

# Feno-genotipificación de trombocitopenias hereditarias: nuestra experiencia en 50 familias



ARTICULO ORIGINAL

## Pheno-genotyping of inherited thrombocytopenias: our experience in 50 families

Heller PG<sup>1,2</sup>, Goette NP<sup>1</sup>, Marin Oyarzún C<sup>1,2</sup>, Baroni Pietto MC<sup>1,2</sup>, Ayala D<sup>1,2</sup>, Altuna D<sup>3</sup>, Arrieta ME<sup>4</sup>, Arbesú G<sup>5</sup>, Basquiera AL<sup>6</sup>, Bazack N<sup>7</sup>, Bonaccorso S<sup>8</sup>, Brodsky A<sup>8</sup>, Castro Ríos M<sup>9</sup>, Cosentini ML<sup>10</sup>, Donato H<sup>11,12</sup>, Korin J<sup>13</sup>, Gomez S<sup>14</sup>, Guglielmone H<sup>15</sup>, Lagrotta P<sup>16</sup>, Marti A<sup>17</sup>, Negro F<sup>18</sup>, Rapetti MC<sup>11</sup>, Rosso D<sup>8,20</sup>, Ponzinibbio C<sup>19</sup>, Veber E<sup>20</sup>, Zerga ME<sup>21</sup>, Molinas FC<sup>1,2</sup>, Savoia A<sup>22,23</sup>, Pecci A<sup>24</sup>, Marta RF<sup>1,2</sup>, Glembotsky AC<sup>1,2</sup>.

HEMATOLOGÍA  
Volumen 24 n° 2: xx-xx  
Mayo - Agosto 2020

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

<sup>2</sup> División Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad de Buenos Aires, CABA.

<sup>3</sup> Hospital Italiano de Buenos Aires. CABA.

<sup>4</sup> Hospital "Dr. Guillermo Rawson", San Juan.

<sup>5</sup> Hospital "Dr Humberto Notti", Godoy Cruz, Mendoza.

<sup>6</sup> Hospital Privado Universitario de Córdoba. Córdoba

<sup>7</sup> Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez", CABA.

<sup>8</sup> Hospital de Clínicas "José de San Martín", CABA.

<sup>9</sup> Consultorios Hematológicos San Isidro, Buenos Aires.

<sup>10</sup> Hospital Materno Infantil "Dr Héctor Quintana", Jujuy.

<sup>11</sup> Hospital del Niño de San Justo, Buenos Aires.

<sup>12</sup> Consultorios de Hematología Infantil, CABA.

<sup>13</sup> Sanatorio de los Arcos, CABA.

<sup>14</sup> Instituto Modelo de Oncología Clínica. San Juan.

<sup>15</sup> Sanatorio Allende, Córdoba.

<sup>16</sup> Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas", Buenos Aires.

<sup>17</sup> Hospital "El Cruce", Florencio Varela, Buenos Aires.

<sup>18</sup> Sanatorio Sagrado Corazón, CABA.

<sup>19</sup> Hospital Italiano de La Plata, La Plata, Buenos Aires.

<sup>20</sup> Hospital "Pedro de Elizalde", CABA.

<sup>21</sup> Instituto de Oncología "Angel Roffo", CABA.

<sup>22</sup> Instituto para la Salud Materna e Infancia, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italia.

<sup>23</sup> Departamento de Ciencias Médicas, Universidad de Trieste, Trieste, Italia.

<sup>24</sup> Departamento de Medicina Interna, Fundación IRCCS Policlinico S. Matteo, Universidad de Pavia, Pavia, Italia.

anaglem@gmail.com

Fecha recepción: 26/6/2020

Fecha aprobación: 1/7/2020

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN PLENARIA EN MARCO DEL XXIV CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA - PREMIO INVESTIGACIÓN CLÍNICA

**Palabras claves:** plaquetas, trombocitopenias hereditarias, secuenciación de nueva generación.

**Keywords:** platelets, inherited thrombocytopenias, NGS.

## Resumen

Dada la heterogeneidad de las entidades comprendidas en las trombocitopenias hereditarias y la escasez de marcadores distintivos, su diagnóstico constituye un verdadero desafío. El abordaje clásico se basa en la caracterización fenotípica seguida del estudio molecular de genes candidatos, orientado según la sospecha clínica. La introducción de la secuenciación de nueva generación (NGS), que permite evaluar múltiples genes simultáneamente, constituye una alternativa diagnóstica de alto costo, siendo de acceso limitado en nuestro medio. Nos propusimos evaluar la utilidad del abordaje clásico en una cohorte consecutiva de 50 familias y describir la aplicación de NGS en un subgrupo de pacientes sin diagnóstico etiológico luego del enfoque clásico. Mediante el abordaje clásico se efectuó el diagnóstico en 27 (54%) familias. Posteriormente, 8 familias que quedaron sin diagnóstico luego del algoritmo clásico, se evaluaron mediante NGS, identificando el gen causal en 4 de ellas. Considerando ambos abordajes, el rédito diagnóstico fue 31/50 (62%) familias, con la siguiente distribución: 38% desorden relacionado a *MYH9*, 8% síndrome de Bernard-Soulier (4% clásico, 4% monoalélico), 4% síndrome de plaquetas grises, 4% desorden plaquetario con predisposición a leucemia, 6% trombocitopenia relacionada a *ANKRD26*, 2% síndrome Wiskott-Aldrich. Los pacientes en los que no se pudo efectuar un diagnóstico etiológico presentaban trombocitopenia aislada leve, con aumento moderado del tamaño plaquetario y sangrado escaso.

