three patients that been referred for molecular characterization with fibrinogen deficiencies, in all cases (cases 8-10), functional and immunological fibrinogen were concordantly reduced, consistent with hypodysfibrinogenemia (Table 1). Patient 8, with a mild bleeding history, showed a novel heterozygous mutation in exon 5 of *FGA* resulting in a premature stop codon (p.Gly552Alafs*16) caused by a single thymine nucleotide deletion at position 1653 (c.1653delT). In the other two

patients (one detected during routine perioperative screening and the other suffering from both bleeding and thrombotic episodes), our diagnostic approach detected 2 different heterozygous missense mutations in exon 8 of the *FGG* gene affecting the same aminoacid (p.Arg301Cys -Fibrinogen Tokyo 2-, and p.Arg301His -Fibrinogen Haifa 1-) (Table 3).

As for factor VII defects, one of the patients (case 11) presented a severe deficiency (2%) without reporting significant bleeding symptoms; however, a patient (case 12), with slightly reduced FVII levels (39%) exhibited bleeding early in her life (Table 1). In both cases, a heterozygous mutations was identified in exon 9 of *F7* gene (c.1171G>A, and c.1074G>A), predicting a p.Gly391Ser and p.Met358Ile substitution, respectively (Table 3).

Two patients were included in this study being diagnosed with FXI deficiency, displaying a bleeding tendency detected following surgical procedures. One patient (case 13) was confirmed to have a novel heterozygous mutation in exon 10 of *F11*(p.Gly227Asp). The other patient (case 14) presented a heterozygous missense mutation (c.1789G>A) in exon 15 (p.Glu597Lys)(Table 3).

The molecular characterization of the remaining five patients resulted in the identification of 8 molecular variants, including 2 novel mutations (Table 3). One homozygous mutation in *F13A1*, p.Met243Thr, corroborated the diagnosis of FXIII deficiency in one patient (case 15). Prekallikrein deficiency was confirmed in one individual (case 16) with compound heterozygous missense mutations in *KLKB1* (p.Ser143Asn, and p.Cys548Tyr) while the molecular diagnosis of hemophilia B was attained in one patient (case 17) by the identification of the p.Thr342Met mutation in *F9*. Two compound mutations in *F10*, p.Glu142Lys, and the novel p.Ile451Leu were detected in patient 18 with FX deficiency. A novel heterozygous missense mutation, p.Cys98Tyr, was identified in exon 5 of *F12* gene in a patient with a family history of FXII deficiency (case 19).

Four out of five mutations were identified in *VWF* gene in VWD patients (cases 21 to 25) by our NGS approach (Table 3): a novel deletion (c.553delT) in exon 6 was detected in case 21; Sanger sequencing confirmed the heterozygous mutation in her mother. This mutation (p.Tyr185Met fs*9) affected to D1 domain of the propolypeptide and would decrease the multimerization. A previously Timidine deletion (c.376delT) in exon 5 was found in case 22. Case 23 and his mother had a previously reported heterozygous missense mutation (c.2771G>A) in exon 21

(p.Arg924Gln). In the fourth case of IA VWD (case 24) no pathogenic mutation was found by NGS. Finally, a previously reported heterozygous missense mutation (c.4121G>A) in exon 28 (p.Arg1374His) was identified in case 25 and confirmed in her father.

Discussion

Over the last 10 years, we have witnessed an evolution in sequencing technologies and instead of gene-by-gene approaches. These technologies, that allow the analysis of large sets of genes by NGS, are slowly replacing traditional screening methods. ICBDs typically comprise monogenic disorders that can be clinically indistinguishable from each other, with a bleeding tendency that may even overlap with that of normal individuals [14], and with a diagnosis that usually relies on the assessment of a coagulation factor defect. However, the assays and reagents generally used to quantify coagulation factor levels are highly variable and dependent on pre-analytical and analytical aspects, so that repeat testing is mandatory to confirm a defect before establishing a specific diagnosis [15]. Diagnosis confirmation of ICBDs at a molecular level can facilitate the differentiation of these disorders, and help provide a proper treatment to patients. Other significant advantages of reaching a molecular diagnosis in this scenario are: a) to determine carrier status; b) be useful for prenatal diagnosis; c) and this characterization could potentially assist to predict the likelihood of inhibitor development and anticipate responsiveness to immune tolerance induction in hemophilia cases [16].

Using a targeted sequencing, based diagnostic gene panel, for the first time as a diagnostic tool for patients with ICBDs, we were able to achieve a molecular characterization in all patients that had previously diagnosed of coagulation factor deficiency by a traditional functional approach. Although most patients with ICBDs typically present for management of a previous diagnosed disorder in the family, there is a large percentage of *de novo* mutations, and in that regard, interestingly near half of the patients (44%) that were enrolled in this study had no family history suggesting a coagulation factor defect [17]. Our NGS approach allowed us to analyze simultaneously multiple genes possibly involved in ICBDs using a single laboratory pipeline, to identify patients with the so-called contact system defects, including prekallikrein, FXII and HMWK, which are not routinely contemplated in genetic assays [15], and to correctly characterize a patient with type VWD-2N who had been

assumed to be a hemophilia A carrier. Six novel pathogenic variants were identified using this extensive gene panel.

In hemophilia A, the use of panel sequencing is an appropriate initial approach for molecular characterization of patients with mild to moderate disease, since missense mutations within the exons coding for the three A domains or the two C domains account for most of the genetic variants detected, as well as in intron 1 and 22 inversion negative patients (approximately half of them) with the severe disorder [16]. Two novel pathogenic mutations were detected in patients with hemophilia A: in case 1, with a severe disease, in whom inversions had been previously excluded, a microdeletion in exon 18 which produced a frameshift with a premature stop codon (p.Tyr1935fs*10) was identified. This mutation affected to A3 domain of FVIII and induced a severe decrease of this protein (1%). The second novel variant recognized in a patient with a mild disease (p.Lys66Ile) resulted in a change to a charged amino acid in the polar region of the A1 domain that disrupted the protein functionally. The molecular characterization of the other five patients (cases 3 to 7), all diagnosed with mild hemophilia A, resulted in the identification of 5 additional molecular variants consisting on five previously described missense mutations [18-22].

Hypo-dysfibrinogenemias are generally caused by missense heterozygous mutations, even though homozygous or compound heterozygous patients have been reported [23]. In addition, hypo-dysfibrinogenemia results from substitutions/truncations in any of the three-fibrinogen genes, often involving the globular domains of the molecule [23]. The investigation of the genetic basis of hypo-dysfibrinogenemia in three unrelated patients revealed three different variants, two previously described, affecting *FGG* -Arg301 [24], and a novel mutation (*FGA* - p.Gly552Ala fs*16) (Table 3) which might potentially decrease secretion and therefore, protein levels.

The three additional novel mutations identified were missense heterozygous variations affecting to *F11* and *F12*, respectively, and a new compound heterozygous mutation in *F10*. As for the *F11* novel mutation (p.Gly227Asp), it affected the third apple domain of FXI harboring a binding site for platelets in the presence of HMWK, suggesting that the protein structure disruption may be secondary to hetero-dimer trapping and could affect the correct folding and expression of the protein. Similarly, a mechanism of disrupted protein and therefore decrease of FXII levels, was established after detecting a novel missense (p.Cys98Tyr) mutation in *F12* gene, close to a disulfide

bond in position 98 of the EGF-like 1 domain. NGS testing in case 18 enabled the identification of a compound heterozygous mutations consisting on the already described p.Glu142Lys, which disrupts the calcium binding complex, and a p.Ile451Leu variant affecting the serin-protease domain in the catalytic region [33].

Differentiating VWD-2N from mild/moderate hemophilia A is crucial for both genetic counseling and therapy. VWD-2N is rare in comparison to hemophilia A with about 1 patient with VWD-2N for every 100 males with hemophilia A [34]. For that reason, males with VWD-2N may be misdiagnosed as mild/moderate hemophilia A while females may be considered to be hemophilia A carriers [35]. We included a female patient who presented with a low FVIII:C (30%) and minimally reduced/normal VWF (60%) who was assumed to be a carrier for hemophilia A. By applying gene panel sequencing as a diagnostic tool, she was found to be a homozygous carrier of the mutation pArg854Gln in *VWF*, the most common mutation in VWD-2N, present in about 85% of the cases [36]. These highlights of the recommendation to consider VWD-2N in patients with low FVIII:C in the context of failure to identify a hemophilic mutation, FVIII:C:VWF ratio <0.9, or inadequate response to rFVIII [34]. On the other hand, VWD is the most frequent inherited bleeding disorder [37]. It is caused by a quantitative (types 1 and 3) or qualitative (type 2) defect of von Willebrand factor (VWF). Clinical diagnosis of VWD, particularly type 1, can be complex because several variables (e.g. blood group, age, sex, exercise, oral contraceptive use) can influence VWF plasma levels. Accurate diagnosis is crucial, to drive correct treatment [37]. Molecular diagnosis is particularly hampered by the following factors: the large size of *VWF* (178 kb), which is comprised of 52 exons; presence of a highly homologous (>96% homology) partial pseudogene in chromosome 22; the fact that *VWF* is highly polymorphic; and, lastly, the diagnosis of type 1 VWD is linked to VWF only in around 41% to 70% of families [37,38]. In accordance with previously reported, molecular characterization was established in 3 out of 4 patients with mild phenotype [37]. A reported mutation (in patient 25) was located in exon 28 [37]. Moreover, *VWF* molecular analysis by NGS had been recently published and seems to support NGS as a first line efficient and faster paradigm in VWD diagnosis [39].

Applying NGS using gene specific panels with target capture sequencing as a diagnostic tool has many advantages, including the simultaneous detection in a single assay of substitutions, small duplications, insertions, deletions, and InDels in many genes [40]. So, this approach could be especially useful in the molecular

characterization of disorders frequently caused by single nucleotide variants, such as IBCDs. However, understanding the limitations of this approach is important, because a lack of diagnosis may result from mutations that are in deep introns, gross abnormalities, rearrangements, large deletion/insertion or total exon deletions that are not detected by sequencing-based technology [41]. In these cases, other approaches such as Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) or array comparative genome hybridization (aCGH) (for the identification of large deletions/duplications), or Long-PCR (detection of exon deletions) could be employed [42]. While NGS platforms are initially expensive, these technologies improve both speed and cost compared to Sanger sequencing, at a much more favorable reagent/cost relationship (in our panel the calculated cost in reagents was 350\$). It is expected that further analyses including larger number of samples will help cover sufficient numbers of all variant types for clinical application.

Conclusion

Inherited coagulation disorders could be successfully molecularly characterized by using our 31-gene Next Generation DNA Sequencing panel. This approach allowed the diagnosis of the disease at a molecular level in all patients, and the identification of novel genetic variants in 25% of the cases included. Molecular characterization using this extensive gene panel is expected to expand the knowledge of critical domains of specific coagulation factors as well as increase the known mutation spectrum in these disorders, facilitate diagnosis of IBCDs and help provide proper treatment to patients.

Author contributions

MDR, RB and MES performed molecular studies in the patients. MEF, RF, LJGF, CA, MPM, EP, CA, BA, RR, MRC, JMA, LAS, MJC, NB, SR, MCM, RGS and MGD contributed to interpretation of the clinical and laboratory data. JMB contributed to the analysis and the interpretation of the molecular analysis, and wrote the article. MLL contributed to critical review of the manuscript. JRGP and JMHR were the principal investigators, and were responsible of the design of the study and final writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Mannucci PM. Introduction. Rare bleeding disorders: general aspects of clinical features, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35:349-55.
2. Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD et al. The rare coagulation disorders--review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia.* 2004;10:593-628.
3. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, Manco-Johnson MJ, van den Berg HM, Srivastava A. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12:1935-9.
4. Peyvandi F, Bolton-Maggs PH, Batorova A, De Moerloose P. Rare bleeding disorders. *Haemophilia.* 2012;18:148-53.
5. Kingsmore SF, Saunders CJ. Deep sequencing of patient genomes for disease diagnosis: when will it become routine? *Sci Transl Med.* 2011;3:87ps23.
6. Lu JT, Campeau PM, Lee BH. Genotype-Phenotype Correlation Promiscuity in the Era of Next-Generation Sequencing. *New Engl J Med.* 2014;371:593-6.
7. Peyvandi F, Kunicki T, Lillicrap D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood.* 2013;122:3423-31.
8. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999;23:147.
9. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26:589-95.
10. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011;43:491-498.
11. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet.* 2014;133:1-9.
12. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter 7:Unit7.20.doi:10.1002/0471142905.hg0720s76.

13. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4:1073-81.
14. James P, Salomon O, Mikovic D, Peyvandi F. Rare bleeding disorders- bleeding assessment tools, laboratory aspects and phenotype and therapy of FXI deficiency. *Haemophilia.* 2014;20:71-5.
15. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol.* 2013;35:1-13.
16. Coppola A, Margaglione M, Santagostino E, Rocino A, Grandone E, Mannucci PM, Di Minno G; AICE PROFIT Study Group. Factor VIII gene (F8) mutations as predictors of outcome in immunetolerance induction of hemophilia A patients with high-responding inhibitors. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1809-15.
17. Goodeve AC, Perry DJ, Cumming T, Hill M, Jennings I, Kitchen S et al. Genetics Of haemostasis. *Haemophilia.* 2012;18:73-80.
18. Schwaab R, Oldenburg J, Schwaab U, Johnson DJ, Schmidt W, Olek K et al. Characterization of mutations within the factor VIII gene of 73 unrelated mild and moderate haemophilias. *Br J Haematol.* 1995;91:458-64.
19. Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, Wermes C, Pollmann H, Todorova A et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat.* 2007;28:54-60.
20. Fernández-López O G-LJ, Núñez-Vázquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldán A. The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica.* 2005;90:707-10.
21. Gallardo (2005) F8 Locus-specific database Unpublished.
22. Eckhardt CL, Menke LA, van Ommen CH, van der Lee JH, Geskus RB, Kamphuisen PW et al. Intensive peri-operative use of factor VIII and the Arg593->Cys mutation are risk factors for inhibitor development in mild/moderate hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2009;7:930-7.
23. deMoerloose P, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35:356-66.
24. Borrell M, Garí M, Coll I, Vallvé C, Tirado I, Soria JM et al. Abnormal polymerization and normal binding of plasminogen and t-PA in three new

- dysfibrinogenemias: Barcelona III and IV (gamma Arg 275-->His) and Villajoyosa (gamma Arg 275-->Cys). *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995;6:198-206.
25. Millar DS, Kemball-Cook G, McVey JH, Tuddenham EG, Mumford AD, Attock GB et al. Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. *Hum Genet*. 2000;107:327-42.
 26. Bernardi F, Liney DL, Patracchini P, Gemmati D, Legnani C, Arcieri P et al. Molecular defects in CRM+ factor VII deficiencies: modeling of missense mutations in the catalytic domain of FVII. *Br J Haematol*. 1994;86:610-8.
 27. Lippi G, Favaloro EJ. The missing link between genotype, phenotype and clinics. *Biochem Med*. 2009;19:137-45.
 28. Quélin F, Mathonnet F, Potentini-Esnault C, Trigui N, Peynet J, Bastenaire B et al. Identification of five novel mutations in the factor XI gene (F11) of patients with factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17:69-73.
 29. Mikkola H, Syrjälä M, Rasi V, Vahtera E, Hämäläinen E, Peltonen L et al. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII two novel point. *Blood*. 1994;84:517-25.
 30. Katsuda I, Maruyama F, Ezaki K, Sawamura T, Ichihara Y. A new type of plasma prekallikrein deficiency associated with homozygosity for Gly104Arg and Asn124Ser in apple domain 2 of the heavy-chain region. *Eur J Haematol*. 2007;79:59-68.
 31. Lombardi AM SM, Cabrio L, Fadin M, Zanon E, Girolami A. Severe prekallikrein (Fletcher factor) deficiency due to a compound heterozygosis (383Trp stop codon and Cys529Tyr). *Thromb Haemost*. 2003;90:1040-5.
 32. Chen SH, Zhang M, Lovrien EW, Scott CR, Thompson AR. CG dinucleotide transitions in the factor IX gene account for about half of the point mutations in hemophilia B patients: a Seattle series. *Hum Genet*. 1991;87:177-82.
 33. Marchetti G, Castaman G, Pinotti M, Lunghi B, Di Iasio MG, Ruggieri M et al. Molecular bases of CRM+ factor X deficiency: a frequent mutation (Ser334Pro) in the catalytic domain and a substitution (Glu102Lys) in the second EGF-like domain. *Br J Haematol*. 1995;90:910-5.
 34. Gupta M, Lillicrap D, Stain AM, Friedman KD, Carcao MD. Therapeutic consequences for misdiagnosis of type 2N von Willebrand disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57:1081-3.

35. Boylan B, Rice AS, De Staercke C, Eyster ME, Yaish HM, et al. Hemophilia Inhibitor Research Study Investigators. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations. *J Thromb Haemost.* 2015;13:1036-42.
36. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. Type 2N von Willebrand disease: Clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis, and molecular biology. *Best Practice Res Clin Hemat.* 2001;14:337-347.
37. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:254-60.
38. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2014;167:453-65.
39. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Corrales I, López-Fernández MF, Rodríguez-Trillo Á, Lourés E et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost.* 2015;114. [Epub ahead of print].
40. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 2013;34:1035-42.
41. Weaver JM, Edwards PA. Targeted next-generation sequencing for routine clinical screening of mutations. *Genome Med.* 2011;3:58.
42. Daber R, Sukhadia S, Morrissette JJ. Understanding the limitations of next generation sequencing informatics, an approach to clinical pipeline validation using artificial data sets. *Cancer Genet.* 2013;206:441-8.
43. Corrales I, Ramírez L, Altisent C, Parra R, Vidal F. Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene. *Thromb Haemost.* 2009;101:570-6.
44. Casais P CG, Woods AI, Kempfer AC, Farías CE, Grosso SH, Lazzari MA. R924Q substitution encoded within exon 21 of the von Willebrand factor gene related to mild bleeding phenotype. *Thromb Haemost.* 2006;96:228-30.