En conclusión, la aplicación de NGS permitió aumentar el rédito diagnóstico, si bien sería necesario ampliar la población estudiada para establecer el valor real de este abordaje en nuestro medio. Por lo tanto, el uso inicial del abordaje clásico, reservándose la aplicación posterior de NGS a los casos que permanecen sin diagnóstico luego de este enfoque, constituiría una alternativa útil en países con pocos recursos, apuntando a un diagnóstico adecuado que posibilite la pesquisa de complicaciones sindrómicas, oriente al tratamiento y consejo genético acertado.

## Abstract

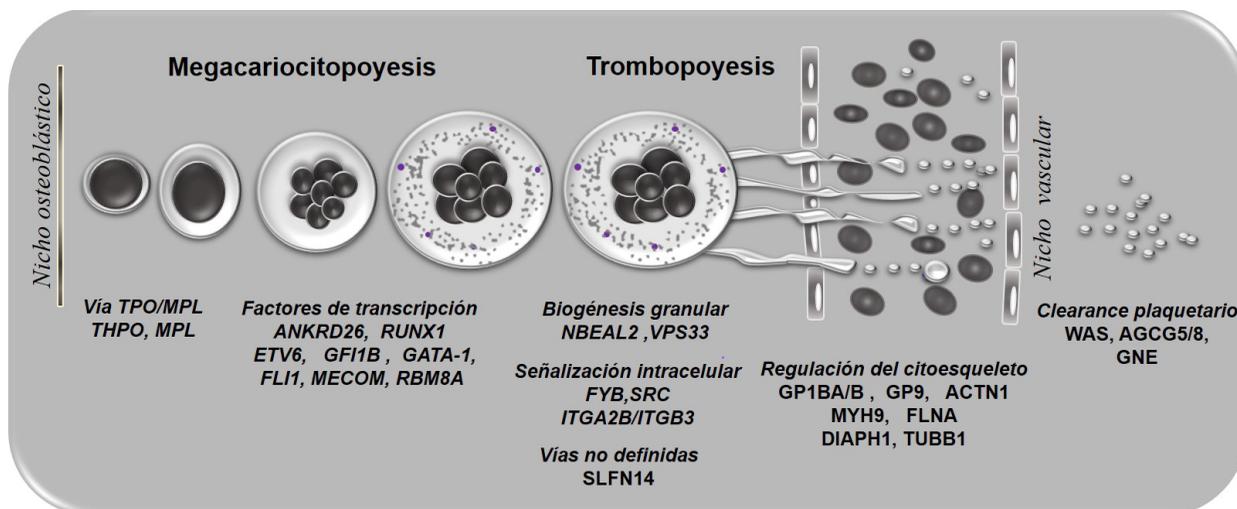
Diagnosis of inherited thrombocytopenias represents a true challenge owing to heterogeneity of these disorders and the absence of distinctive features in a substantial proportion of patients. Classical diagnostic approach is based on phenotypic characterization

followed by molecular analysis of candidate genes guided by clinical suspicion. The introduction of next generation sequencing (NGS), that allows multiple genes analysis, is a high-cost alternative with limited access in our country. The aim of this work was to evaluate the utility of the classical approach in a consecutive cohort of 50 families and to describe the application of NGS in a subgroup of patients without an etiological diagnosis after the initial approach.

Through the conventional approach, an etiologic diagnosis was made in 27 (54%) families. NGS was performed in 8 that remained without diagnosis after initial characterization, attaining a diagnosis in 4. Combining both approaches, the diagnostic yield was 31/50 (62%) families: 38% *MYH9*-related disorder, 8% Bernard-Soulier syndrome, 4% gray platelet syndrome, 4% familial platelet disorder with predisposition to leukemia, 6% *ANKRD26*-related thrombocytopenia, 2% Wiskott-Aldrich syndrome. Most patients without diagnosis had isolated macrothrombocytopenia and mild bleeding. NGS increased the diagnostic rate in this cohort, although it would be necessary to expand the population to establish its actual value in our setting. Therefore, the use of the classical approach and subsequent application of NGS in undiagnosed patients would represent a useful alternative in low-income countries, pointing out that a correct etiological diagnosis enables the detection of syndromic complications, appropriate treatment and adequate genetic counseling.

## Introducción

Las trombocitopenias hereditarias (TH) constituyen un grupo amplio y heterogéneo de desórdenes caracterizados por una disminución del número de plaquetas. Son causadas por mutaciones germinales en genes que codifican para proteínas claves en la producción y función plaquetaria<sup>(1)</sup>. Si bien la mayoría de las TH son secundarias a una alteración a nivel de la producción plaquetaria, en algunas entidades la sobrevida plaquetaria acortada contribuye a la trombocitopenia. Hasta el momento se conocen más de 33 desórdenes causados por 32 genes diferentes y esta lista continúa en crecimiento (Figura 1)<sup>(2)</sup>. El tipo de herencia es variable, incluyendo casos autosómico dominante, recesivos, ligado al X o mutaciones que se presentan *de novo*. Pueden manifestarse como trombocitopenia aislada, o estar acompañadas de manifestaciones sindrómicas. En algunos casos, además



**Figura 1.** Genes mutados en trombocitopenias hereditarias, agrupados según su rol biológico y el proceso en el que participan<sup>(3)</sup>.

de la trombocitopenia, los pacientes tienen alteración concomitante de la función plaquetaria, presentando distintos grados de sangrado. El escaso conocimiento de estas enfermedades lleva a que algunas veces el diagnóstico pase desapercibido y una proporción importante de pacientes se considera erróneamente como trombocitopenia inmune (PTI)<sup>(1,2)</sup>.