Table 1. Clinical characteristics and laboratory findings in a cohort of 25 patients with coagulation factor deficiencies.

ID	Clinical Bleeding	Age/ Sex	Family History	Factors Ext. (%)	Factors Int. (%)	Previous Sanger Sequencing Mutation
1	Epistaxis	1/M	No	---	FVIII=1	No
2	Preoperative study Rectorrhagia (GI)	26/M	No	---	FVIII=26	No
3	Dental extraction	37/M	Yes	---	FVIII=25	c.6113A>G in <i>F8</i>
4	Dental extraction	35/M	Yes	---	FVIII=32	No
5	Easy bruising	8/M	Yes	---	FVIII=34	No
6	Following trauma	6 / M	No	---	FVIII=40	No
7	Preoperative study	42/M	No	---	FVIII=27	No
8	Easy bruising Mucocutaneous Fetal loss	36/F	Yes (Mother)	---	---	No
9	Preoperative study	25/M	Yes (Father)	---	---	No
10	Postsurgical Intrauterine fetal death; PE	34/F	No	---	---	c.902G>A in <i>FGG</i>
11	Preoperative study	22/F	Yes (Father)	FVII=2	---	c.1171G>A in <i>F7</i>
12	Rectorrhagia	16/M	No	FVII=39	---	No
13	Dental extraction Postsurgical	61/M	Yes (Father)	---	FXI=30	No
14	Postsurgical	23/F	Yes (Mother)	---	FXI=25	c.1789G>A in <i>F11</i>
15	Following trauma	23/F	No	---	FXIII=1	c.728T>C in <i>F13A1</i>
16	Preoperative study	14/F	No	Prek<2	---	No
17	Easy bruising Following trauma	1/M	Yes	---	FIX=3	No
18	Hematuria	10/M	No	FX=40	---	No
19	Preoperative study	42/F	Yes (Father)	---	FXII=32	No
20	Menorrhagia Epistaxis	35/F	No	---	FVIII=30	No
21	Menorrhagia Epistaxis	20/F	Yes (Mother)	---	FVIII=80 VWF Ac=29 VWF Ag=34	No
22	Postsurgical	50/M	Yes (Brother)	---	FVIII=85 VWF Ac=45 VWF Ag=52	No
23	Epistaxis Gingivorrhagia	5/M	Yes (Mother)	---	FVIII=65 VWF Ac=45 VWF Ag=49	No
24	Menorrhagia	43/F	No	---	FVIII=72 VWF Ac=53 VWF Ag=51	No
25	Menorrhagia	41/F	Yes (Mother)	---	FVIII=83 VWF Ac=20 VWF Ag=54	No

Abbreviations: Factors Ext (%): Extrinsic coagulation factor activity; Factors int (%): Intrinsic coagulation factor activity; M: male; F: female; Prek: prekallikrein; VWF (Ag/Ac): von Willebrand Factor Antigen/Activity; PE: pulmonary embolism.

Table 2. Genes included in the panel.

Hemostasis function	Genes
Intrinsic pathway	<i>KLKB1, HRG, KNG1, F12, F13A1, F13B, F11, F8, F9, VWF</i>
Extrinsic pathway	<i>F2, F3, F5, F7</i>
Vitamin-K dependent-carboxylation	<i>GGCX, VKORC1, F10</i>
Combined factor synthesis	<i>MCFD2, LMAN1</i>
Fibrinolysis	<i>PLAT, PLAUR, PLG, PLGRKT, TFPI</i>
Fibrinogen synthesis	<i>FGA, FGB, FGG, FIBCD1</i>
Complement system	<i>C1QBP, CLEC3B, CPB2</i>

Table 3. Molecular characterization and *in silico* prediction of the effect of the variants.

Id	Specific Phen.	Gene	Stat.	cDNA Mutation	Protein Change	dbSNP	In Silico Pred.		Ref
							Poly.	SIFT	
1	Hemop. A	<i>F8</i>	Hem	c.5803delT	p.Tyr1935Ile fs*10	---	---	---	N
2	Hemop. A	<i>F8</i>	Hem	c.197A>T	p.Lys66Ile	---	PD	Delt	N
3	Hemop. A	<i>F8</i>	Hem	c.6113A>G	p.Asn2038Ser	rs137852454	Ben	Tol	[18]
4	Hemop. A	<i>F8</i>	Hem	c.575T>C	p.Ile192Thr	---	PD	Delt	[19]
5	Hemop. A	<i>F8</i>	Hem	c.6623A>G	p.Gln2208Arg	---	PD	Tol	[20]
6	Hemop. A	<i>F8</i>	Hem	c.6750A>C	p.Gln2250His	---	PD	Delt	[21]
7	Hemop. A	<i>F8</i>	Hem	c.1834C>T	p.Arg612Cys	rs137852428	PD	Delt	[22]
8	Hypodysf.	<i>FGA</i>	Het	c.1653delT	p.Gly552Ala fs*16	---	---	---	N
9	Hypodysf.	<i>FGG</i>	Het	c.901C>T	p.Arg301Cys	rs121913087	PD	Delt	[24]
10	Hypodysf.	<i>FGG</i>	Het	c.902G>A	p.Arg301His	rs121913088	PD	Delt	[24]
11	FVII Def.	<i>F7</i>	Het	c.1171G>A	p.Gly391Ser	rs190485816	PD	Delt	[25]
12	FVII Def.	<i>F7</i>	Het	c.1074G>A	p.Met358Ile	rs149283257	Ben	Delt	[26]
13	Hemop. C	<i>F11</i>	Het	c.680G>A	p.Gly227Asp	---	Ben	Delt	N
14	Hemop. C.	<i>F11</i>	Het	c.1789G>A	p.Glu597Lys	rs281875251	PD	Delt	[28]
15	FXIII Def.	<i>F13A1</i>	Hom	c.728T>C	p.Met243Thr	rs267606788	PD	Delt	[29]
16	Prekall. Deficiency	<i>KLKB1</i>	C. Het	c.428G>A	p.Ser143Asn	rs3733402	Ben	Tol	[30]
				c.1643G>A	p.Cys548Tyr	rs121964951	PD	Delt	[31]
17	Hemop. B	<i>F9</i>	Hom	c.1025C>T	p.Thr342Met	---	PD	Delt	[32]
18	FX Def.	<i>F10</i>	C. Het	c.424G>A	p.Glu142Lys	rs61753266	Ben	Tol	[33]
				c.1351A>C	p.Ile451Leu	rs369872236	PD	Delt	
19	FXII Def.	<i>F12</i>	Het	c.293G>A	p.Cys98Tyr	---	PD	Delt	N
20	2N-VWD	<i>VWF</i>	Hom	c.2561G>A	p.Arg854Gln	rs41276738	PD	Delt	[36]
21	1A-VWD	<i>VWF</i>	Het	c.553delT	p.Tyr185Met fs*9	---	---	---	N
22	1A-VWD	<i>VWF</i>	Het	c.376delT	p.Tyr126Thr fs*49	---	---	---	[43]
23	1A-VWD	<i>VWF</i>	Het	c.2771G>A	p.Arg924Gln	rs33978901	PD	Tol	[44]
24	1A-VWD	---	---	---	---	---	---	---	---
25	2A-VWD	<i>VWF</i>	Het	c.4121G>A	p.Arg1374His	rs61750072	PD	Delt	[43]

Abbreviations. Id: identification/case; Phen: phenotype; Def.: Deficiency; Hemop.: Hemophilia; Hypodysf.: Hypodysfibrinogenemia; Dysfibrin.: Dysfibrinogenemia; Prekall.: Prekallikrein; VWD: von Willebrand Disease; Stat.: status; Het: Heterozygous; Hem: Hemizygous; Hom: Homozygous; C. Het.: Compound Heterozygous; dbSNP: database Single Nucleotide Polymorphism; Predict.: prediction; Poly: Poly-Phen 2 (Polymorphism Phenotyping v2); SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant; PD.: Possible Damaging; Delt.: Deleterious; Tol.: Tolerant; Ben: Benign; Ref: Reference; N: novel.

CAPÍTULO 3. APLICACIÓN CLÍNICA DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS TRASTORNOS PLAQUETARIOS HEREDITARIOS

3.1. Introducción

En este capítulo presentamos dos ejemplos de la utilidad clínica de la tecnología de secuenciación masiva (NGS), en el diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios que presentan un fenotipo inespecífico a pesar de haber realizado multitud de estudios.

El primer caso (apartado 3.2.) hace referencia al diagnóstico de una paciente de 13 años con trombocitopenia neonatal asociada a malformaciones neurológicas y renales principalmente. En primer lugar se descartó una trombocitopenia inmune neonatal mediante el estudio de anticuerpos específicos. En segundo lugar y en repetidas ocasiones (anualmente), se realizó el despistaje de una hemopatía maligna mediante el estudio de la médula ósea por morfología, citometría de flujo, biología molecular y citogenética. El estudio del cariotipo/FISH no mostró alteraciones cromosómicas y se descartó la delección de la región 22q11.2. (despistaje de síndrome Di George). En el contexto de trombocitopenia neonatal se llevó a cabo el despistaje de una trombocitopenia amegacariocítica congénita, mediante el análisis de todos los exones codificantes de *MPL*, y del síndrome de Wiskott-Aldrich, al analizar, también, los exones de *WAS*. Además de los estudios referentes al trastorno hematológico, la paciente ha sido evaluada por múltiples especialistas, debido al fenotipo sindrómico que presentaba (genetistas, estudio MLPA telomérico, CGH arrays; hipoplasia del cuerpo calloso y retraso psicomotor, neurología; alteración en el comportamiento, psiquiatría; agenesia renal, nefrología). La aplicación de la tecnología NGS permitió identificar una variante genética en el gen *FLNA*. Las alteraciones en este gen se relacionan con un grupo heterogéneo de trastornos denominados filaminopatías. Estas enfermedades se caracterizan por malformaciones neurológicas y pueden asociar una trombocitopenia moderada-grave desde el nacimiento. Una característica recurrente es la presencia de nódulos de sustancia gris heterotópica a nivel periventricular.

Retrospectivamente, en la resonancia magnética nuclear (RMN) donde se había objetivado la hipoplasia del cuerpo caloso, se describían esos nódulos característicos de estas enfermedades. La predicción patogénica de la variante encontrada (c.3695C>T) mediante los modelos *in silico* la correlación del fenotipo con el genotipo avalan el diagnóstico final.

El segundo caso, un varón de 9 años, presentaba una larga historia de episodios hemorrágicos graves. La sospecha inicial fue una TG, al presentar una LTA patológica para ADP y colágeno. Sin embargo, el estudio de CMF no demostró las alteraciones específicas en las glicoproteínas de membrana, propias de TG ni las alteraciones moleculares (*ITGA2B*, *ITGB3*). La repetición de pruebas de hemostasia, principalmente, en cada evento hemorrágico grave, fue una pauta constante, así como la multitud de tratamientos empleados en cada episodio. La aplicación de la NGS identificó la segunda variante genética descrita en el gen *RASGRP2*. En primer lugar, este hallazgo permitió encaminar el estudio a la demostración de la alteración en la expresión de la proteína codificada CalDAG-GEFI en las plaquetas del “propósitus”. Posteriormente, se comprobó la disminución de la actividad catalítica en la proteína mutada en un modelo celular que facilitó establecer la correlación los datos obtenidos y proponer un nuevo mecanismo etiopatogénico causante de la trombopatía hereditaria TG-like. Con este trabajo agradecemos y recalamos la necesidad de colaboración de los distintos grupos de investigación en TPHs. En este caso, la colaboración con los laboratorios de los Dres. Steve P. Watson (Institute of Cardiovascular Sciences, Birmingham, UK) y Wolfgang Bergmeier (McAllister Heart Institute, North Carolina, CA, USA) ha permitido el desarrollo del modelo celular que confirmó la correlación fenotípica con la mutación detectada.

3.2. Target gene panel related to inherited platelet disorders identified a novel missense mutation in *FLNA* gene. Next-Generation sequencing: an approach to assist in clinical and genetic diagnostic.

Authors: Bastida JM¹, Rivera J², Del Rey M³, Benito R³, Lozano ML², Riesco S⁴, Hortal A⁴, Fisac R⁵, Aguilar C⁶, Pardal E⁷, Bermejo N⁸, Llinares ME⁹, Fuster V⁹, Hernández-Rivas JM^{1,3}, González-Porras JR¹.

Affiliations: ¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL; ²Centro Regional Hemodonación. Hospital Morales Messeguer-IMIB, Murcia; ³Hospital Universitario Salamanca-IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC; ⁴Servicio de Pediatría. Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL; ⁵Hospital General de Segovia; ⁶Complejo Asistencial de Soria; ⁷Hospital Virgen del Puerto, Plasencia; ⁸Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres; ⁹Servicio Pediatría, H. Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

Abstract

Nowadays, pathogenesis, genetics and clinical aspects of inherited thrombocytopenias (ITs) have recently increased and novel disorders have been identified. However, ITs are misdiagnosis as acquired disorders. It clearly indicates that recognizing ITs is not always easy and that correct diagnosis is often delayed resulting in inappropriate treatments. To define diagnosis often requires complex laboratory techniques and identification of pathogenic mutations is desirable to proper diagnosis. We present a 13 years old girl with thrombocytopenia since birth and congenital right kidney agenesis, corpus callosum hypoplasia and facial abnormalities. In this case a new sporadic missense mutation was found in *FLNA* gene by Next generation sequencing panel with 71 candidate genes related to Inherited Platelets Disorders. We are reporting this case with the aim of drawing attention to use Next-Generation sequencing as usefulness complementary approach for distinguishing unspecific ITs phenotype.

Introduction

Inherited Platelets Disorders (IPDs) are sometimes difficult to diagnose because they often requires complex laboratory techniques available in only a few centers and patients show ambiguous clinical phenotypes [1,2]. Moreover, even among patients that have a characterized form of inherited thrombocytopenia, the diagnosis is often missed because the inherited causes of thrombocytopenia are overlooked and not considered in the differential diagnosis [3]. Therefore the genetic diagnosis of IPDs is desirable, as the identification of pathogenic mutations by conventional Sanger sequencing to candidates gene [4]. However, genotyping of candidate genes by classical Sanger sequencing results in more than half of the patients remaining undiagnosed at the molecular level [5,6]. Currently, Next generation sequencing (NGS) of candidate genes is a promising approach in unclear cases at diagnosis since multiple genes can be analysed for mutations in a rapid and cost-efficient way [7]. It has recently been proposed as a novel alternative tool in the molecular diagnosis of IPDs [8,9], at recommended by international guidelines [10].

In the present study, we report on a case of primary thrombocytopenia associated a syndromic clinical manifestations phenotype that was correctly diagnosed of *FLNA* related disease by NGS panel [11].

Case Report

A 13-year-old girl presented with mild bleeding (mucocutaneous) and severe thrombocytopenia since birth. She was born at term after normal pregnancy and delivery. Family history was negative (mother, father and brother). She showed mild developmental delay and character disorders, congenital right kidney agenesis, corpus callosum hypoplasia and facial abnormalities (small mouth and eyes and bulbar nose).

No infections or eczema history was observed. Platelet count level was around $40 \times 10^9/L$ without other cytopenias). Peripheral smear was normal with normal platelet volume. The serum thrombopoietin concentration was below 32 pg/ml. A bone marrow biopsy exhibited reduced cellularity. Notably, there was a near-absence of megakaryocytes. No dysplasia was present. Conventional cytogenetic revealed a normal 46,XX karyotype, without chromosomal breakage. In addition, FISH studies lacked to demonstrate the presence of 22q11.2 microdeletion. Conventional Sanger sequencing of all 12 coding exons of the thrombopoietin receptor (*MPL*) gene and all 12 coding

exons of the *WAS* gene failed to detect gene causative mutations. Also, growth of megakaryocytes colonies after c-mpl was normal.

A NGS approach to identify the disease-causing mutations in congenital thrombocytopenia syndrome was carried out. Written informed consent was obtained from the parents. The study was performed in a MiSeq Instrument (Illumina) according to a Nextera sequencing design. A total of 71 genes related to IPDs were analyzed [11]. Genomic DNA from peripheral blood samples was isolated using a DNeasy blood and tissue kit, following the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was measured using a Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Fifty ng of the DNA was sequenced following Illumina's standardized protocol in the NGS panel that had been performed using Design Studio (Illumina, San Diego, CA). We used the 300-cycle reagent kit. Specifically, the sample was sequenced using paired 150 nt reads, running MiSeq Control Software and according to a Nextera sequencing design (Illumina). Minimum coverage per base was 100 reads for NGS analysis. First step consisted of a quality filters based on Phred score of > 20 , Quality > 20 and Read coverage > 30 at each position within the reads indicating high sequence quality. Then, we filtered the data, only those variants that led to amino acid change in the protein sequence were considered as causative mutations, for potential Single nucleotide variants (SNVs) and Insertion/deletions (InDels) and splicing regions with the default quality thresholds. A new missense mutation in exon 22 of the *FLNA* gene was identified in this patient (c.3695C>T). The novel variation was presented in 43,2% of the cell population and resulted in a change to a charged amino acid in the protein sequence (Thr1232Ile) (Figure 1). *In silico* models, Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) were used to predict the functional effects of the protein and the pathogenicity of this novel mutation. This mutation was confirmed by Sanger sequencing (Figure 2). Furthermore, samples from relatives (parents and brother) were analyzed by conventional sequencing and no mutations were found in *FLNA* gene (figure 2). Retrospectively, brain magnetic resonance (MRI) that had been done seven years ago, showed periventricular nodular heterotopia of gray matter (data not shown). *FLNA*-related thrombocytopenia associated to Periventricular Nodular Heterotopia was diagnosed.