Para abordar el diagnóstico, el *Grupo Italiano de Estudio de la Plaqueta*<sup>(4)</sup>, ha propuesto un algoritmo reconocido a nivel internacional. Este abordaje clásico se basa en la caracterización fenotípica seguida del estudio molecular del gen candidato, orientado según la sospecha clínica. Sin embargo, aun aplicando este algoritmo, alrededor de la mitad de los pacientes permanece sin diagnóstico etiológico. La complejidad de las metodologías comprendidas en este algoritmo, y el desconocimiento de algunas alteraciones genéticas causales de TH, dificultan la identificación de estos desórdenes, comprometiendo el diagnóstico, el tratamiento adecuado y el consejo genético. En este sentido, la aplicación de tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) revolucionó el campo del diagnóstico genético, aunque constituye una alternativa de alto costo y de acceso limitado en nuestro medio. NGS puede implementarse mediante el uso de paneles genéticos permitiendo el análisis simultáneo de todos los genes implicados en TH, o por WES (*whole exome sequencing*), metodología que estudia todo el exoma<sup>(5)</sup>.

Además del riesgo hemorrágico, en algunas entidades existe compromiso de otros órganos o complicacio-

nes graves como nefropatía, hipoacusia, inmunodeficiencia, aplasia medular, mielofibrosis o evolución leucémica. El diagnóstico genético permite pesquisar en forma temprana la aparición de estas posibles complicaciones y prevenirlas en caso de ser factible. Si bien no existe un tratamiento específico en las TH, los miméticos de la trombopoyetina (eltrombopag y romiplostim), podrían ser útiles en algunas entidades, como el desorden relacionado al gen *MYH9* (D-MYH9)<sup>(6)</sup>. En algunas entidades particulares, los pacientes pueden ser candidatos a trasplante de médula ósea. Por otro lado, la terapia génica dirigida a la alteración molecular subyacente constituiría una alternativa que actualmente se encuentra en desarrollo. Por lo expuesto, la identificación precisa de la alteración molecular causal permite individualizar el tratamiento, personalizando la atención de los pacientes. Previamente demostramos que, en el contexto de nuestro país, la adopción del algoritmo diagnóstico establecido por el grupo italiano y la colaboración con un centro de referencia experto en este tema nos permitió realizar el diagnóstico de TH en 10/14 familias, hallando en mayor proporción macrotrombocitopenias, especialmente D-MYH9<sup>(7)</sup>. En base a esto, nos propusimos evaluar la utilidad del abordaje clásico en una cohorte consecutiva de 50 familias y describir la aplicación de NGS en un subgrupo de pacientes sin diagnóstico luego del enfoque inicial, con el objetivo de mejorar el diagnóstico y la atención de pacientes con estas enfermedades raras, apuntando al desarrollo de registros nacionales que faciliten su manejo.

## Material y métodos

### Pacientes

Se incluyeron en forma consecutiva pacientes que presentaban trombocitopenia en presencia de antecedentes familiares y/o de alguna alteración sugestiva del origen hereditario, que concurren al servicio de Hematología Investigación del Instituto Lanari entre el año 1999 y el 2019. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la institución y los pacientes o sus tutores legales firmaron el consentimiento informado correspondiente.

### Metodología

La caracterización fenotípica incluyó distintas fases de estudios con complejidad creciente, basadas en el algoritmo diagnóstico propuesto por el grupo italiano<sup>(4)</sup>.

### Estudios de primera fase: tamizaje

Se realizó recuento de plaquetas en cámara de Neubauer y una observación minuciosa del frotis de sangre periférica. Se determinó el volumen plaquetario medio (VPM) mediante contador hematológico automatizado (Sysmex XS1000i), facilitando la clasificación de estas entidades en base al tamaño plaquetario. Luego, se utilizó un programa específico de análisis de imagen para la determinación del diámetro plaquetario medio (DPM). Para esto, a partir de imágenes digitales tomadas de frotis de sangre periférica teñidos con May Grünwald-Giemsa, se midió el diámetro mayor de las plaquetas, promediando la medición en 100 plaquetas<sup>(7)</sup>.

La evaluación de la función plaquetaria se efectuó mediante agregación plaquetaria por método turbidimétrico de Born, utilizando un lumi-agregómetro donde se incubó plasma rico en plaquetas (PRP) de controles y pacientes, con los agonistas ácido araquidónico, ADP, epinefrina, colágeno, ristocetina y FvW. El estudio de agregación se efectuó solamente en aquellos casos en que el PRP tenía  $>100 \times 10^9/L$  plaquetas. Se midieron glicoproteínas de membrana en la superficie plaquetaria, usando anticuerpos monoclonales anti-CD61 (GPIIIa), CD41 (GPIIb), CD42b (GPIb $\alpha$ ), CD42a (GPIX) (BD Biosciences, San José, CA, USA) unidos a distintos fluorocromos y posterior análisis por citometría de flujo<sup>(7,8)</sup>.

### Estudios de segunda fase

En las TH con tamaño plaquetario normal se evaluaron los gránulos densos plaquetarios utilizando mepacrina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), quinacrina fluorescente que se une a nucleótidos de adenina por citometría de flujo.

En las macrotrombocitopenias se realizó inmunofluorescencia para la detección de miosina 9, proteína codificada por el gen *MYH9*, en frotis de sangre periférica<sup>(7,9)</sup>. En presencia de mutaciones en *MYH9*, la miosina 9 se dispone en forma de agregados en el citoplasma de los neutrófilos, lo cual es patognomónico del D-MYH9.

En los casos en los que se observó plaquetas grises en el frotis, se realizó inmunofluorescencia para trombospodina-1 (TSP-1), componente de los gránulos alfa plaquetarios, estableciendo el porcentaje de plaquetas deficientes de gránulos alfa. Se considera deficiencia cuando el contenido es  $<5$  gránulos TSP-1 positivos/plaqueta<sup>(7)</sup>.

### Tercera fase

La fase final confirmatoria consistió en el estudio molecular orientado hacia los genes candidatos según sospecha diagnóstica mediante secuenciación de Sanger.

En un subgrupo sin diagnóstico, luego de aplicado el algoritmo mencionado, se efectuó el estudio exómico mediante NGS. Los estudios genéticos fueron efectuados en colaboración con un centro de Italia (Universidad de Pavía).

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como mediana y rango. Para comparar dos grupos de datos se utilizó prueba t de Student o de Mann-Whitney según la distribución de los parámetros evaluados. Las curvas de supervivencia se realizaron en base a la estimación de Kaplan-Meier y se compararon por test de *log-rank*. Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## Resultados

### Caracterización de la población

Se estudiaron 114 pacientes pertenecientes a 50 familias con sospecha clínica de TH, la mediana de edad fue 25 (rango=0-73) años, siendo 39% niños y 58% mujeres. La mediana del recuento plaquetario

fue 68 (4-172) x 10<sup>9</sup>/L, y el índice de sangrado, según la escala WHO, fue variable: grado 0=30%, 1=39%, 2=16%, 3=9%, 4=6% de los pacientes. El patrón de herencia fue autosómico dominante en el 83% de los pacientes, recesivo en 8%, ligado al X, 2% y 7% presentación de *novo*. Un 40% de los pacientes recibió diagnóstico inicial de PTI, dos tercios de ellos recibieron corticoides.

En cuanto al tamaño plaquetario, 80% de las familias tuvieron macroplaquetas, 2% plaquetas de tamaño pequeño (microplaquetas), y 18% de tamaño normal. En presencia de macroplaquetas se observó que el recuento obtenido en el contador automatizado fue menor que la mediana del recuento por microscopía óptica 76 (12-172) vs. 37 (1-146) x 10<sup>9</sup>/L, p<0,01, indicando una subestimación del recuento plaquetario al emplear el método automatizado. En esta situación se ve dificultada la determinación del VPM, por lo que la medición del DPM en laboratorios especializados brinda información sobre el tamaño plaquetario siendo 3,42 (1,46-7,36) µm en la población estudiada (VR: 2,27-3,08 µm).

### Rédito diagnóstico

#### Algoritmo clásico

De acuerdo con el abordaje clásico, que incluye distintas fases que se escalonan en función de la complejidad de las técnicas de laboratorio y el estudio molecular del gen candidato, se realizó diagnóstico etiológico en 27 familias (54%). A continuación, se describen los diagnósticos efectuados en base al algoritmo.

#### Macrotrombocitopenias

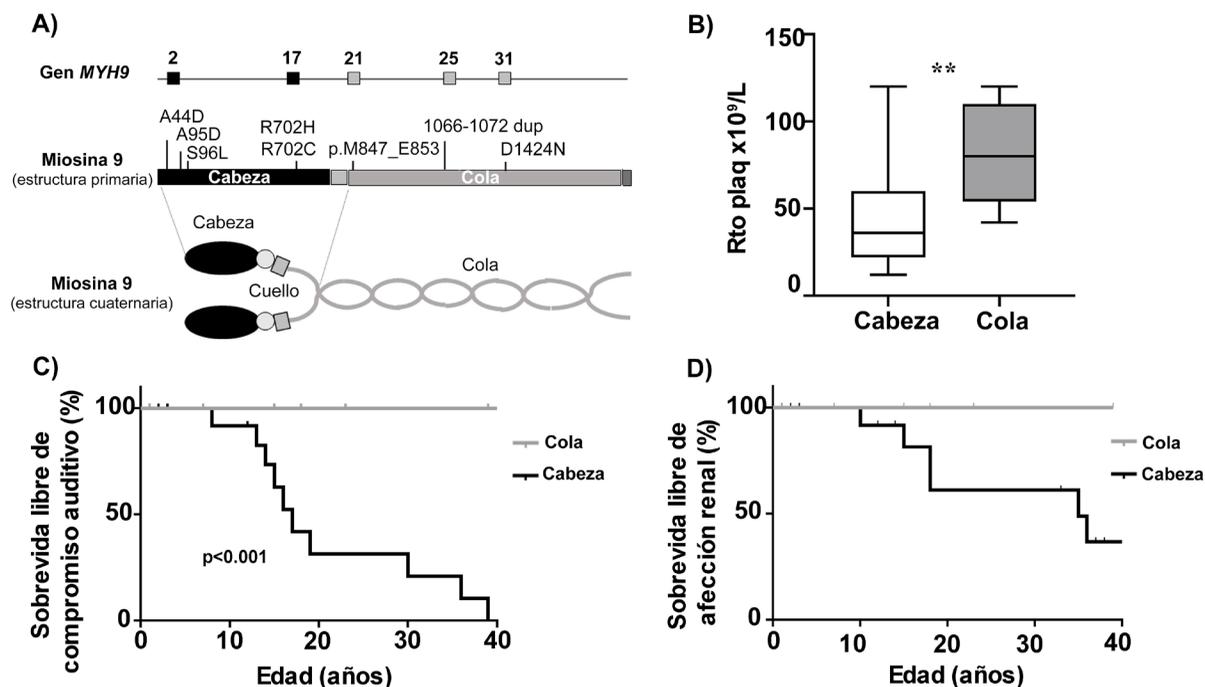
Se diagnosticaron 19 familias con D-MYH9, incluyendo 35 pacientes. La inmunofluorescencia para miosina 9 fue positiva en las 19 familias. En 18 de ellas (95%), existía la sospecha diagnóstica previa a la realización de este estudio, en base al hallazgo de cuerpos de Döhle en el frotis de sangre periférica (13 familias) y/o antecedente familiar (11 familias) y/o compromiso extrahematológico (11 familias), de las cuales 5 tuvieron afección renal e hipoacusia, mientras que 6 sólo hipoacusia. Sólo una paciente (5%) de 1 año de edad no tenía sospecha previa dado que no presentaba cuerpos de Döhle, compromiso extrahematológico ni antecedente familiar. En cuanto a las mutaciones halladas (Figura 2A), con-