Discussion

The patient presented a clinical diagnosis of congenital thrombocytopenia syndrome, consisting in thrombocytopenia since birth associated to congenital right kidney agenesis, facial abnormalities and corpus callosum hypoplasia. Combined studies by the analysis of smear blood, bone marrow (including conventional cytogenetic) and Sanger sequencing (*WAS* and *MPL* genes) failed to provide a final diagnosis. However, by using a NGS panel of 71 candidate genes related to Inherited Platelets Disorders a new missense mutation in the *FLNA* gene was detected.

Mutations in *FLNA* are associated with a heterogeneous group of diseases including disorders like Melnick-Needles syndrome (MNS), frontometaphyseal dysplasia (FMD), and periventricular nodular heterotopia (PVNH) [12]. The first human phenotype associated with mutations in *FLNA* was bilateral PVNH [13]. This neuronal migration disorder is clinically characterized by seizures and the appearance of nodules (heterotopic neurons) lining the margins of the lateral cerebral ventricles [14]. These heterotopic neurons were secondary to the failure of neurons to undergo the migrational process, during fetal development [15]. Central nervous system malformations typically include ventriculomegaly, cortical and cerebellar abnormalities, and abnormalities of the corpus callosum [16]. Females with PVNH also manifest variable extra-cerebral features such as cardiac valvular anomalies, a propensity to premature stroke, small joint hyperextensibility, gut dysmotility and persistent ductus arteriosus [17].

FLNA related diseases result in an X-linked dominant disorders, so PVNH is principally confined to females. Families segregating the disorder manifest an excess of miscarriage and an under-representation of males, indicative of prenatal lethality for males who are hemizygous for *FLNA* mutations [12,14]. Occasionally, live born males die in the neonatal period from catastrophic haemorrhage, the pathophysiology of which is poorly understood [17]. Recently, mutations have been identified in males, some with phenotypes indistinguishable from females with the condition [18,19]. Mosaicism has been demonstrated in some of these individuals, whereas many of the remainder has either missense mutation, suggesting that some residual function is necessary to confer survivability in a hemizygous state [18,19].

Filamin A (FLNa) is a 280kDa homodimer protein encoded by *FLNA* located on Chromosome Xq28 [20]. This protein is composed of three major function domains: a

N-terminal actin-binding domain (ABD) comprised of two calponin homology domains, CH1 and CH2; a rod domain consisting of 24 beta pleated sheet (immunoglobulin-like) repeat, with two intervening calpain-sensitive hinge sequences separating repeats 15 and 16 (hinge1) and repeats 23 and 24 (hinge2); and a C-terminal domain which is important for dimerization and binding to several membrane receptors [21]. Filamin A is versatile, multifunctional proteins that play central roles in adhesion, migration and the mechano-transduction; it is one of the most potent F-actin cross-linking agents, permitting sufficient inter filament flexibility for networks to exhibit fully reversible elastic deformation in response to high stresses without rupturing [22].

Missense mutations in the immunoglobulin-like repeat-10 (FlnA-Ig10) are associated to FMD and MNS [23]. The FlnA-Ig10 is likely to bind to subdomain 1 of actin monomers with demonstrable affinity [24]. Nurden et al described not only isolated thrombocytopenia related to *FLNA* gene in three patients, but also, associated to PVNH. In this case, missense mutation had specific consequences on platelet production and clearance [25]. However, in the most series, platelets counts were not well established. About 20-30% of PVNH in females resulted to sporadic mutations in *FLNA* gene [12,16,25].

Here, we identified a new missense mutation in FlnA-Ig10, which disrupted protein function and could presumably explain neurological phenotype associated with severe thrombocytopenia. This mutation is presented for the first time in the family member (*de novo* mutation). According to the literature, phenotype can be attenuated in missense mutations; in addition 20% of females could be presented as sporadic cases [11,15,24].

In summary, the use of targeted Next-Generation sequencing could be used as a complementary technique in the diagnosis of congenital thrombocytopenia with unspecific phenotype.

References

1. Balduini CL, Pecci A, Noris P. Diagnosis and management of inherited thrombocytopenias. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:161-71.
2. Rabbolini DJ, Morel-Kopp MC, Stevenson W, Ward CM. Inherited macrothrombocytopenias. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40:774-84.
3. Noris P, Pecci A, Di Bari F, et al. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica.* 2004; 89:1219-25.
4. Glembotsky AC, Marta RF, Pecci A, De Rocco D, Gnan C, Espasandin YR, et al. International collaboration as a tool for diagnosis of patients with inherited thrombocytopenia in the setting of a developing country. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1653-61.
5. Watson SP, Lowe GC, Lordkipanidzé M, Morgan NV; GAPP consortium. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2013;11:351-63.
6. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, Velasco F, Lucia JF, Lozano M, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:213.
7. Daly ME, Leo VC, Lowe GC, Watson SP, Morgan NV. What is the role of genetic testing in the investigation of patients with suspected platelet function disorders? *Br J Haematol.* 2014;165:193-203.
8. Leo VC, Morgan NV, Bem D, Jones ML, Lowe GC, Lordkipanidzé M, et al; UK GAPP Study Group. Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2015;13:643-50.
9. Westbury SK, Turro E, Greene D, Lentaigne C, Kelly AM, Bariana TK, et al; BRIDGE-BPD Consortium. Human phenotype ontology annotation and cluster analysis to unravel genetic defects in 707 cases with unexplained bleeding and platelet disorders. *Genome Med.* 2015;7:36.
10. Gresele P; Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015;13:314-22.

11. Bastida JM, del Rey M, Benito R, Sánchez-Guiu I, Riesco S, Peñarrubia MJ et al. Usefulness of targeted Next-Generation sequencing in inherited platelet disorders with unspecific phenotype. *Haematologica*. 2015;100:186.
12. Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, Mei D, Moro F, Veggiotti P et al. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain*. 2006;129:1892-06.
13. Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham A et al.: Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*. 1998;21:1315-25.
14. Mandelstam SA, Leventer RJ, Sandow A, McGillivray G, van Kogelenberg M, Guerrini R et al. Bilateral posterior periventricular nodular heterotopia: a recognizable cortical malformation with a spectrum of associated brain abnormalities. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34:432-8.
15. Lange M, Winner B, Muller JL, Marienhagen J, Schroder M, Aigner L et al. Functional imaging in PNH caused by a new FilaminA mutation. *Neurology*. 2004;62:151-52.
16. The EPGP Collaborative. The Epilepsy Phenome/Genome Project. *Clin Trials* 2013;10:568-86.
17. Moro F, Carrozzo R, Veggiotti P, Tortorella G, Toniolo D, Volzone A, Guerrini R: Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology*. 2002;58:916-21.
18. Guerrini R, Mei D, Sisodiya S, Sicca F, Harding B, Takahashi Y et al. Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular nodular heterotopia. *Neurology*. 2004;63:51-56.
19. Kasper BS, Kurzbuch K, Chang BS, Pauli E, Hamer HM, Winkler J, Hehr U. Paternal inheritance of classic X-linked bilateral periventricular nodular heterotopia. *Am J Med Genet A*. 2013;161:1323-8.
20. Feng Y and Walsh CA. The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signaling. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 1034-1038.
21. Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, Stossel TP. Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol*. 2007;179:1011-25.
22. Kim H and McCulloch CA. Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS Let*. 2011;585:18-22.

23. Page RC, Clark JG, Misra S. Structure of filamin A immunoglobulin-like repeat 10 from Homo sapiens. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2011;67:871-6.
24. Suphamungmee W, Nakamura F, Hartwig JH, Lehman W. Electron microscopy and 3D reconstruction reveals filamin Ig domain binding to F-actin. *J Mol Biol.* 2012;424:248-56.
25. Nurden P, Debili N, Coupry I, Bryckaert M, Youlyou-Marfak I, Dolé G et al. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood* 2011;111:5928-37.

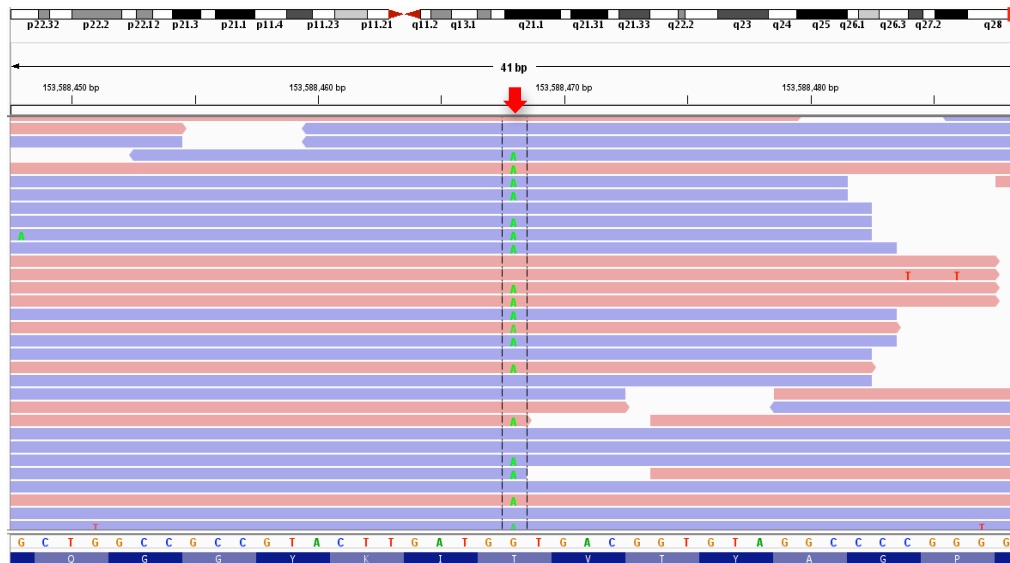
Authorship Contributions

JMB, JMHR, JRGP and JR designed the research and wrote the paper. MDR and RB performed molecular studies. MLL, SR, AH, RF, CA, EP, NB, MELI, and VF provided patient samples and clinical data. All authors critically reviewed and approved final version of the paper.

Disclosure of Conflicts of Interest

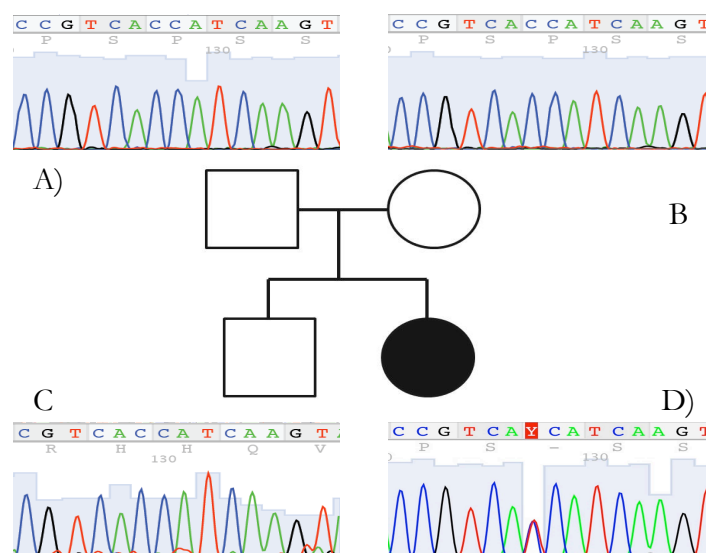
The authors declare no conflict of interest

Figure 1. Mutational analysis (IGV):



Legend: a novel missense variation in *FLNA* gene was found by NGS and represented the IGV software. Nucleotide substitution (c.3695C>T) was detected in 43,2% of the cell population (heterozygous). Red and blue lines represent the reads of the sequence in both senses. The green color indicates the mutated reads compared to the reference sequence, represented at the bottom of the figure.

Figure 2. Pedigree scheme, family members genetic studio:



Legend: father (A), mother (B), brother (C) and patient (D) by Sanger sequencing. Females were symbolized by circles and males by squares; the mutated cases are designated by a black symbol.

3.3. A novel missense mutation in *RASGRP2* abrogates Rap-1 activation causing platelet dysfunction.

Authors: Lozano ML¹, Cook A², Bastida JM³, Paul DS², Iruin G⁴, Adan-Pedroso⁴, Astigarraga I⁴, González-Porras JR³, Hernández-Rivas JM³, Fletcher SJ⁵, Johnson B⁵, Morgan N⁵, Ferrer-Marín F¹, Vicente V¹, Sondek J², Watson SP⁵, Bergmeier W² and Rivera J¹.

Affiliations: ¹Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, CRH, IMIB-Arixaca, Murcia, Spain; ²Department of Biochemistry and Biophysics, McAllister Heart Institute, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA; ³Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, Spain; ⁴Servicios de Hematología, Pediatría y Oncología Infantil, Hospital de Cruces, Bilbao, Spain. ⁵Institute of Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham.

Abstract

We here investigated the molecular basis of a bleeding diathesis and platelet aggregation defect observed in a 9-year-old child of consanguineous parents. Using a Next-Generation sequencing (NGS) panel of 71 genes that are known or predicted to give rise to inherited platelet disorders (IPDs), we identified a homozygous, non-synonymous change (c.1142C>T) in exon 10 of *RASGRP2*. This variant led to a p.Ser381Phe substitution in the CDC25 catalytic domain of the encoded protein, CalDAG-GEFI. Platelets from the patient, but not those from heterozygous carriers, exhibited agonist-specific defects in α IIb β 3 integrin activation and aggregation. In contrast, granule secretion and platelet spreading were not markedly impaired. Interestingly, CalDAG-GEFI expression was almost abolished in the patient's platelets, suggesting that the p.Ser381Phe substitution may lead to a conformational change and protein instability. Consistent with this assumption, the mutant protein was difficult to purify and its in vitro nucleotide exchange activity was dramatically reduced. The identification of this novel p.Ser381Phe mutation further strengthens molecular heterogeneity of *RASGRP2* as a genetic cause of Glanzmann's thrombasthenia-like inherited platelet disorders.

Introduction

Inherited platelet disorders (IPDs) constitute a heterogeneous group of rare diseases characterized by a lifelong mild to severe bleeding diathesis, stemming from a wide diversity of genetic deficiencies affecting platelet production and/or function [1,2].

One of these IPDs is Glanzmann Thrombasthenia (GT), a severe bleeding complication caused by recessive mutations in *ITG2B* or *ITGB3*. Mutations in these genes lead to quantitative or qualitative defects in α Ib β 3 integrin activation, and, consequently, severely impaired platelet aggregation in response to all agonists [3].

In rare cases, others and we have identified patients with variable bleeding diathesis and GT-like platelet aggregation abnormalities for which α Ib β 3 expression is not affected and deleterious mutations in *ITG2B* or *ITGB3* have not been found [3,4].

Genotyping of these patients using the classic Sanger sequencing (SS) approach is not straightforward, due to the wide genetic heterogeneity of IPDs and the large number of genes/proteins that may, directly or indirectly, influence α Ib β 3 activation and signaling [5]. Here, we used Next-Generation sequencing (NGS) [6] to identify a novel missense mutation in the gene RAS guanyl-releasing protein-2 (*RASGRP2*) in a patient with a strong bleeding tendency and GT-like platelet dysfunction.

Methods

This investigation complied with the Helsinki Declaration and the study had formal approval by the Ethics Committee of the Hospital Universitario Reina Sofía (Murcia, Spain) and Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL, Salamanca, Spain). Written informed consent was obtained from all subjects entering the study.

Blood sampling, platelet phenotyping (platelet aggregation, clot retraction and flow cytometry tests) and DNA collection were carried out in the propositus, relatives and non-related healthy individuals as described [4,7]. Immunoblotting analysis of CalDAG-GEFI, Rap1, Rasa3, and β -actin levels in platelet lysates was performed as described [8]. DNA from the propositus was assayed in a NGS platform (Illumina MiSeq X®, Illumina, San Diego, CA), targeting all exons and splice sites from 71 genes coding for platelet surface receptors, granule-related, cytoskeletal and signal transduction proteins, and some transcription factors [6]. Verification of the candidate

mutation in *RASGRP2* identified by NGS in the patient and its segregation among family members was achieved by SS with specific primers, using an ABI 3730 automated sequencer and MutationSurveyor software SoftGenetics (State College, PA). Human CalDAG-GEFI and Rap1B proteins were purified to homogeneity after expression in *E. coli* using a combination of standard and immobilized metal affinity chromatography. To increase expression and stability, Rap1B was slightly truncated and the solvent-exposed cysteine at position 181 was replaced by a serine [Rap1B(C181S)]. For CalDAG-GEFI we removed 58 amino acids of the unstructured C-terminus to increase the yield [CalDAG-GEFI(1-551)]. Bodipy FL GDP (400 nM) was used to measure nucleotide exchange on 1 μ M Rap1B, catalyzed by 400 nM CalDAG-GEFI. Data was collected on a Pherastar microplate reader (BMG LABTECH) with $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm and 2 nm slits.

Results and Discussion

The index case was a 9-year-old Chinese child with a lifelong history of severe epistaxis episodes requiring hospitalization and medical intervention (including nasal packing, tranexamic acid and platelet transfusions). A bleeding score of 7 was achieved upon application of the ISTH-bleeding assessment tool [9]. The patient displayed normal platelet count and volume ($280\text{-}411 \times 10^9/\text{L}$, MPV: 9.1-9.9 fl, over three years) and sporadic mild microcytic anaemia (Hb 10-14 g/L). Laboratory test results, including routine blood examination, liver and kidney function, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen and von Willebrand factor levels were within normal ranges. There was no family history of bleeding. An initial clinical suspicion of GT was established based on prolonged bleeding time (>20 min), closure times >300 s in PFA-100® testing with both collagen/epinephrine and collagen/ADP cartridges, and severely reduced platelet aggregation in response to ADP and low dose collagen (Figure 1A). GT was ruled out, however, as (1) the surface expression of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin, as well as other major glycoproteins (e.g. GPIb/IX and GPIa), was not affected in patient platelets (not shown), and (2) platelet aggregation (Figure 1A) and fibrinogen binding to activated $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Figure 1B) were normal, or minimally impaired, in patient platelets activated with high doses of TRAP, collagen, CRP, convulxin, arachidonic acid, or PMA. In contrast, binding of both fibrinogen and PAC-1 to activated $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ was severely reduced in patient platelets activated with

ADP (Figure 1B and 1C). No major defects in agonist-induced granule secretion (Figure 1D), clot retraction (Figure 1E) and platelet spreading over surface-bound fibrinogen (Figure 1F), were observed for patient platelets.

Molecular analysis of the patient using a 71 gene NGS panel [6] identified, in homozygous state, the non-synonymous change c.1142C>T in exon 10 of *RASGRP2*. This change was confirmed and shown to segregate with the pedigree by SS (Figure 2A). This variant is reported with an allelic frequency of 8.47×10^{-6} in the Exome Aggregation Consortium database (ExAC) (Cambridge, MA, URL: <http://exac.broadinstitute.org>) and it is unreported in the 1000 genomes project database (<http://browser.1000genomes.org>) (both accessed on October 13th, 2015).

The *RASGRP2* gene (11q13) is a member of the RasGRP family encoding the calcium and diacylglycerol (CalDAG)-regulated guanine nucleotide exchange factor 1 (GEF1). CalDAG-GEFI (609aa) is strongly expressed in megakaryocytes and platelets, where it facilitates the activation of the small GTPase Rap1, a crucial event in agonist-mediated activation of α IIb β 3 [10-13]. CalDAG-GEFI contains a Ras exchange motif (REM) and a CDC25 domain within the N-terminal catalytic region that provides GEF activity, and a C-terminal regulatory region with two Ca^{2+} binding EF hand domains and a C1-like domain [14] (Figure 2B). The mutated amino acid in patient CalDAG-GEFI, p.Ser381Phe, is located at c-terminal end of the CDC25 catalytic domain. The mutation is predicted by PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) to be “probably damaging” with a score of 1.0. Consistent with this prediction, we detected markedly reduced expression of CalDAG-GEFI protein in patient platelets (Figure 2B). CalDAG-GEFI expression in platelets from heterozygous relatives was also reduced when compared to healthy volunteers. In contrast, expression of Rap1 itself and a main Rap1-GAP in platelets, *Rasa3*, was comparable in platelets from affected individuals and healthy volunteers. To evaluate whether the Ser381Phe substitution also impairs the GEF activity of CalDAG-GEFI, we purified wild-type and mutant protein and subjected them to a novel, fluorescence-based assay to monitor nucleotide exchange on purified Rap1B. Interestingly, large amounts of CalDAG-GEFI (Ser381Phe) but not CalDAG-GEFI (wild-type), precipitated during the purification process and the GEF activity of purified CalDAG-GEFI (Ser381Phe) was almost completely abolished when compared to control CalDAG-GEFI. The reduction in catalytic activity was similar to that observed with purified CalDAG-GEFI

(Gly248Trp), the first CalDAG-GEFI mutation that was recently identified in a family with a GT-like bleeding disorder (Figure 2C). However, Ser381 was not positioned in the interface between the CDC25 domain and Rap1 such as while Gly248 [15]. Thus, we propose that the p.Ser381Phe substitution leads to a conformational change in CalDAG-GEFI, which affects protein stability and nucleotide exchange activity.

In summary, we here report the second family with a GT-like platelet dysfunction disorder that results from a missense mutation in *RASGRP2*. This novel mutation, p.Ser381Phe, affects both expression and function of CalDAG-GEFI, leading to partial impairment of Rap1 signaling and strong defects in the inside-out activation of α IIb β 3 integrin in patient platelets. This novel p.Ser381Phe mutation further strengthens molecular heterogeneity of *RASGRP2* as a genetic cause of Glanzmann's Thrombasthenia-like inherited platelet disorders.

Authorship Contributions

MLL, SPW, WB and JR, designed the research and wrote the paper. GI, RAP and IA provided patient samples and clinical data. JR, MLL, FF, and SF carried out the platelet phenotyping. AC, DSP, JR and WB carried protein analysis and cell model. JMB, JRGP, JMHR performed the WES. NM and BJ did Sanger sequencing. All authors critically reviewed and approved final version of the paper.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

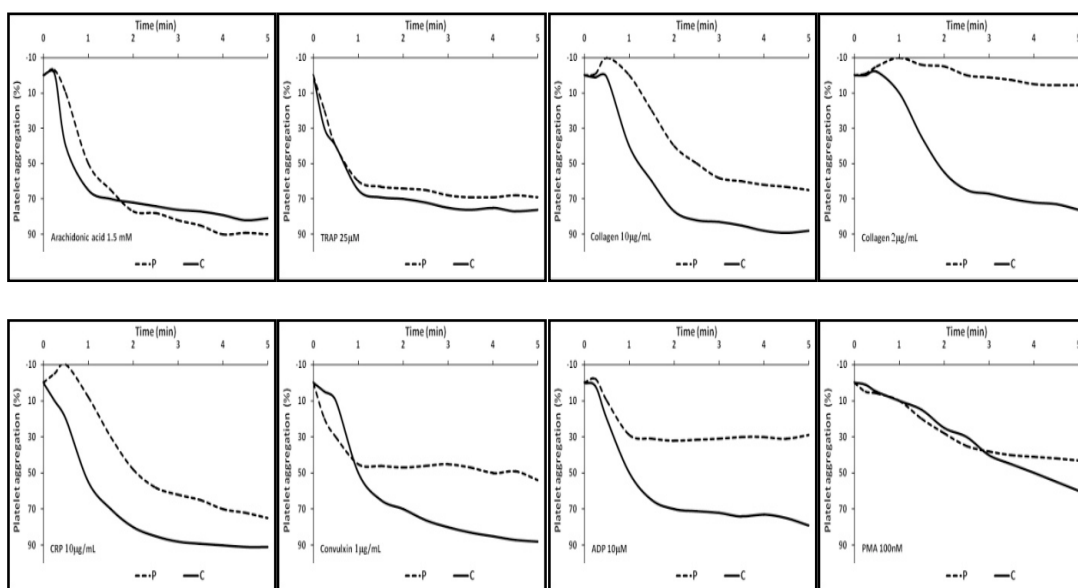
1. Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol.* 2006;135:603-33.
2. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br J Haematol.* 2014;165:165-78.
3. Nurden AT, Pillois X, Fiore M, Alessi MC, Bonduel M, Dreyfus M et al. Expanding the Mutation Spectrum Affecting α IIb β 3 Integrin in Glanzmann Thrombasthenia: Screening of the ITGA2B and ITGB3 Genes in a Large International Cohort. *Hum Mutat.* 2015;36:548-61.
4. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, Velasco F, Lucia JF, Lozano M, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:213.
5. Coller BS. α IIb β 3: structure and function. *J Thromb Haemost.* 2015;13:S17-25.
6. Bastida JM, del Rey M, Benito R, Sánchez-Guiu I, Riesco S, Peñarrubia MJ et al. Usefulness of targeted Next-Generation sequencing in inherited platelet disorders with unspecific phenotype. *Haematologica.* 2015;100:186.
7. Fletcher SJ, Johnson B, Lowe GC, Bem D, Drake S, Lordkipanidzé M et al. SLFN14 mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest.* 2015;125:3600-5.
8. Stefanini L, Paul DS, Robledo RF, Chan ER, Getz TM, Campbell RA et al. RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation. *J Clin Invest.* 2015;125:1419-32.
9. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller B, James P, et al. ISTH/SSC joint VWF and Perinatal/Pediatric Hemostasis Subcommittees Working Group. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2063-5.
10. Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nakano T et al. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:12819-24.

11. Stefanini L, Roden RC, Bergmeier W. CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood*. 2009;114:2506-14.
12. Zhang G, Xiang B, Ye S, Chrzanowska-Wodnicka M, Morris AJ, Gartner TK et al. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin α IIb β 3 outside-in signaling. *J Biol Chem*. 2011;286:39466-77.
13. Stefanini L, Bergmeier W. RAP1-GTPase signaling and platelet function. *J Mol Med*. 2015. [Epub ahead of print].
14. Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science*. 1998;280:1082-6.
15. Canault M, Ghalloussi D, Grosdidier C, Guinier M, Perret C, Chelghoum N et al. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *J Exp Med*. 2014;211:1349-62.

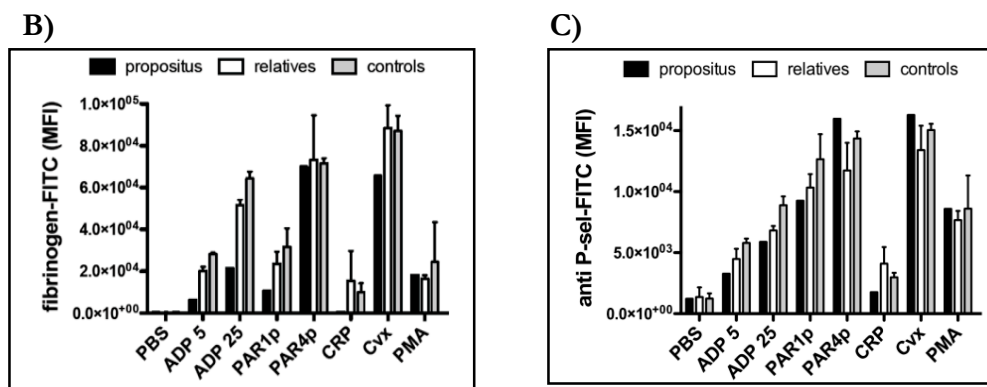
Figures

Figure 1. Platelet function profile associated with the novel mutation S381F in *RASGRP2*:

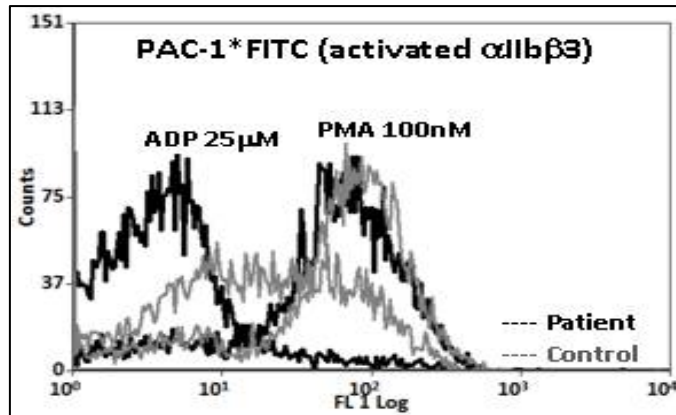
A) Platelet aggregation in response to the indicated platelet agonists was evaluated in unadjusted platelet-rich plasma, in both the patient (P, ---) homozygous for the novel p.S381F mutation in *RASGRP2* and a parallel healthy and unrelated control (C___).



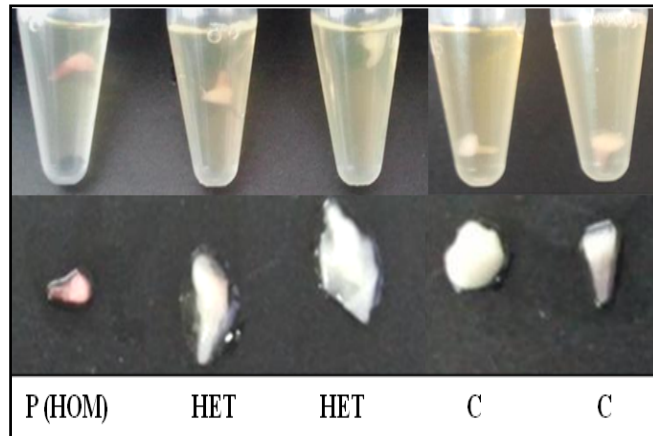
B-C) Flow cytometry evaluation of agonist-induced fibrinogen*Alexa488 binding (B) and P-Selectin expression (C) in diluted platelet-rich-plasma from the patient, heterozygous carriers [combined data from three relatives], and parallel healthy and unrelated controls [combined data from two subjects].



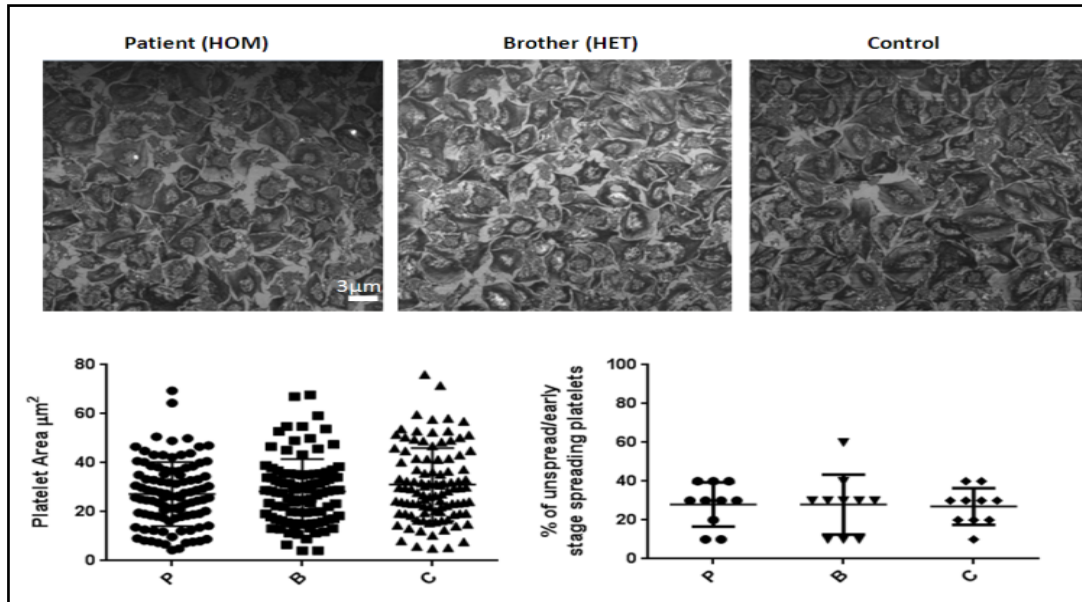
D) Flow cytometry assessment of the binding PAC-1*FITC antibody (activated α IIb β 3) in diluted platelet-rich-plasma from the patient (black histograms) and a parallel healthy control (gray histograms), upon platelet activation with ADP (left histograms) or PMA (right histograms).



E) Clot retraction: Platelet-rich-plasma from the patient, heterozygous relatives and two parallel healthy and unrelated controls (all adjusted to 225.000 platelet/ μ L) were stimulated with thrombin (3U/mL) and CaCl₂ (2mM), and clot retraction evaluated after 60 min.



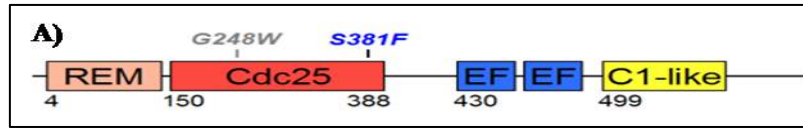
F) Spreading platelets: washed platelets from the patient homozygous for p.S381F in *RASGRP2*, a heterozygous relative (brother) and a parallel healthy and unrelated control were allowed to spread over fibrinogen coated coverslips.



Legend. Images were taken using a DM IRE2 Leica inverted microscope, SP2 confocal system running Leica Confocal Software Version 2.61 Build 1537. Platelet spread areas were outlined using the ROI tool in ImageJ (1.48V). Un-spread early spread platelets were quantified and expressed as a percentage of the total platelets counted. Lack of statistical significance in spreading between samples was corroborated by one-way ANOVA.

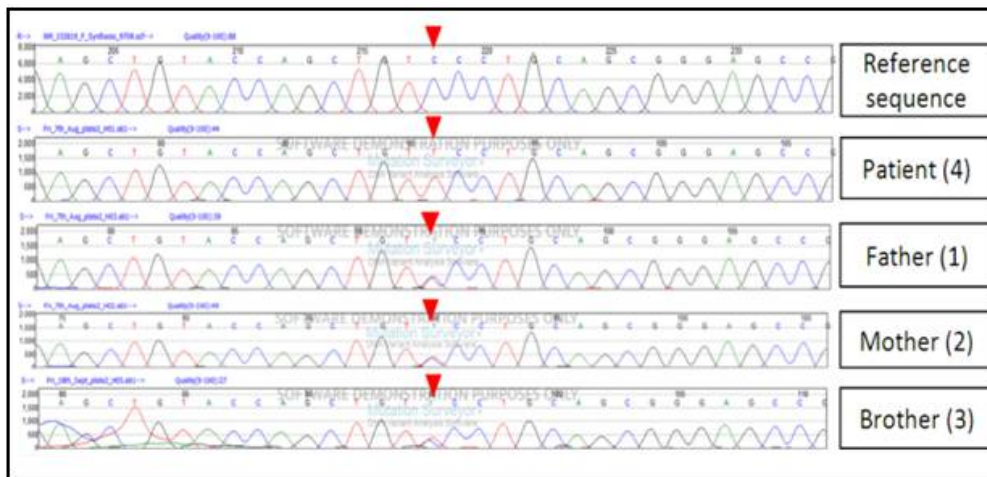
Figure 2: A novel mutation S381F in *RASGRP2* severely affected the expression and the nucleotide exchange activity of CalDAG-GEF1:

A) Schematic representation for CalDAG-GEF1 showing the different domains:

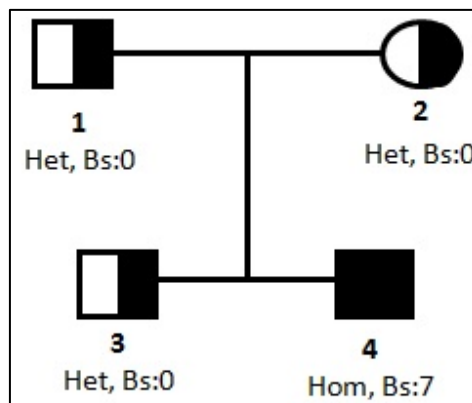


Legend. Ras exchanger motif (REM), catalytic domain (Cdc25), calcium-binding EF hands (EF) and C1-like domain (unknown function). The positions of the previously reported G248W mutation [15] and the novel p.S381F mutation within the Cdc25 domain are shown.