firmadas por método de Sanger en 12/19 familias, un 75% se encontraron en la cabeza motora de la miosina, prediciendo mayor gravedad, acompañado de recuentos plaquetarios más bajos (Figura 2B) y mayor probabilidad de compromiso extra hematológico, o evolución de mal pronóstico (Figura 2C y 2D), como está descrito<sup>(9)</sup>. El estudio molecular se encuentra en curso en las 7 familias restantes, en las que el diagnóstico de D-MYH9 se basó en la positividad de la inmunofluorescencia. Si bien la especificidad de esta técnica sería suficiente para realizar el diagnóstico, es conveniente la confirmación por biología molecular, ya que permite evaluar la relación genotipo-fenotipo dando una perspectiva del pronóstico de la enfermedad.

El síndrome de Bernard-Soulier (SBS) fue otra de las macrotrombocitopenias halladas en nuestra población. Una paciente presentó clínica hemorrágica grave desde el nacimiento, disminución muy marcada a ausencia de la expresión de GPIb/IX evaluada por citometría de flujo y ausencia de la aglutinación con ristocetina, mientras que la agregación plaquetaria con el resto de los agonistas fue normal. Mediante secuenciación de Sanger se confirmó la mutación homocigota p.Y294\*, en el gen *GPIBA*, gen que codifica para la GPIb<sub>a</sub>, correspondiendo a la forma clásica de este desorden<sup>(10)</sup>.

En otra familia con macroplaquetas y disminución de GPIb/IX relativa a la expresión de GPIIIa y agregación con ristocetina preservada, se halló mutación heterocigota p.A172V en el gen *GPIBA*, conocida como variante de Bolzano, correspondiente a la forma monoalélica del SBS, desorden relativamente frecuente de herencia autosómica dominante con sangrado leve o casi nulo<sup>(10)</sup>.

Tres pacientes pertenecientes a 2 familias presentaron plaquetas grises en el frotis de sangre periférica y deficiencia de TSP-1 en los gránulos alfa de las plaquetas, sugiriendo síndrome de plaquetas grises (SPG), sospecha que se reforzó por el aumento de vitamina B12 sérica. Se destaca la utilidad de la evaluación del contenido de TSP-1 por inmunofluorescencia como marcador de gránulos plaquetarios alfa, dado que la microscopía electrónica no se encontró disponible. Luego se identificaron mutaciones en el gen *NBEAL2*, reportadas por primera vez<sup>(11)</sup>. Dos pacientes progresaron a mielofibrosis con esplenomegalia.



**Figura 2.** Pronóstico y evolución de pacientes con mutaciones localizadas en la cabeza motora o en la cola helicoidal de la miosina 9. **A)** Representación esquemática de la miosina 9. En el gen *MYH9* se detallan los exones donde se hallaron las mutaciones de la población estudiada y en la estructura primaria de la proteína los residuos aminoacídicos afectados. **B)** Recuentos plaquetarios según el tipo de mutación hallada (cabeza n=15, cola n=7 pacientes)  $p < 0,01$ , test de Mann-Whitney. **C)** Curvas de supervivencia libre de enfermedad auditiva en función de la edad en pacientes con distintas mutaciones (cabeza n=15, cola n=7) del gen *MYH9*,  $p < 0,001$ , test *Log-rank* (Mantel-Cox). **D)** Curvas de supervivencia libre de enfermedad renal,  $p = ns$ , test *Log-rank* (Mantel-Cox).

### Plaquetas de tamaño normal

Tres familias con plaquetas de tamaño normal presentaron antecedente de síndrome mielodisplásico/leucemia. En una de las familias, la marcada alteración de la agregación plaquetaria y disminución de gránulos densos detectada utilizando mepacrina por citometría de flujo orientó al diagnóstico de trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia (DPF/LMA), confirmando luego por detección de una mutación del factor de transcripción *RUNX1*, siendo una de las primeras mutaciones descritas fuera del dominio de unión al ADN de esta molécula<sup>(12)</sup>. Las familias restantes presentaron una alteración leve de la función plaquetaria, que se diagnosticó como trombocitopenia relacionada a *ANKRD26* (Tr-*ANKRD26*) luego del hallazgo de la mutación en el promotor del gen *ANKRD26*.