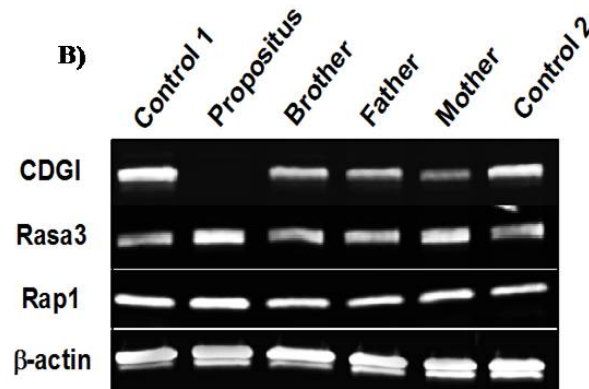
Sanger sequencing: confirmation of the c.1142C>T (p.S381F) in *RASGRP2* with specific primers by PCR, in the patient and relatives.



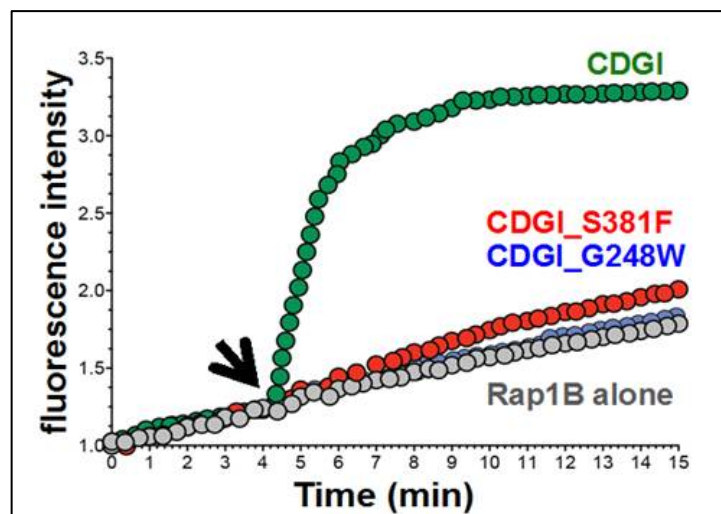
Family pedigree. Number 4 is index case. BS: Bleeding score as assessed with the Bleeding Assessment tool from ISTH. Hom & Het: Homozygous & Heterozygous for the c.1142C>T (p.S381F) in *RASGRP2*.



B) Immunoblotting analysis for CalDAG-GEFI (CDGI), Rasa3, Rap1, and β -actin in platelet lysates from the indicated individuals.



C) Bodipy fluorescence-based assay to monitor nucleotide exchange on purified Rap1B. Black arrow indicates where wild-type (green) or S381F (red) or G248W (blue) CalDAG-GEFI was added. The increase in fluorescence intensity, a measure of nucleotide exchange, over time is shown.



DISCUSIÓN GENERAL

Las diátesis hemorrágicas hereditarias (DHH) son un grupo complejo y heterogéneo de enfermedades monogénicas que se transmiten de forma mendeliana [2,13,87]. Aunque existen alrededor de 100 genes relacionados y numerosas mutaciones, en la mayoría de los casos no recurrentes [34,83,92,119], se siguen describiendo nuevas mutaciones y nuevos genes involucrados en la etiopatogenia de estas enfermedades, como *SLFN14* y *FYB* [35,202,210,211]. En la práctica clínica, principalmente en los trastornos plaquetarios hereditarios, es frecuente que se solapen algunos fenotipos clínicos y de laboratorio o que la enfermedad en estudio no se corresponda con ninguna de las alteraciones descritas [85]. Esta heterogeneidad clínica, funcional y/o molecular, dificulta el correcto diagnóstico, y, por tanto, el tratamiento específico [85,92,154]. Por todo ello, el estudio eficiente de todos los genes implicados en una DHH es clave para mejorar el diagnóstico, aunque supone un reto tecnológico [85,172,173,202].

El diagnóstico molecular de las enfermedades monogénicas se ha basado en la secuenciación bidireccional de exones y zonas de *splicing* mediante el método de Sanger, en el estudio mediante microarrays o en el análisis de ligamiento (*linkage analysis*), que sólo permiten detectar mutaciones ya conocidas [197,212]. Ante la sospecha de una enfermedad monogénica, normalmente se inicia el estudio del gen más frecuentemente mutado que está asociado con ella, conocido como “gen candidato” [148]. Una vez detectada la variante patogénica, se confirma el diagnóstico molecular. En caso de no ser así, se continúa con la secuenciación de los genes potencialmente candidatos hasta detectar la mutación responsable de la enfermedad, aunque en muchos enfermos no se logra identificar la mutación causante [148]. Esta estrategia conlleva un registro incrementado de mutaciones sobre los genes estudiados y un sub-registro de mutaciones en genes no estudiados, provocando una disminución de frecuencias de asociación de estas enfermedades a dichos genes. Además, los casos bien definidos, en los que se puede identificar el gen candidato y proceder a su análisis molecular, son difíciles de encontrar. Por tanto, la descripción de nuevos genes candidatos, así como el solapamiento de los fenotipos son limitaciones adicionales al diagnóstico de estas patologías, como también ocurren en los TPHs [85,148].

A pesar de que la secuenciación convencional con el método de Sanger es un procedimiento estandarizado y ampliamente aceptado (que ha permitido alcanzar hitos tan relevantes como la secuenciación del primer genoma humano en el año 2001 [157]), presenta dos limitaciones principales: a) el coste económico (casi 3.000 millones

de dólares para secuenciar el genoma humano) y b) el tiempo empleado que puede retrasar el diagnóstico (se estima que el tiempo necesario para llegar al diagnóstico molecular de las enfermedades monogénicas se encuentra entre 1 y 10 años) [157]. Estas limitaciones se agravan en aquellas enfermedades con heterogeneidad genética en las que existe un grupo de genes potencialmente candidatos y en los casos con un gen candidato bien definido, pero con un gran número de exones, ya que supone mayor tiempo y coste para la secuenciación [159]. Estas consideraciones llevan a la conclusión de que en el estudio de las enfermedades genéticas asociadas con una elevada heterogeneidad molecular la secuenciación convencional es un método inapropiado para la rutina diagnóstica en la clínica diaria [175].

Desde el año 2005 se ha producido un gran avance en las técnicas de análisis molecular. La primera plataforma de secuenciación masiva de alto rendimiento (NGS) fue desarrollada en el año 2009 y ya permitía la secuenciación en paralelo de múltiples fragmentos de ADN generando una gran cantidad de datos en un tiempo más reducido y a un coste económico menor [213]. Esta nueva tecnología ha permitido llevar a cabo el proyecto *1000 Genomes*, secuenciando un exoma humano por 1.000\$ [215,216]. Además, empleando esta tecnología se ha determinado la localización y frecuencias alélicas de más de 15 millones de *Single Nucleotide Variants* (SNVs), un millón de inserciones y deleciones y 20.000 variantes estructurales [161,217]. En la actualidad, disponemos de un nuevo conjunto de métodos de NGS que se caracterizan por la secuenciación del genoma o *Whole Genome Sequencing* (WGS), del exoma o *Whole Exome Sequencing* (WES) o de paneles de genes candidatos (*Targeted Genes Panel*) [184]. Esta tecnología genera una enorme cantidad de información genética, lo que es una ventaja evidente, pero, también encierra una dificultad importante en la interpretación de los resultados [175]. La capacidad de generación de datos de estas herramientas ha sobrepasado la capacidad de los recursos bioinformáticos disponibles hasta la fecha, hecho calificado como “Next-Generation gap” [199]. Esta situación ha motivado el desarrollo de nuevos algoritmos bioinformáticos y métodos de análisis necesarios para la correcta manipulación e interpretación de una nueva generación de datos, denominados “Next-Generation Bioinformatics” [199]. El desarrollo de estas herramientas bioinformáticas es fundamental para la aplicación con éxito de la secuenciación masiva al diagnóstico genético, así como para su protocolización. Esta mejora, junto con la utilización y comparación con las bases de datos y la aplicación de los modelos *in silico*, que pueden predecir la patogenicidad de una variante genética,

facilita la identificación y la asociación de dicha variante como causante de una determinada enfermedad [193,199,218]. Desde el punto de vista económico (coste de secuenciación por base), la mejora continua de la química de secuenciación, de los protocolos de trabajo y de la automatización han perfeccionado tanto la precisión como el rendimiento de las plataformas de NGS, descendiendo vertiginosamente el coste de secuenciación por base [219]. Pese a que la secuenciación del genoma completo (WGS) identifica todo tipo de variantes [199] y de que el precio es una ínfima parte de lo que costó la obtención del primer borrador en 2001, su aplicación rutinaria no está todavía generalizada. Las limitaciones siguen siendo la económica (su coste la hace inabordable para la mayoría de las instituciones) y la necesidad de sistemas bioinformáticos potentes capaces de procesar y clasificar la gran información generada [220,221].

La aplicación clínica de las técnicas de NGS suele estar restringida al uso de paneles de genes [219-221]. En los últimos meses, hemos encontrado más de 100 publicaciones sobre la utilización de paneles de genes en todo tipo de enfermedades, desde las cardiomiopatías, las cataratas congénitas o las enfermedades neurodegenerativas hasta los tumores sólidos, entre otras [186,187,196,212,222,223]. Estos paneles de genes detectan entre el 99 y el 100% de SNV, mientras que la detección de InDels se sitúa en torno al 60% [218]. Una de las grandes ventajas es que la asociación conocida de un gen con su enfermedad facilita la interpretación de los datos obtenidos lo que incrementa la sensibilidad y especificidad de la técnica y reduce el coste por base secuenciada [212,224]. Además, la flexibilidad de incorporar nuevos genes descubiertos es otra ventaja para su utilización como herramienta de rutina. Por contra, sus principales limitaciones son la dificultad para la detección de InDels, la imposibilidad de encontrar mutaciones en las regiones no incluidas en las dianas y la incapacidad de detectar largos fragmentos de CNV y/o reordenamientos cromosómicos [219,221]. Basados en estas consideraciones (la información generada, el coste y la dificultad para la interpretación de datos), los paneles de genes constituirían el primer eslabón en el diagnóstico molecular de rutina mientras que la secuenciación del exoma se reservaría para los enfermos en los que no se detectase ninguna mutación, pero con una alta sospecha diagnóstica de una enfermedad hereditaria.

Por otra parte, la re-secuenciación dirigida (*TargetSeq*) permite diseñar sistemas de captura “a medida” dirigidos a la selección de regiones específicas del genoma lo

que ha abierto una nueva perspectiva en el diagnóstico genético [219]. Recientemente han aparecido nuevas versiones de equipos de NGS, basados en esta técnica, con características más limitadas en cuanto a su rendimiento y capacidad de secuenciación, pero con mayor facilidad de manejo, como, por ejemplo, *MiSeq Personal Sequencer* de Illumina, que es la plataforma de secuenciación utilizada en este estudio.

En la actualidad, las dos técnicas más empleadas son la captura de ADN basadas en la hibridación de sondas o captura de secuencia, y la secuenciación de ADN mediante sistemas de PCR multiplex o análisis por amplicones [222,225]. Ambas técnicas abarcan desde pocas kilobases hasta la captura del exoma completo, por lo que hacen posible realizar un cribado mutacional de cientos de genes de manera simultánea, proporcionando una gran cantidad de información sobre la genética de un individuo y acortando el tiempo del diagnóstico molecular [175]. Estas técnicas se basan en la hibridación sobre fase líquida, que evita las limitaciones de tiempo y de la complejidad del diseño de cebadores de ADN así como de su mantenimiento y almacenamiento [226,227]. Por el contrario, un problema de la hibridación es la captura de secuencias homólogas como son los pseudogenes, en cuyo caso se debe incrementar la cobertura y la profundidad de lectura para que la identificación de esa región concreta sea más específica.

Dado que el análisis de datos no sigue un modelo estándar, las siguientes consideraciones son esenciales para la correcta aplicación de la NGS en el diagnóstico molecular: a) La identificación y caracterización del conjunto de variantes presentes en una muestra; b) El desarrollo de protocolos de trabajo eficientes, precisos y validados; y c) La cobertura de la secuencia adecuada al tipo de análisis que queremos realizar, para evitar la presencia de falsos positivos y/o negativos [228]. Una baja cobertura favorece la aparición de falsos positivos y al contrario, una alta cobertura implicaría un incremento en falsos negativos. Sin embargo no existe un consenso para determinar la mejor profundidad de lectura, por lo que esta se realiza según el criterio de cada laboratorio y plataforma de NGS [229].

La estrategia de análisis consiste en la identificación de las posibles variantes candidatas mediante la aplicación de los filtros que hemos descrito previamente. La validación por Sanger, los estudios de segregación, las comparaciones con las bases de datos y los estudios de patogenicidad son esenciales para establecer las relaciones de causalidad entre genes potencialmente candidatos y/o genes desconocidos que pudieran producir un fenotipo. Para ello, los modelos *in silico* permiten predecir patogenicidad; asimismo,

el desarrollo de guías para el análisis de variantes y la generación de modelos celulares y animales ayudan establecer la patogenicidad y la correlación genotipo-fenotipo de las nuevas variantes encontradas [200].

En el contexto de las DHH, la llegada de los mini-secuenciadores con tecnología NGS, la disminución del tiempo de estudio (al identificar un alto número de variantes de ADN que pueden actuar como mutaciones patogénicas responsables de la enfermedad o como modificadores de la expresividad fenotípica) así como la disminución de los costes de secuenciación por base, forman la combinación ideal para la adopción de esta tecnología como método de preferencia en el diagnóstico genético de rutina en el presente y en el futuro cercano.

Como hemos descrito en este trabajo, la aplicación de los paneles de genes mediante secuenciación masiva en el diagnóstico molecular de las diátesis hemorrágicas hereditarias requiere: a) Un proceso de diseño biomédico de los genes asociados a la patología; b) un diseño del panel de genes; c) la validación bioinformática y diagnóstica del panel que permita evaluar los parámetros de calidad del proceso, tales como la reproducibilidad, la cobertura media, la sensibilidad, la especificidad, la detección de deleciones/inserciones e *InDels*; d) la confirmación de variantes previamente estudiadas por secuenciación Sanger [193,230]; e) el desarrollo y actualización de programas bioinformáticos, la implementación de guías consensuadas para el manejo e interpretación de la enorme cantidad de información genética generada, la comparación con las bases de datos genéticas y el registro de las variantes encontradas, los estudios de co-segregación familiar y los estudios funcionales/celulares para determinar el significado biológico y la patogenicidad de las variantes identificadas y establecer la correlación genotipo-fenotipo.

En el presente trabajo se han diseñado dos paneles de genes, en una plataforma de secuenciación masiva (NGS), relacionados con los trastornos hereditarios plaquetarios y de la coagulación. Tras la selección de los genes implicados y el diseño del panel, fue necesaria la validación interna de esta nueva herramienta. Para ello se utilizaron diez casos de trastornos plaquetarios hereditarios y cinco casos con trastornos hereditarios de la coagulación, cuyas mutaciones habían sido detectadas previamente mediante la técnica de Sanger. El panel de NGS detectó todas las mutaciones previamente identificadas con la tecnología convencional. Nuestro método había conseguido, por tanto, ser validado con garantías.

En referencia a los capítulos 1 y 3, una vez validado el panel de 71 genes, se estudiaron otros 40 pacientes con sospecha de trastorno plaquetario hereditario. Con la aplicación de la NGS, se detectó una variante potencialmente patogénica en 15 de 20 pacientes con trombocitopenia hereditaria (75%).

En los casos que presentaban un fenotipo conocido (n=12), como un síndrome de Bernard Soulier (SBS), una enfermedad relacionada con el gen *MYH9* o un síndrome de Plaqueta Gris, se confirmó el diagnóstico molecular en 10 de ellos (83%). El caso número 27 presentaba un síndrome de Wiskott-Aldrich (SWA), en el que no se encontró ninguna alteración, probablemente debido a que las principales regiones intrónicas causantes de esta patología no han sido analizadas [65,231].

De especial interés fue poder realizar el diagnóstico final en cinco de ocho pacientes (63%) con trombocitopenia hereditaria, sin filiar a pesar de las múltiples pruebas realizadas. Destacamos dos casos clínicos, uno por la dificultad a la hora de llegar al diagnóstico final, y otro por las implicaciones pronósticas tras el cambio en la actitud terapéutica. El primer caso, descrito en el capítulo 3 de los resultados, se refería a una niña de 13 años con trombocitopenia grave y malformaciones neurológicas y renales desde el nacimiento. Todos los estudios realizados (medulograma, CMF, citogenética, biología molecular, pruebas de imagen, etc) no evidenciaron un diagnóstico concreto. La identificación de una nueva variante en el gen *FLNA*, mediante el panel de genes por NGS, permitió caracterizar un cuadro sindrómico denominado heterotopia periventricular nodular asociada a trombocitopenia. El segundo caso (número 22) hacía referencia a un niño de 6 años, con múltiples ingresos prolongados por hemorragias graves, (uno de ellos en la Unidad de Cuidados Intensivos). Estaba diagnosticado de trombocitopenia inmune (PTI) y había sido totalmente refractario a varias líneas de tratamiento. El análisis molecular permitió detectar una nueva delección en el gen *WAS* y dirigir el estudio funcional para objetivar la disminución de la expresión de la proteína codificada (WASp). Una vez establecido el diagnóstico de TLX se realizó un trasplante alogénico sin complicaciones y con evolución muy favorable de la enfermedad y de la calidad de vida del paciente.

En el análisis de los pacientes con trombocitopatía hereditaria se identificó la alteración molecular subyacente en 9 de 14 pacientes (64%). Diez pacientes estaban englobados en un grupo heterogéneo e inespecífico como son los trastornos de señalización/secreción, mientras que cuatro enfermos tenían un fenotipo concreto: dos

Trombastenia de Glanzmann (TG), un síndrome Chediak Higashi (SCH) y un síndrome Hermansky-Pudlak (SHP). En este grupo de trastornos queremos destacar tres consideraciones: 1) A diferencia de lo publicado hasta la fecha, las variantes en heterocigosis, encontradas en los genes del receptor del colágeno y ADP (casos 34-36), pueden provocar clínica hemorrágica leve [89,231]. Tanto el modelo *in silico*, que predice la patogenicidad de la variante, como los estudios de segregación familiar que confirman la presencia de la variante en los familiares sintomáticos, lo avalan. 2) La utilización del panel fue especialmente útil en aquellos pacientes con múltiples genes implicados en un fenotipo concreto (caso 41), como ocurre en el SHP, en el que 9 genes pueden provocar este trastorno [109]. La elección del gen candidato en el SHP está condicionada por la frecuencia de mutaciones en los distintos genes; en este caso se analizó por secuenciación convencional el gen *HPS1*, sin detectar ninguna anomalía. El empleo de esta herramienta facilitó la caracterización molecular al observarse una microdelección patogénica ya descrita en el gen *HPS4*. Siguiendo esta línea, se caracterizó molecularmente a aquellos pacientes que presentaban un fenotipo específico con un gen candidato, pero con múltiples exones codificantes, como ocurre en el SCH (caso 42) o en la enfermedad relacionada con el gen *MYH9* (casos 13-15), en los que hasta 51 o 41 exones pueden estar implicados en el desarrollo de la enfermedad, respectivamente [78,110]. 3) Por último, la identificación de la segunda variante descrita hasta el momento en el gen *RASGRP2* (caso descrito en el capítulo 3 de los resultados) permitió diagnosticar a un niño con una larga historia de hemorragia grave como TG-like [107]. En este paciente, la posterior realización de un modelo celular y funcional identificó un nuevo mecanismo etiopatogénico relacionado con la alteración genética.

Finalmente, la aplicación de la tecnología NGS no detectó ninguna alteración en las 6 mujeres que únicamente presentaban diátesis hemorrágica leve y alteraciones en el PFA100®. Según las últimas recomendaciones de la ISTH, esta tecnología no debería utilizarse como cribado en estos trastornos [143], pero se emplea en más del 50% de los laboratorios, lo que nos llevó a aplicar la tecnología NGS en busca de alguna variante [134]. De acuerdo con estas consideraciones, nuestro análisis demostró que en los enfermos que sólo tienen esta alteración el rendimiento del panel fue nulo.

Por tanto, en el presente trabajo, el diagnóstico molecular de los TPHs se alcanzó en el 70% de los casos (24/34), mejorando considerablemente la

caracterización molecular de estos pacientes [85,148]. Además, 24 variantes genéticas no habían sido descritas en la literatura (Tabla 11), por lo que el incremento del espectro mutacional de estos trastornos facilitará el conocimiento etiopatogénico y posibilitará el registro minucioso de estas enfermedades para intentar correlacionar el fenotipo con el genotipo de los trastornos plaquetarios hereditarios. Por otra parte, los pacientes en los que no se encontraron mutaciones están siendo sometidos a secuenciación del exoma ante la sospecha de alteraciones en genes todavía no relacionados con este tipo de enfermedades.

Con los resultados aquí presentes, esperamos que nuestra herramienta de NGS pueda ayudar al correcto diagnóstico de estos pacientes complejos. En la misma línea, otras plataformas europeas, como ThromboGenomics (<http://ThromboGenomics.org.uk>) están implantando la NGS en el estudio molecular de los trastornos plaquetarios.

En relación con el algoritmo diagnóstico (Figura 10) [143] y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, sugerimos tres niveles de aplicación de las plataformas de NGS (Figura 15):

1. Si con las pruebas básicas sospechamos un trastorno con un fenotipo específico, como una trombocitopenia con herencia determinada (por ejemplo, una enfermedad relacionada con el gen *MYH9* o SPG) o un cuadro sindrómico característico (SHP, SWA o SCH, entre otros), proponemos la utilización del panel de NGS en primer lugar y a continuación, dirigir el estudio funcional a la alteración molecular detectada.
2. En aquellos casos en los que no hemos sido capaces de establecer un diagnóstico de sospecha claro con las pruebas básicas, el estudio con LTA y CMF será esencial para cribar que realmente estamos ante un trastorno plaquetario hereditario, e incluso, caracterizar y determinar el fenotipo específico, como un SBS o un TG. La aplicación del panel de NGS a este nivel nos permite confirmar el diagnóstico de los casos con un fenotipo específico. Puede ocurrir que el panel no haya detectado una alteración molecular, por lo que el estudio de las regiones reguladoras, intrones y/o grandes alteraciones estructurales estaría indicado. Por otra parte, en los casos con fenotipo indeterminado (LTA y/o CMF inespecífica), proponemos la utilización del panel ya que permite identificar nuevos diagnósticos y posteriormente dirigir el estudio funcional a una determinada alteración molecular.

3. Por último, aquellos casos en los que no hemos encontrado alteraciones genéticas y presentan alteraciones en las pruebas básicas y de cribado iniciales (LTA y CMF) son los más complejos y difíciles de abordar. En este punto, la aplicación de pruebas funcionales y morfológicas más complejas y el análisis molecular mediante WES o WGS ayudarían a detectar nuevos genes implicados y correlacionar su fenotipo con su genotipo.

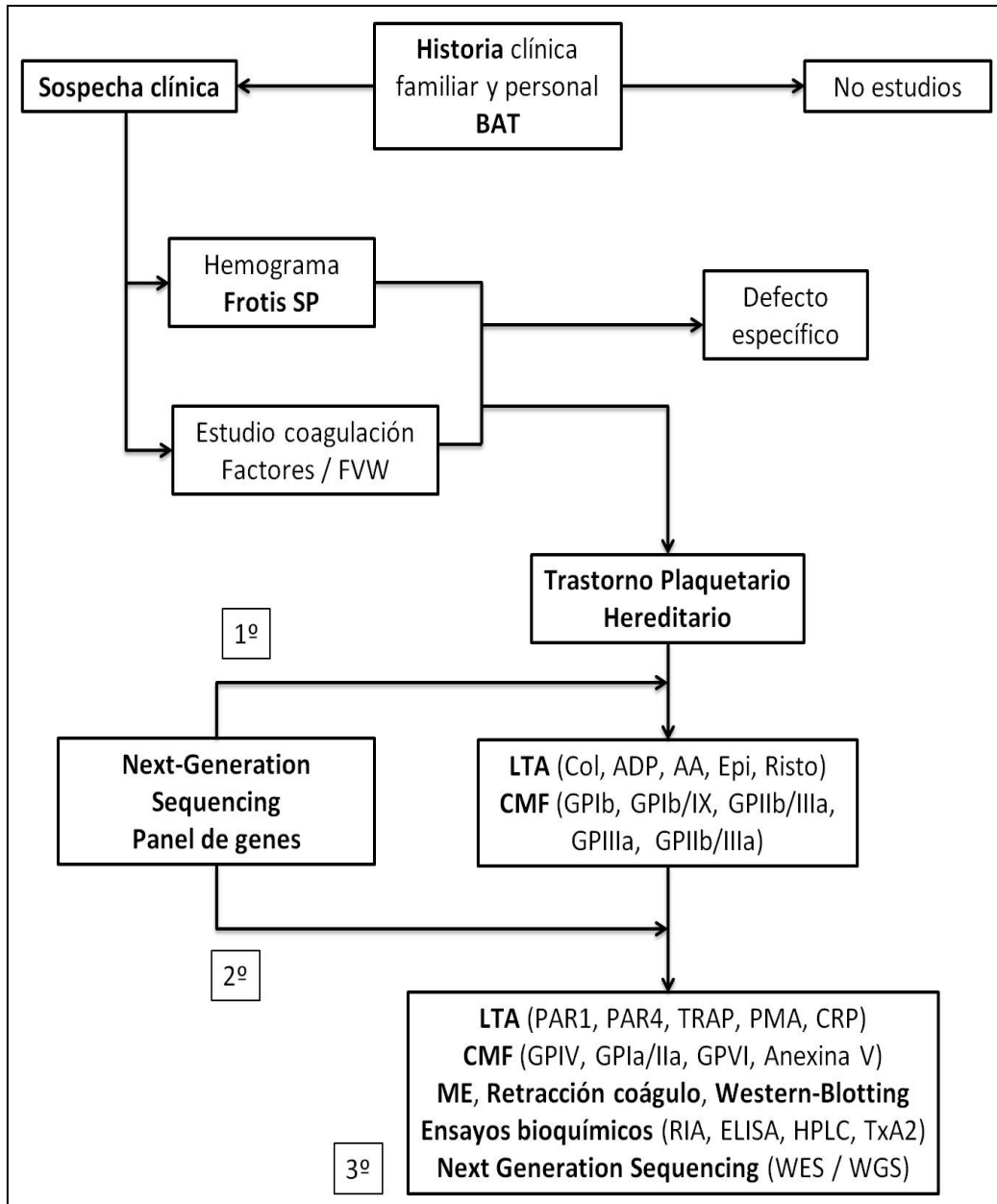


Figura 15. Propuesta de un nuevo algoritmo diagnóstico para los trastornos hereditarios plaquetarios.

En cuanto al estudio de los trastornos de la coagulación hereditaria mediante NGS (capítulo 2), el panel de 31 genes relacionados con la hemostasia secundaria detectó la variante patogénica concordante con el fenotipo del paciente en el 95% de los casos (19/20). Además, se encontraron 6 mutaciones no descritas previamente en la literatura. Este trabajo ha demostrado la efectividad, eficiencia y rapidez en el diagnóstico de este tipo de trastornos. Si bien es cierto que existen dos limitaciones principales de la técnica: 1) No es capaz de detectar grandes reordenamientos o alteraciones estructurales, por lo que en los casos de hemofilia A grave, en primer lugar siempre hay que descartar, en primer lugar, la inversión del IVS-22, lo que ocurre en el 45% de los casos, y, en segundo lugar, la inversión del IVS-1 (1-5%). Posteriormente, la NGS aportaría un análisis global del espectro mutacional dado que las principales mutaciones son *missense* o *nonsense* (CHAMP *F8* Mutation List) y hemos comprobado la alta sensibilidad y especificidad a la hora de detectar este tipo de mutaciones. 2) El análisis de todos los genes del panel, si existe un déficit específico de un determinado factor o proteína, es cuestionable. Sin embargo, la NGS aportará mayor rapidez a la hora de detectar las alteraciones y a un menor coste y tiempo empleado debido al gran número de exones que tiene cada gen y la poca frecuencia de mutaciones *hotspot* que ocurren en estos casos. Además, puede ayudar a diferenciar fenotipos similares. Es ilustrativo el caso número 20 de nuestro estudio, una portadora sintomática de Hemofilia A, que se pudo diagnosticar correctamente como una EVW-2N, con sus diferentes implicaciones terapéuticas y de consejo genético. 3) La aplicación del panel de genes relacionados con la hemostasia secundaria sería también útil en los casos con deficiencias combinadas de factores y en aquellos trastornos de la fase de contacto, en los que las técnicas de laboratorio no están completamente estandarizadas ni establecidas en la rutina diaria. Finalmente, la caracterización molecular de estos trastornos permitirá detectar nuevas mutaciones implicadas en su mecanismo etiopatogénico (Tabla 11), establecer una correlación entre el fenotipo clínico-laboratorio y el genotipo, facilitar el registro en las bases de datos y confirmar el diagnóstico en aquellos casos cuyas determinaciones en el laboratorio sean inespecíficas. Todo ello incrementará el conocimiento científico de estos trastornos de la coagulación.

Tabla 11. Número y tipo de variantes genéticas causantes de las DHH:

DHH	Mutaciones	Nuevas	Descritas	Total (%)
<i>Hemostasia Primaria: Plaquetario</i>	<i>Missense</i>	18	2	20 (65%)
	Deleciones	3	2	5
	Inserciones	2	---	2
	Fail to start	1	---	1
	SNPs	---	3	3
	Total (%)	24 (77%)	7	31
<i>Hemostasia Secundaria</i>	<i>Missense</i>	3	19	22 (85%)
	Deleciones	3	1	4
	Total (%)	6	20	26
Total		30 (53%)	27	57

De forma general, nuestros datos sugieren que la aplicación de la tecnología NGS mediante paneles de genes, tanto en los trastornos plaquetarios hereditarios como en los trastornos de la hemostasia secundaria, permitirá una mejora sustancial en el correcto diagnóstico. A igualdad de tiempo y coste, la re-secuenciación dirigida posee la capacidad de rastrear mutaciones en muchos más genes que la secuenciación clásica de Sanger; explora un mayor número de pacientes y genes de manera simultánea; detecta gran cantidad de variantes genéticas que son potencialmente candidatas y causantes de un fenotipo clínico y de laboratorio concreto; y, también, facilitan la búsqueda de la causa de las enfermedades de fenotipo inespecífico, que son, por otra parte, las más comunes y difícilmente abordables. Toda la información genética encontrada y correlacionada con el fenotipo clínico aporta un nuevo conocimiento científico y explica la variabilidad fenotípica y molecular de estas enfermedades. Estos avances tienen mayores implicaciones para la práctica clínica ya que la integración de los hallazgos genéticos en el manejo clínico de los pacientes mejorará la efectividad y eficiencia en el diagnóstico, posibilitará establecer el pronóstico y, más adelante, instaurar posibles tratamientos personalizados para los pacientes. La trascendencia de los resultados en el ámbito familiar permitirá asesorar a aquellos familiares en riesgo y llevar a cabo programas preventivos. La detección de las alteraciones genéticas va a influir en el consejo genético y en las recomendaciones de diagnóstico prenatal, diagnóstico pre-implantación u otras opciones reproductivas.

Por otra parte, aunque el análisis de costes, no es objeto de este trabajo, se podría concluir que la correcta caracterización del paciente y el estudio dirigido

repercutirá en un ahorro económico, evitando métodos diagnósticos repetitivos y tratamientos inadecuados y estableciendo las medidas preventivas oportunas para disminuir los episodios de sangrado.

Por todas estas consideraciones, creemos que el empleo de la NGS para el diagnóstico molecular en la práctica clínica habitual rutinaria estaría indicado en el estudio de las DHH en las que la secuenciación convencional no aporte resultados definitivos.

Sin embargo, existen una serie de limitaciones en el presente trabajo derivadas de la aplicación de la plataforma NGS que tienen que ver con la interpretación de los resultados.

En ocasiones, especialmente en las formas sindrómicas, cuando se encuentra una única mutación, se puede llegar a la conclusión, tal vez errónea, de que la totalidad del fenotipo, incluido el no hematológico, puede deberse a ese gen. En estos casos no hay que excluir la posibilidad de que el responsable sea otro gen no incluido en el panel. No obstante, un correcto análisis de los resultados puede ayudar a evitar falsas interpretaciones si, por ejemplo, se comprueba que el gen en cuestión no se ha asociado nunca con esos síntomas. Las posibilidades de interpretación errónea se reducen notablemente en el caso de que el estudio del fenotipo propiamente hemorrágico se complemente con estudios funcionales, que no son particularmente complejos. Otras veces nos podemos encontrar ante mutaciones que, simplemente, no estén relacionadas con el fenotipo que nos interesa. Aun así, esta información podría ser de utilidad si las herramientas de predicción sugieren su implicación en otras patologías, si bien aquí habrá que tener muy presente las consideraciones éticas del estudio. Por otra parte, la no identificación de una variante genética no debe excluir un diagnóstico clínico y de laboratorio, ya que otros genes, incluso mecanismos epigenéticos, no definidos hasta el momento, podrían jugar su papel (como ocurre en el caso 31). Finalmente, en aquellos fenotipos para los que se conoce de forma inequívoca la base molecular, como por ejemplo en el SBS, en el que los genes responsables son pocos (3) y no muy complejos la utilización de un panel de genes podría parecer, a priori, una pérdida de tiempo y dinero. Sin embargo, su uso nos permitirá diagnosticar estos casos de forma más rápida e identificar alteraciones simultáneas en otros genes que pudieran agravar o atenuar el fenotipo.

En resumen, con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ponemos a disposición de los hematólogos y los pediatras una herramienta con la que diagnosticar correctamente a un gran porcentaje de pacientes con DHH, lo que redundará en una mejora en el manejo clínico-terapéutico. Además, el gran número de genes incluidos en esta plataforma facilitará el descubrimiento de variantes patogénicas inéditas hasta el momento, que pueden originar nuevos proyectos, tanto a nivel clínico como desde un abordaje traslacional, profundizando en el conocimiento de las DHH y en un mejor control de estas patologías. La disponibilidad por la comunidad científica de la información generada por la NGS, , de una forma organizada y estandarizada, es de vital importancia para realizar un diagnóstico más preciso, establecer un pronóstico precoz o, incluso, un tratamiento personalizado, si bien antes será necesaria la secuenciación de un mayor número de individuos que abarquen un abanico poblacional más amplio y el desarrollo de nuevos métodos de análisis que permitan explotar la información obtenida de forma exitosa.