### Microplaquetas

La familia con microplaquetas no presentaba manifes-

taciones sindrómicas (ni eczema ni inmunodeficiencia). Se diagnosticó trombocitopenia ligada al X tras el hallazgo de mutación del gen *WAS* (Wiskott-Aldrich). Uno de los pacientes evolucionó a linfoma<sup>(13)</sup>.

### Estudio exómico

Luego del abordaje clásico se realizó análisis exómico (WES) por NGS en 8 familias sin diagnóstico etiológico, hallando mutaciones en 4 de ellas: 1 SBS clásico, 1 SBS monoalélico, 1 DPF/LMA y 1 Tr-*ANKRD26*. En las 4 familias restantes no se hallaron mutaciones patogénicas en genes conocidos ni en genes no asociados a TH. Las alteraciones moleculares detectadas en el exoma involucraron genes ya conocidos como causales de TH y que podrían haber sido identificadas por medio del algoritmo instituido. La ineficacia del tamizaje clásico en estos casos se atribuyó a diversas causas. En el caso de la mutación de *RUNX1*, se debió a la ausencia de elementos distintivos que orientaran al diagnóstico, en particular, la ausencia

del antecedente de leucemia sumado a la imposibilidad de evaluar la función plaquetaria por motivos técnicos en la única oportunidad en que se contó con muestra fresca. Cabe destacar que la función plaquetaria está alterada prácticamente en todos los pacientes con DPF/LMA. En otro caso, el motivo fue una limitación técnica de la secuenciación de Sanger, incluyendo un falso negativo en la secuenciación del gen *ANKRD26* en una familia con sospecha clínica de este desorden, que luego se detectó por NGS.

**Rédito diagnóstico global**

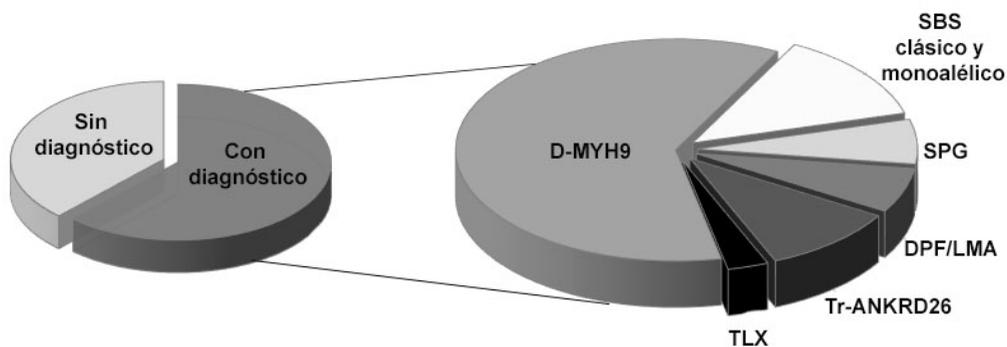
Considerando ambos abordajes, el rédito diagnóstico fue 31/50 (62%) familias, con la siguiente distribución: 38% D-MYH9, 8% SBS (4% clásico, 4% monoalélico), 4% SPG, 4% DPF, 6% Tr-ANKRD26, 2% TLX (Tabla 1 y Figura 3).

En la tabla 2 se detallan las mutaciones halladas en las familias con diagnóstico molecular confirmado luego de implementar el abordaje clásico y NGS. Las familias sin diagnóstico etiológico (38%) presentan

**Tabla 1.** Abordaje clásico y rédito diagnóstico utilizando NGS

Abordaje	Clásico		Clásico +NGS	
	Familias (n)	%	Familias (n)	%
Familias estudiadas	50	100	50	100
D-MYH9	19	38	19	38
SBS clásico	1	2	2	4
SBS monoalélico	1	2	2	4
SPG	2	4	2	4
DPF/LMA	1	2	2	4
Tr-ANKRD26	2	4	3	6
TLX	1	2	1	2
Con diagnóstico	27	54	31	62
Sin diagnóstico	23	46	19	38

NGS: *next generation sequencing*, D-MYH9: desorden relacionado a MYH9, SBS: síndrome de Bernard Soulier, SPG: síndrome de plaquetas grises, DPF/LMA: desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia, Tr-ANKRD26: trombocitopenia asociada a ANKRD26, TLX: trombocitopenia ligada al X.



**Figura 3.** Distribución de la población estudiada luego del abordaje clásico y NGS.

n=50 familias (sin diagnóstico n=19, con diagnóstico=31).

D-MYH9: desorden relacionado a MYH9, SBS: síndrome de Bernard Soulier, SPG: síndrome de plaquetas grises, DPF/LMA: desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia, Tr-ANKRD26: trombocitopenia asociada a ANKRD26, TLX: trombocitopenia ligada al X.