En definitiva, de este estudio se pueden derivar consecuencias prácticas inmediatas y puede suponer un avance en el capítulo de la innovación, contribuyendo progresivamente a dotar de herramientas diagnósticas de uso cotidiano más avanzadas a nuestro sistema de salud.

CONCLUSIONES

1. El desarrollo de dos paneles de secuenciación masiva (NGS), para los genes asociados con los trastornos de la hemostasia primaria y secundaria, ha permitido analizar más del 95% de las regiones codificantes de los genes implicados. Los resultados obtenidos por NGS basada en la captura de secuencia han sido concordantes con la secuenciación convencional.
2. La aplicación de la NGS mejora el rendimiento diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias. En los casos con un trastorno hereditario de la hemostasia secundaria es capaz de detectar las alteraciones genéticas en el 95% de los casos, siempre y cuando se hayan descartado previamente las mutaciones recurrentes, mientras que en los trastornos plaquetarios hereditarios alcanza un 70% de rendimiento.
3. La aplicación de la secuenciación masiva es especialmente útil en los casos de los trastornos plaquetarios hereditarios que no asocian un fenotipo específico. El hallazgo de mutaciones en estos enfermos permite su diagnóstico correcto, lo que, a su vez, facilita el manejo clínico, terapéutico y el consejo genético.
4. La utilización de ambos paneles podría incorporarse a la práctica clínica ya que permite el análisis genético rápido y eficaz de las diátesis hemorrágicas hereditarias, con un coste cada vez menor respecto a otras técnicas diagnósticas.
5. Desde el punto de vista traslacional, el diagnóstico genético rápido y preciso, así como el descubrimiento de nuevas mutaciones, permitirá abordar nuevos proyectos de investigación para estudios funcionales y celulares que profundicen en el conocimiento de las DHH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Israels SJ et al. Inherited disorders of platelet function and challenges to diagnosis of mucocutaneous bleeding. *Haemoph.* 2010;16:152-9.
2. Bunimov N et al. Genetic loci associated with platelet traits and platelet disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:291-305.
3. George JN. Platelets. *Lancet.* 2000;355:1531-9.
4. Broudy VC et al. Thrombopoietin stimulates colony-forming unit-megakaryocyte proliferation and megakaryocyte maturation independently of cytokines that signal through the gp130 receptor subunit. *Blood.* 1996;88:2026-32.
5. Raslova H et al. Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood.* 2007;109:3225-34.
6. Barroga CF et al. Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. *Exp Hematol.* 2008;36:1585-92.
7. Dolzhanskiy A et al. The development of human megakaryocytes: III. Development of mature megakaryocytes from highly purified committed progenitors in synthetic culture media and inhibition of thrombopoietin-induced polyploidization by interleukin-3. *Blood.* 1997;89:426-34.
8. Muntean AG, Crispino JD. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood.* 2005;106:1223.
9. Majka M et al. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood.* 2000;96:4142-51.
10. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat.* 1976;145:183.
11. De Botton S et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood.* 2002;100:1310-7.
12. Kapur R et al. Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. *J Immunol.* 2015;194:5579-87.
13. Pecci A, Balduini CL. Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol.* 2014;165:179-92.
14. Swieringa F et al. Targeting platelet receptor function in thrombus formation: the risk of bleeding. *Blood Rev.* 2014;28:9-21.
15. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 2007;100:1673.

16. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost.* 2001;86:189.
17. Watson SP et al. GPVI and integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1752-62.
18. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med.* 2011;89:109-21.
19. Nguyen KA et al. Specific activation, signalling and secretion profiles of human platelets following PAR-1 and PAR-4 stimulation. *Platelets.* 2015:1-4. [Epub ahead of print].
20. Tolhurst G et al. Interplay between P2Y(1), P2Y(12), and P2X(1) receptors in the activation of megakaryocyte cation influx currents by ADP: evidence that the primary megakaryocyte represents a fully functional model of platelet P2 receptor signaling. *Blood.* 2005;106:1644-51.
21. Mitsuhashi M et al. Necessity of thromboxane A2 for initiation of platelet-mediated contact sensitivity: dual activation of platelets and vascular endothelial cells. *J Immunol.* 2001;166:617-23.
22. Yang J et al. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem* 2002;277:46035.
23. Rivera J et al. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica.* 2009;94:700-11.
24. Wei AH et al. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol* 2009;147:415-30.
25. Nieswandt B et al. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2009;7:206–9.
26. Clyde-Smith J, et al. Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:32260–32267.
27. Van der Meijden PE et al. Key role of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:3481-92.
28. Nurden AT et al. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood.* 2011;118:5996-6005.
29. Zhang C, Yang Y. Microparticles are the basic storage units for different proteins in platelet granules. *Blood.* 2013;121:3298.

30. Stalker TJ et al. A systems approach to hemostasis: 3. Thrombus consolidation regulates intrathrombus solute transport and local thrombin activity. *Blood*. 2014;124:1824-31.
31. Rao AK. Inherited platelet function disorders: overview and disorders of granules, secretion, and signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27:585-11.
32. Geddis AE. Inherited thrombocytopenias: an approach to diagnosis and management. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:14-25.
33. Carubbi C et al. Laboratory diagnostics of inherited platelet disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52:1091-106.
34. Balduini CL et al. Diagnosis and management of inherited thrombocytopenias. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39:161-71.
35. Favier R, Raslova H. Progress in understanding the diagnosis and molecular genetics of macrothrombocytopenias. *Br J Haematol*. 2015;170:626-39.
36. Stoddart MT et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) presenting as severe pancytopenia in the first month of life. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60:E94-6.
37. Ballmaier M, Germeshausen M. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37:673-81.
38. Germeshausen M et al. MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Hum Mutat*. 2006;27:296.
39. Albers CA et al. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet*. 2012;44:435-9.
40. Yassaee VR et al. A new approach for molecular diagnosis of TAR syndrome. *Clin Biochem*. 2014;47:835-9.
41. Castillo-Caro P et al. Proximal radio-ulnar synostosis with bone marrow failure syndrome in an infant without a HOXA11 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010;32:479-85.
42. Stockley J et al; UK Genotyping and Phenotyping of Platelets Study Group. Enrichment of FLI1 and RUNX1 mutations in families with excessive bleeding and platelet dense granule secretion defects. *Blood*. 2013;122:4090-3.

43. Schmit JM et al. Two novel RUNX1 mutations in a patient with congenital thrombocytopenia that evolved into a high grade myelodysplastic syndrome. *Leuk Res Rep.* 2015;4:24-7.
44. Katzaki E et al. Syndromic mental retardation with thrombocytopenia due to 21q22.11q22.12 deletion: Report of three patients. *Am J Med Genet A.* 2010;152:1711-7.
45. Nesin V et al. Activating mutations in STIM1 and ORAI1 cause overlapping syndromes of tubular myopathy and congenital miosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:4197–202.
46. Morin G et al. Gain-of-Function Mutation in STIM1 (P.R304W) Is Associated with Stormorken Syndrome. *Hum Mutat.* 2014;35(10):1221-32.
47. Monteferrario D et al. A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med.* 2014;370:245-53.
48. De Rocco D et al. Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842:269-74.
49. Josefsson EC et al. Megakaryocytes possess functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J Exp Med.* 2011;208:2017-31.
50. Raslova H et al. FLI1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombopenia. *J Clin Invest.* 2004;114:77-84.
51. Balduini CL et al. Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis. *Thromb Haemost.* 2004;91:129-40.
52. Millikan PD et al. Inherited thrombocytopenia due to GATA-1 mutations. *Semin Thromb Hemost.* 2011;37:682-9.
53. Andrews RK, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:656-62.
54. Glembotsky AC et al. International collaboration as a tool for diagnosis of patients with inherited thrombocytopenia in the setting of a developing country. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1653-61.
55. Savoia A et al. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat.* 2014;35:1033-45.

56. Noris P et al. Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIIb/IIIa (Bolzano mutation). *Haematologica*. 2012;97:82-88.
57. Maurer M et al. Platelet-type von Willebrand Disease: Diagnostic Challenges. Flaws and Pitfalls Experienced in the THROMKID Quality Project. *Klin Padiatr*. 2015;227:131-6.
58. Cooney KA, Ginsburg D. Comparative analysis of type 2b von Willebrand disease mutations: implications for the mechanism of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood*. 1996;87: 2322-28.
59. Favalaro EJ. Phenotypic identification of platelet-type von Willebrand disease and its discrimination from type 2B von Willebrand disease: a question of 2B or not 2B? A story of nonidentical twins? Or two sides of a multidimensional or multifaceted primary-hemostasis coin?. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34:113-27.
60. Liang HP et al. Heterozygous loss of platelet glycoprotein (GP) Ib-V-IX variably affects platelet function in velocardiofacial syndrome (VCFS) patients. *Thromb Haemost*. 2007;98:1298–1308.
61. Yagi H et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*. 2003;362:1366-73.
62. Hauschner H et al. Abnormal cytoplasmic extensions associated with active α IIb β 3 are probably the cause for macrothrombocytopenia in Glanzmann thrombasthenia-like syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26:302-8.
63. Blavignac J et al. Quebec platelet disorder: update on pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37:713-20.
64. Bottega R et al. Correlation between platelet phenotype and NBEAL2 genotype in patients with congenital thrombocytopenia and α -granule deficiency. *Haematologica*. 2013;98:868-74.
65. Massaad MJ et al. Wiskott-aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1285:26-43.
66. Hacein-Bey Abina S et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA*. 2015;313:1550-63.
67. Imai K et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*. 2004;103:456-464.
68. Nurden P et al. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood*. 2011;111:5928-37.

69. Parrini E et al. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain*. 2006; 129:1892-06.
70. LaPointe MM et al. Germline mosaicism in X-linked periventricular nodular heterotopia. *BMC Neurol*. 2014;14:125.
71. Noris P et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*. 2011;117:6673-80.
72. Necchi V et al. Ubiquitin/proteasome-rich particulate cytoplasmic structures (PaCSs) in the platelets and megakaryocytes of ANKRD26-related thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 2013;109:263-71.
73. Bottega R et al. ACTN1-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. *Blood*. 2015;125:869-72.
74. Kunishima S et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013;92:431-8.
75. Kunishima S et al. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2014;92:276-82.
76. Seri M et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82:203-15.
77. Savoia A et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9-RD): neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost*. 2010;103:826-32.
78. Pecci A et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum mutat*. 2014;35:236-47.
79. Manchev VT et al. A new form of macrothrombocytopenia induced by a germ-line mutation in the PRKACG gene. *Blood*. 2014;124:2554-63.
80. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMPdependent signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2012;10:167-76.
81. Wang Z et al. Specific macrothrombocytopenia/hemolytic anemia associated with sitosterolemia. *Am J Hematol*. 2014;89:320-4.

82. Kanaji, T et al. Platelet hyperreactivity explains the bleeding abnormality and macrothrombocytopenia in a murine model of sitosterolemia. *Blood*. 2013;122:2732-42.
83. Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelet function: selected updates. *J Thromb Haemost*. 2015;13:S2-9.
84. Lowe GC et al. UK GAPP study group. Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1663-8.
85. Watson SP et al. GAPP consortium. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost*. 2013;11:351-63.
86. Bolton-Maggs PH et al. UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol*. 2006;135:603-33.
87. Gothwal M et al. Genetics of inherited platelet disorders. *Hamostaseologie*. 2014;34:133-41.
88. Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br J Haematol*. 2015;170:150-61.
89. Matus V et al. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1751-9.
90. Nurden P et al. An acquired inhibitor to the GPVI platelet collagen receptor in a patient with lupus nephritis. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1541-9.
91. Shaffer JR, Kammerer CM, Dorn J, et al. Polymorphisms in the platelet-specific collagen receptor GP6 are associated with risk of nonfatal myocardial infarction in Caucasians. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011;21:546–52.
92. Nurden A, Nurden P. Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *J Thromb Haemost*. 2011;9:76–91.
93. Cattaneo M. P2Y12 receptors: structure and function. *J Thromb Haemost*. 2015;13:S10-6.
94. Lecchi A et al. Identification of a new dysfunctional platelet P2Y12 receptor variant associated with bleeding diathesis. *Blood*. 2015;125:1006-13.
95. Mumford AD et al. UK GAPP Study Group. Platelet dysfunction associated with the novel Trp29Cys thromboxane A2 receptor variant. *J Thromb Haemost*. 2013;11:547-54.

96. Nisar SP et al. UK GAPP study group. A novel thromboxane A₂ receptor N42S variant results in reduced surface expression and platelet dysfunction. *Thromb Haemost.* 2014;111:923-32.
97. Hayward CP et al. An autosomal dominant, qualitative platelet disorder associated with multimerin deficiency, abnormalities in platelet factor V, thrombospondin, von Willebrand factor, and fibrinogen and an epinephrine aggregation defect. *Blood.* 1996;87:4967-78.
98. Nurden AT et al. Expanding the mutation spectrum of integrin α IIb β 3 in Glanzmann thrombasthenia: studies on a large international cohort. *Hum Mutat.* 2015;36:548-61.
99. Nurden AT et al. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on phenotypic variability and mouse models. *Blood.* 2011;18,5996-05.
100. Genevieve, D et al. Thromboxane synthase mutations in an inherited bone density disorder (Ghosal syndrome). *Nature Genetics.* 2008;40:284-86.
101. Adler, D.H. et al. Inherited human cPLA₂a deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction. *J Clin Invest.* 2008;118:2121-31.
102. Dubé JN et al. Characterization of a partial prostaglandin endoperoxide H synthase-1 deficiency in a patient with a bleeding disorder. *Br J Haematol.* 2001;113:878-85.
103. Noé L et al. Platelet G_s hypofunction and abnormal morphology resulting from a heterozygous RGS2 mutation. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1594-03.
104. Van Geet C et al. Human platelet pathology related to defects in the G-protein signaling cascade. *J Thromb Haemost.* 2009;7:282-86.
105. Freson K et al. Pseudohypoparathyroidism type Ib with disturbed imprinting in the GNAS1 cluster and G α deficiency in platelets. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2741.
106. van de Vijver E et al. Defects in Glanzmann thrombasthenia and LAD-III (LAD-1/v) syndrome: the role of integrin β 1 and β 3 in platelet adhesion to collagen. *Blood.* 2012;119:583-6.
107. Canault M et al. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *J Exp Med.* 2014;211:1349-62.

108. Seo SH et al. Identification of novel mutations in the VPS33B gene involved in arthrogyrosis, renal dysfunction, and cholestasis syndrome. *Clin Genet.* 2015;88:80-4.
109. Sánchez-Guiu I et al. Hermansky-Pudlak syndrome. Overview of clinical and molecular features and case report of a new HPS-1 variant. *Hamostaseologie.* 2014;34:301-9.
110. Sánchez-Guiu I et al. Chediak-Higashi syndrome: description of two novel homozygous missense mutations causing divergent clinical phenotype. *Eur J Haematol.* 2014;92:49-58.
111. Huizing M et al. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:359-86.
112. Yasumi T et al. Laboratory parameters identify familial haemophagocytic lymphohistiocytosis from other forms of paediatric haemophagocytosis. *Br J Haematol.* 2015;170:532-8.
113. Castoldi E et al. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood.* 2011;117:4399-400.
114. Blanchette VS et al. Subcommittee on Factor VIII, Factor IX and Rare Coagulation Disorders. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12:1935-9.
115. Mann KG et al. Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36:108-17.
116. Oliver J et al. Thrombin activates factor XI on activated platelets in absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:170-77.
117. Crawley JT et al. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2007;5:95-01.
118. Acharya SS, Dimichele DM. Rare inherited disorders of fibrinogen. *Haemophilia.* 2008;14:1151-8.
119. Peyvandi F et al. Rare bleeding disorders: worldwide efforts for classification, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:579-84.
120. Peyvandi F, Kunicki T, Lillicrap D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood.* 2013;122:3423-31.
121. Peyvandi F et al. Rare bleeding disorders. *Haemophilia.* 2012;18:148-53.

122. Di Minno MN et al. STER Study Group. Bleeding symptoms at disease presentation and prediction of ensuing bleeding in inherited FVII deficiency. *Thromb Haemost.* 2013;109:1051-9.
123. Repessé Y et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1469-76.
124. Santagostino E, Fasulo MR. Hemophilia a and hemophilia B: different types of diseases?. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:697-01.
125. James P, Salomon O, Mikovic D, Peyvandi F. Rare bleeding disorders- bleeding assessment tools, laboratory aspects and phenotype and therapy of FXI deficiency. *Haemophilia.* 2014;20:71-5.
126. Biswas A et al. Coagulation factor XIII deficiency. Diagnosis, prevalence and management of inherited and acquired forms. *Hamostaseologie.* 2014;34:160-6.
127. Katsuda I et al. A new type of plasma prekallikrein deficiency associated with homozygosity for Gly104Arg and Asn124Ser in apple domain 2 of the heavy-chain region. *Eur J Haematol.* 2007;79:59-68.
128. James PD, D. Von Willebrand disease: Clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies. *Am J Hematol.* 2012;87:S4-11.
129. Hassan AA, Kroll MH. Acquired disorders of platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:403-8.
130. Harrison P et al. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* 2011;155:30-44.
131. Cines DB et al. Congenital and acquired thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:390-406.
132. Mauer AC et al. Impact of sex, age, race, ethnicity and aspirin use on bleeding symptoms in healthy adults. *J Thromb Haemost.* 2011;9:100-8.
133. Rodeghiero F et al. ISTH/SSC joint VWF, Perinatal/ Pediatric Hemostasis Subcommittees Working Group. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8:2063-5.
134. Gresele P et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost.* 2014;12:1562-9.

135. Noris P et al. Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune thrombocytopenia: a multicentric, real life study. *Br J Haematol.* 2013;162:112-9.
136. Noris P et al. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood.* 2014;124:e4-e10.
137. Abe Y et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res.* 2006;118:463-9.
138. Jennings I et al. Platelet function testing: practice among UK National external quality assessment scheme for blood coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol.* 2008;61:950-54.
139. Hayward CP et al. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost.* 2006;4:312-9.
140. Israels SJ et al. Platelet disorders in children: A diagnostic approach. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;56:975-83.
141. Harrison P, Lordkipanidzé M. Testing platelet function. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27:411-41.
142. Quiroga, T et al. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost.* 2004;2:892-98.
143. Gresele P; Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015;13:314-22.
144. Dawood BB et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood.* 2012;120:5041-49.
145. Cattaneo M et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013;11:1183-9.
146. Mumford AD et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost.* 2015;114:14-25.
147. Rubak P et al. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry. *Platelets.* 2015 Apr 22:1-9. [Epub ahead of print].

148. Sánchez-Guiu I et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;4;9:213.
149. De Cuyper IM et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood.* 2013;121:e70-80.
150. Clauser, S. & Cramer-Borde, E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35:213-23.
151. Quiroga, T. & Mezzano, D. Is my patient a bleeder? A diagnostic framework for mild bleeding disorders. *Hemat Am Soc Hemat Educ Program.* 2012;466-74.
152. Zetterberg E et al. Thrombin generation in two families with MYH9-related platelet disorder. *Platelets.* 2015 Aug 6:1-4. [Epub ahead of print].
153. Daly ME et al. What is the role of genetic testing in the investigation of patients with suspected platelet function disorders? *Br J Haematol.* 2014;165:193-03.
154. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br J Haematol* 2014;165:165-78.
155. Venter JC et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291:1304-51.
156. International HapMap Consortium. A Haplotype Map of the Human Genome. *Nature.* 2005;437:1299-320.
157. Tucker T et al. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet.* 2009;85:142-54.
158. Lowe GC et al. UK GAPP collaborative. Microsatellite markers as a rapid approach for autozygosity mapping in Hermansky-Pudlak syndrome: identification of the second HPS7 mutation in a patient presenting late in life. *Thromb Haemost.* 2013;109:766-8.
159. Watson, S et al. Phenotypic approaches to gene mapping in platelet function disorders, identification of new variant of P2Y12, TxA2 and GPVI receptors. *Hamostaseologie.* 2012;30:29–38.
160. van Dijk EL et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30:418-26.
161. Auton A et al. 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68-74.
162. Bielczyk-Maczynska E et al. A loss of function screen of identified genome-wide association study Loci reveals new genes controlling hematopoiesis. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004450.

163. Scavone M et al. Usefulness of the INNOVANCE PFA P2Y test cartridge for the detection of patients with congenital defects of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Res.* 2014;133:254-56.
164. Lordkipanidze M et al. UK Genotyping and Phenotyping of Platelets Study Group. Characterization of multiple platelet activation pathways in patients with bleeding as a highthroughput screening option: use of 96-well Optimul assay. *Blood.* 2014;123:e11-22.
165. Dovlatova N et al. UK GAPP Study Group. Evaluation of a whole blood remote platelet function test for the diagnosis of mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2014;12:660-5.
166. Mackie I et al. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol.* 2013;35:1-13.
167. Kamal AH et al. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc.* 2007;82:864-73.
168. Kottke-Marchant K. Algorithmic approaches to hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40:195-204.
169. Palla R et al. Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood.* 2015;125:2052-61.
170. Mumford AD et al. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2014;167:304-26.
171. Laffan MA et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2014;167:453-65.
172. Bach JE et al. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost.* 2015;114:757-67.
173. Batlle J et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost.* 2015;114. [Epub ahead of print].

174. Natrajan R, Reis-Filho JS. Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11:425-44.
175. Sikkema-Raddatz B et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 2013;34:1035-42.
176. Talkowski ME et al. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. *Am J Hum Genet.* 2011;88:469-81.
177. Linnarsson S. Recent advances in DNA sequencing methods – general principles of sample preparation. *Exp Cell Res.* 2010;316:1339-43.
178. Durbin R et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467:1061-73.
179. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res.* 2012;5:887-900.
180. McKenna A et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing nextgeneration DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20:1297-03.
181. McLaren W et al. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics.* 2010;26:2069-70.
182. Horner DS et al. Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Brief Bioinform.* 2010;11:181-97.
183. Robinson JT et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29:24-6.
184. Strom SP et al. Assessing the necessity of confirmatory testing for exome-sequencing results in a clinical molecular diagnostic laboratory. *Genet Med.* 2014;16:510.
185. Yang Y et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013;369:1502.
186. Waldmüller S et al. Targeted 46-gene and clinical exome sequencing for mutations causing cardiomyopathies. *Mol Cell Probes.* 2015. [Epub ahead of print].
187. Gillespie RL et al. Personalized diagnosis and management of congenital cataract by next-generation sequencing. *Ophthalmol.* 2014;121:2124-37.
188. Mutz KO et al. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24:22-30.
189. Mills JD, Janitz M. Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging.* 2012;33:1012.e11-24.

190. Takahashi JS et al. ChIP-seq and RNA-seq methods to study circadian control of transcription in mammals. *Methods Enzymol.* 2015;551:285-21.
191. Masser DR et al. Targeted DNA methylation analysis by next-generation sequencing. *J Vis Exp.* 2015;24:96-107.
192. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med.* 2014;370:2418-25.
193. Yohe S et al. Clinical validation of targeted next-generation sequencing for inherited disorders. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139:204-10.
194. Bell CJ et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2011;3:65ra4.
195. Blue Cross and Blue Shield Association. Special report: exome Sequencing for clinical diagnosis of patients with suspected genetic disorders. *Technol Eval Cent Assess Program Exec Summ.* 2013;28:1-4.
196. Meder B, Haas J, Keller A, Heid C, Just S, Borries A, et al. Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011;4:110-22.
197. Bamshad MJ et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet.* 2011;12:745-55.
198. Green RC et al. Clinical genome sequencing. In: Ginsburg GS, Willard HF, eds. *Genomic and personalized medicine.* London: Elsevier/Academic Press.2013:102-22.
199. Hong H et al. Critical role of bioinformatics in translating huge amounts of next-generation sequencing data into personalized medicine. *Sci China Life Sci.* 2013;56:110-8.
200. MacArthur D et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature.* 2014;508:469-76.
201. Fernald GH et al. Bioinformatics challenges for personalized medicine. *Bioinformatics.* 2011;27:1741-8.
202. Leo VC et al. UK GAPP Study Group. Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2015;13:643-50.
203. Lambert MP. What to do when you suspect an inherited platelet disorder. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:377-83.

204. Lu JT et al. Genotype-phenotype correlation--promiscuity in the era of next-generation sequencing. *N Engl J Med.* 2014;371:593-6.
205. Westbury S et al and BRIDGE-BPD. Consortium. Human phenotype ontology annotation and cluster analysis to unravel genetic defects in 707 cases with unexplained bleeding and platelet disorders. *Genome Med.* 2015;7:36.
206. Ng C et al. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood.* 2015;125:2029-37.
207. Reyes Alcázar V. Búsqueda bibliográfica avanzada. Disponible en: <http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/busquedas%20avanzadas.pdf>.
208. Koboldt DC et al. Massively parallel sequencing approaches for characterization of structural variation. *Methods Mol Biol.* 2012;838:369-84.
209. Stenson PD et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet.* 2014;133:1-9.
210. Fletcher SJ et al. SLFN14 mutations underlie thrombocytopenia with excessive bleeding and platelet secretion defects. *J Clin Invest.* 2015;125:3600-5.
211. Levin C et al. Deleterious mutation in the FYB gene is associated with congenital autosomal recessive small-platelet thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2015;13:1285-92.
212. Liu YT et al. What we have learned from the next-generation sequencing: Contributions to the genetic diagnoses and understanding of pathomechanisms of neurodegenerative diseases. *J Neurogenet.* 2015 Jul 9:1-10. [Epub ahead of print].
213. Gunay-Aygun M et al. Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p. *Blood.* 2010;116:4990-01.
214. Rabbani B et al. Next-generation sequencing: impact of exome Sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet.* 2012;57:621-32.
215. Hayden EC. Technology: The \$1,000 genome. *Nature.* 2014;507:294-5.
216. Bennett ST et al. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics.* 2005;6:373-82.
217. Wood AR et al. Imputation of Variants from the 1000 Genomes Project Modestly Improves Known Associations and Can Identify Low-frequency Variant-Phenotype Associations Undetected by HapMap Based Imputation. *PLoS One.* 2013; 8:e64343.

218. Dewey FE et al. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. *JAMA*. 2014;311:1035-45.
219. de Koning TJ et al. Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15:61-70.
220. Weaver JM, Edwards PA. Targeted next-generation sequencing for routine clinical screening of mutations. *Genome Med*. 2011;3:58.
221. Daber R et al. Understanding the limitations of next generation sequencing informatics, an approach to clinical pipeline validation using artificial data sets. *Cancer Genet*. 2013;206:441-8.
222. Hernan I et al. Detection of genomic variations in BRCA1 and BRCA2 genes by long-range PCR and next-generation sequencing. *J Mol Diagn*. 2012;14:286-93.
223. Handel AE et al. Next-generation sequencing in understanding complex neurological disease. *Expert Rev Neurother*. 2013;13:215-27.
224. Consugar MB et al. Panel-based genetic diagnostic testing for inherited eye diseases is highly accurate and reproducible, and more sensitive for variant detection, than exome sequencing. *Genet Med*. 2015;17:253-61.
225. Wei X et al. Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/BMD: a multi-population diagnostic study. *Eur J Hum Genet*. 2014;22:110-8.
226. Gnirke A et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol*. 2009;27:182-9.
227. Tewhey R et al. Enrichment of sequencing targets from the human genome by solution hybridization. *Genome Biol*. 2009;10(10):R116.
228. Gullapalli RR et al. Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. *J Pathol Inform*. 2012;3:40.
229. Richards S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405-24.
230. Rehm H, Bale SJ et al.; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15:733-47.

231. Zhang Z-Y et al. Analysis of clinical and molecular characteristics of Wiskott–Aldrich syndrome in 24 patients from 23 unrelated Chinese families. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21:522-32.
232. Cattaneo M. Bleeding manifestations of congenital and drug-induced defects of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Haemost.* 2011;105:S67-74.

ANEXOS

Anexo 1

Escala de sangrado, basada en el ISTH-BAT, para establecer la sospecha diagnóstica de DHH. Fue recogida por el clínico y aplicada tanto en los pacientes como en los familiares referidos, previo a su inclusión en el estudio.

Nombre: _____
 Fecha de nacimiento: _____

Síntoma	Grado				Mo aplicable
	0	1	2	3	
Epistaxis	Ninguno o insignificante	Presente	Taponamiento, cauterización	Transfusión	
Cutáneo	Ninguno o insignificante	Petequias o equimosis	Hematomas	Valoración médica	
Sangrado en heridas pequeñas	Ninguno o insignificante	Presente (1-5 episodios/año)	Valoración médica	Hemostasia quirúrgica	
Cavidad oral	Ninguno o insignificante	Presente	Valoración médica	Hemostasia quirúrgica, transfusión	
Sangrado gastrointestinal	Ninguno o insignificante	Presente	Valoración médica	Cirugía/transfusión	
Extracción dentaria	Ninguno o insignificante	Presente	Sutura o compresión	Transfusión	
Cirugía	Ninguno o insignificante	Presente	Sutura o reintervención	Transfusión	
Menorragia	Ninguno o insignificante	Presente	Valoración médica, anticonceptivos, terapia con hierro	Transfusión, legrado, histerectomía	
Hemorragia postparto	Ninguno o insignificante	Presente, terapia con hierro	Transfusión, legrado, sutura	Histerectomía	
Hematoma muscular	Ninguno o insignificante	Presente	Valoración médica	Transfusión, cirugía	
Hemartros	Ninguno o insignificante	Presente	Valoración médica	Transfusión, cirugía	

Notas: _____

Nombre de la persona que entrevista: _____
 Fecha: _____

Anexo 2

Publicaciones, comunicaciones en congresos nacionales e internacionales y premios recibidos a los trabajos científicos relacionados con la presente tesis doctoral:

1. Publicaciones:

- Capítulo 1. Design and validation of a 71-gene Next-Generation DNA sequencing panel for the diagnosis of inherited platelet disorders. [sometido].
- Capítulo 2. Design and application of a thirty one-gene panel by Next-Generation sequencing for Inherited bleeding coagulation disorders. Hemophilia. [Second review].
- Capítulo 3: A novel missense mutation in *RASGRP2* abrogates Rap1 activation causing platelet dysfunction. [sometido].

2. Comunicaciones Internacionales:

- OP103080 (Oral Presentation). Usefulness of targeted Next-Generation sequencing in Inherited platelet disorders with unspecific phenotype.
Autores: Bastida Bermejo JM, Del Rey M, Benito R, Sánchez-Guiu I, Riesco S, Peñarrubia MJ, Fisac R, García-Frade LJ, Aguilar C, Cebeiro MJ, Martínez MP, Pardal E, Aguilera C, Fontecha E, Pérez B, Llinares ME, Fuster JL, González-López T, Ramos R, Cardesa MR, González B, Alonso MT, Rivera J, Lozano ML, Hernández-Rivas JM, González-Porras JR.
Congreso: EHA congress 2015. Viena, Austria.
Bastida JM et al. Usefulness of targeted next-generation sequencing in inherited platelet disorders with unspecific phenotype. *Haematologica*. 2015;100,186.
- PO4210 (Poster Session). Design and validate of Next-Generation Sequencing panel for Inherited platelet disorders.
Autores: Bastida JM, Del Rey M, Benito R, Sánchez-Guiu I, Peñarrubia MJ, Fisac R, García-Frade LJ, Aguilar C, Cebeiro MJ, Martínez MP, Fontecha E, Pérez B, Aguilera C, Rivera J, Lozano ML, Hernández-Rivas JM, González-Porras JR.
Congreso: ASH congress 2014. San Francisco, California, EEUU.
Bastida JM et al. Design and validate of next-generation sequencing panel for inherited platelet disorders. *Blood*. 2014;124:4210.

3. Comunicaciones Nacionales:

- CO127 (Comunicación Oral). La secuenciación masiva permite el diagnóstico molecular de un gran número de trombocitopenias y trombopatías hereditarias.
Autores: Bastida Bermejo JM, Del Rey M, Benito R, Riesco S, Peñarrubia MJ, Fisac R, García-Frade LJ, Aguilar C, Cebeiro MJ, Martínez MP, Pardal E, Aguilera C, Fontecha E, Pérez B, Llinares ME, González-López T, Ramos R, Cardesa MR, González B, Alonso MT, Marneth A, van der Reijden B, Cid AR, Sedivas T, López MF, Vicente V, Rivera J, Lozano ML, Hernández-Rivas JM, González-Porras JR.
Congreso: LVII Congreso Nacional de la SEHH – XXXI Congreso Nacional de la SETH 2015. Valencia, España.

- CO08 (Comunicación Oral). Trombopenia grave infantil refractaria al tratamiento.
Autores: López Cadenas F, Martín L, Ferré O, Álvarez N, Riesco S, González B, Martín AA, del Rey M, Benito R, González Porras JR, Bastida JM.
Congreso: XXXII Congreso anual de la Sociedad Castellano-Leonesa de Hematología y Hemoterapia SCLHH 2015. Ponferrada, León, España.

- SP02 (Sesión Plenaria). Diseño y validación de un panel de secuenciación masiva dirigida al diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias.
Autores: Bastida JM, Del Rey M, Benito R, Sánchez-Guiu I, Peñarrubia MJ, Fisac R, García-Frade LJ, Aguilar C, Cebeiro MJ, Martínez MP, Fontecha E, Pérez B, Aguilera C, Rivera J, Lozano ML, Hernández-Rivas JM, González-Porras JR.
Congreso: LVI Congreso Nacional de la SEHH – XXX Congreso Nacional de la SETH 2014. Madrid, España.

- CO01 (Comunicación Oral). Diseño y validación de un panel de secuenciación masiva dirigida al diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias.
Autores: Bastida JM, Álvarez N, Riesco S, González-Porras JR, Benito A, Manzano S, Muriel M, Mendoza MC.
Congreso: XXVII Memorial Guillermo Arce y Ernesto Sánchez Villares 2014. Salamanca, España.

Premios:

- Premio FUCALHH 2015 a la mejor comunicación presentada en el XXXII congreso anual de la Sociedad Castellano-Leonesa de Hematología y Hemoterapia SCLHH 2015.
CO08. Trombopenia grave infantil refractaria al tratamiento.
Autores: López Cadenas F, Martín L, Ferré O, Álvarez N, Riesco S, González B, Martín AA, del Rey M, Benito R, González Porras JR, Bastida JM.

- Premio de la fundación española de trombosis y hemostasia a las mejores comunicaciones presentadas al congreso nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia SETH 2014.
SP02. Diseño y validación de un panel de secuenciación masiva dirigida al diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias.
Autores: Bastida JM; Del Rey M; Benito R; Sánchez-Guiu I; Peñarrubia MJ; Fisac R; García-Frade LJ; Aguilar C; Cebeiro MJ; Martínez MP; Fontecha E; Pérez B; Aguilera C; Rivera J; Lozano ML; Hernández-Rivas JM; González-Porras JR.

- Primer premio a la mejor comunicación presentada en el XXVII Memorial Guillermo Arce y Ernesto Sánchez Villares 2014.
CO01. Diseño y validación de un panel de secuenciación masiva dirigida al diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias.
Autores: Bastida JM, Álvarez N, Riesco S, González-Porras JR, Benito A, Manzano S, Muriel M, Mendoza MC.