Tabla 2. Mutaciones halladas en las familias estudiadas

Diagnóstico	Herencia	Gen	Mutación cDNA	Proteína
D-MYH9	AD	MYH9	c.2105G>A	p.R702H °
		MYH9	c.284C>A	<b>p.A95N</b>
		MYH9	c.4270G>A	p.D1424N
		MYH9	c.2539_2559dup	<b>p.M847_E853</b>
		MYH9	c.287C>T	p.S96L
		MYH9	c.2104C>T	p.R702C °
		MYH9	c.131C>A	<b>p.A44D</b>
SBS	AR	GP1BA	c.882C>G	<b>p.Y294* §</b>
		GP9	c.182A>G	p.N61S §
SBSm	AD	GP1BA	c.28_30del	p.L10del
		GP1BA	c.515C>T	p.A172V
SPG	AR	NBEAL2	c.2187C>A	<b>p.Y729* §</b>
		NBEAL2	c.3838C>T/c.6477C>G	<b>p.R1280*/p.H2159Q</b>
DPF/LMA	AD	RUNX1	c.735delC	<b>p.T246Rfs*8</b>
		RUNX1	c.351+1G>A	∞
Tr-ANKRD26	AD	ANKRD26	c.-125A>G	∞∞
		ANKRD26	c.-118C>T	∞∞
		ANKRD26	c.127A>G	∞∞
TLX	lig. X	WAS	c.190G>C	p.Q52H

D-MYH9: desorden relacionado a MYH9, SBS: síndrome de Bernard Soulier, SPG: síndrome de plaquetas grises, DPF/LMA: desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia, Tr-ANKRD26: trombocitopenia asociada a ANKRD26, TLX: trombocitopenia ligada al X. AD: autosómico dominante, AR: autosómico recesiva. Lig.X: ligada a X. En negrita se remarcan las mutaciones que fueron descritas por primera vez. ° mutación hallada en más de una familia. ∞ mutación en el sitio de empalme. ∞∞ mutación a nivel del promotor del gen. § mutación homocigota.

en su mayoría trombocitopenia aislada, leve, con moderado aumento del tamaño plaquetario y escaso sangrado (Figura 3).

#### Complicaciones

En el 38% de las familias (n=50) algún integrante presentó manifestaciones sindrómicas asociadas a la trombocitopenia: hipoacusia 22%, nefropatía 12%, mielodisplasia/leucemia 10%, linfoma 2% y mielofibrosis 4% del total de las familias. Diez pacientes fallecieron (9%), 8 por causas relacionadas a TH, incluyendo 4 por sangrado (Tabla 3).

#### Discusión

El avance continuo en el campo de los trastornos plaquetarios hereditarios contribuye a una mayor

comprensión de estos desórdenes, posibilitando mejores enfoques para el diagnóstico y la atención del paciente. La importancia de un diagnóstico adecuado de estas entidades se enfoca por un lado en definir una conducta clínica, brindar un adecuado consejo genético y evitar tratamientos inadecuados y, por otro, permite entender y profundizar los mecanismos moleculares que las sostienen. La adopción de algoritmos establecidos puede optimizar las estrategias diagnósticas, focalizando el estudio molecular en los genes candidatos en base al fenotipo del paciente. En este sentido, la aplicación del algoritmo del grupo italiano condujo al diagnóstico en 22 (48%) de 46 pacientes no relacionados en un estudio en Italia<sup>(14)</sup>. En nuestra cohorte de pacientes, la caracterización feno-

**Tabla 3.** Complicaciones halladas en las familias estudiadas

Complicaciones	Familias (n=50)		Pacientes (n=114)	
	n	%	n	%
Hemorragias graves	11	22	14	12
Hemorragias fatales	4	8	4	3
<b>Manifestaciones sindrómicas:</b>	19	38	26	23
Hipoacusia	5	10	8	7
Hipoacusia+nefropatía	6	12	7	6
Mielodisplasia/Leucemia	5	10	7	6
Linfoma	1	2	1	1
Mielofibrosis	2	4	3	3

típica cuidadosa permitió en muchos casos elaborar una sospecha clínica, que luego se confirmó por el estudio molecular, logrando un rédito diagnóstico similar al obtenido por el grupo italiano. Sin embargo, la heterogeneidad y la presentación atípica de estos trastornos, sumado a la frecuente ausencia de características distintivas, dificultó el diagnóstico en una proporción sustancial de pacientes.

El advenimiento de nuevas metodologías de estudio genético ha dado lugar a proyectos internacionales como ThromboGenomics<sup>(15)</sup>, en el cual se creó una plataforma con un panel de 79 genes con rol conocido en trastornos hemorrágicos, trombóticos o plaquetarios, alcanzando una tasa global diagnóstica del 53%. El grupo español publicó su experiencia utilizando una plataforma similar incluyendo los exones, las regiones no traducidas y el flanqueo de secuencia asociados a trastornos plaquetarios hereditarios, incluyendo trombocitopenias y trombocitopatías, donde hallaron el diagnóstico en el 88% de los pacientes con alta sospecha de una entidad determinada, mientras que, en el grupo de pacientes sin sospecha el rédito fue menor, alcanzando 54%<sup>(16)</sup>. En base a estos estudios, se propone que el testeo genético basado en paneles se incorpore más tempranamente en el algoritmo diagnóstico. Por otro lado, las iniciativas basadas en la secuenciación exómica permiten evaluar, además de los genes conocidos, otros genes que por el momento no han sido relacionados a TH, abordaje que ha permitido el descubrimiento de nuevos genes causales, definiendo nuevas entidades<sup>(5)</sup>.

En este trabajo se efectuó estudio exómico (WES) mediante NGS en pacientes que quedaron sin diagnóstico luego del algoritmo clásico. Aunque no se

hallaron mutaciones patogénicas en genes nuevos, se detectaron mutaciones en genes ya conocidos como causales de TH. Este hallazgo fue inesperado, dado que las entidades que fueron diagnosticadas por NGS se encuentran comprendidas en el algoritmo clásico y podrían haber sido diagnosticadas mediante este enfoque. Esto ilustra que, si bien el rendimiento del algoritmo clásico fue similar al de la literatura, demostró ciertas falencias, que pueden ser atribuibles a la presentación fenotípica poco distintiva o limitaciones técnicas, incluida la necesidad de realizar estudios con muestras frescas, entre otros motivos. La aplicación del NGS permitió entonces aumentar el rédito diagnóstico en casos en que el tamizaje clásico no fue informativo, aunque sería necesario ampliar la población estudiada para establecer el valor real de este abordaje en nuestro medio. Si bien es indudable que la tecnología NGS representa un avance en el campo de las TH, el hecho que la mitad de las familias estudiadas en nuestra cohorte mediante NGS permanece sin diagnóstico, aun luego del estudio exómico, pone de manifiesto las limitaciones actuales existentes en esta área. En particular, en estos casos no se hallaron mutaciones en el panel de genes que se conoce que causan TH y tampoco se hallaron mutaciones en la totalidad del exoma. Esto puede deberse a limitaciones técnicas del NGS, a dificultades inherentes al análisis bioinformático o a la dificultad de establecer una relación entre el posible hallazgo de alteraciones en genes nuevos y el fenotipo. Sólo la aplicación conjunta de las tecnologías genéticas y la caracterización de las alteraciones fenotípicas permitirá identificar correctamente nuevos genes causales, indicando que ambos abordajes no son excluyentes, sino complementarios.

La entidad causal más frecuente en nuestra población de pacientes fue el D-MYH9, en concordancia con lo reportado en la literatura<sup>(2)</sup>. Ésta fue la entidad que presentó menor grado de dificultad diagnóstica, posiblemente debido a que se cuenta con una metodología de tamizaje precisa y específica, como la inmunofluorescencia para la miosina 9, la cual es de por sí diagnóstica de este desorden, si bien el rédito diagnóstico de esta técnica en pacientes con macrotrombocitopenia hereditaria sin sospecha clínica de D-MYH9 es bajo. La observación del frotis en búsqueda de los cuerpos de Döhle y de macroplaquetas y la pesquisa de compromiso extrahematológico permitieron en la mayoría de los casos elaborar un diagnóstico presuntivo de D-MYH9, que fue confirmado por inmunofluorescencia o biología molecular. En base a la correlación hallada entre genotipo y fenotipo, el estudio molecular de este desorden tiene importancia en el pronóstico y seguimiento, como está descrito en la literatura y corroboramos en esta serie. Las entidades que siguieron en frecuencia al D-MYH9, fueron el SBS y Tr-ANKRD26, como se describe en otras cohortes.

El diagnóstico etiológico preciso posibilitó la pes-

quisa adecuada de las complicaciones sindrómicas, que en muchos casos constituyen un problema más grave que las manifestaciones hemorrágicas en sí. Entre ellas, la asociación con leucemia, frecuente en nuestra serie (6%), tiene implicancias éticas en el tamizaje diagnóstico de las TH y terapéuticas, en relación con el posible uso de TPO-miméticos, cuya seguridad en este contexto no ha sido evaluada.

### Conclusiones

En base a la experiencia aquí presentada, un abordaje posible en países de bajos recursos sería limitar el uso de la NGS, ya sea en forma de paneles o estudio exómico, a aquellos pacientes que permanecen sin diagnóstico etiológico luego del algoritmo clásico, permitiendo de esta manera mejorar el rédito diagnóstico, optimizando, al mismo tiempo, los recursos disponibles. Considerando que es posible que en un futuro próximo dispongamos de paneles NGS dirigidos a los genes causales de TH en distintas instituciones de nuestro medio, la colaboración continua entre los centros sería fundamental para lograr casuísticas nacionales representativas de estas enfermedades poco frecuentes.

**Conflictos de interés:** La Dra Altuna D. declara haber recibido honorarios por parte de Novonordisk por concepto de conferencias y actividades educativas en las que ha participado. La Dra Arrieta ME declara haber recibido honorarios por parte de Novonordisk, Roche y Bayer por concepto de conferencias, actividades educativas y consultorías / asesorías en las que ha participado. El resto de los autores declara no poseer conflictos de interés.

### References

1. Almazni I, Stapley R, Morgan N. Inherited Thrombocytopenia: update on genes and genetic variants which may be associated with bleeding. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:80.
2. Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: a growing list of disorders. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program.* 2017.
3. Lentaingne C, Freson K, Laffan MA y col. Inherited platelet disorders: toward DNA-based diagnosis. *Blood.* 2016;127:2814-23.
4. Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F y col. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica.* 2003;88:582-92.
5. Mumford AD, Westbury SK. Genetic techniques used in the diagnosis of inherited platelet disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(7) 685-694.
6. Zaninetti C, Gresele P, Bertomoro A y col. Eltrombopag for the treatment of inherited thrombocytopenias: A phase II clinical trial. *Haematologica.* 2020;105:820-828.
7. Glembofsky AC, Marta RF, Pecci A y col. International collaboration as a tool for diagnosis of patients with inherited thrombocytopenia in the setting of a developing country. *J Thromb Haemost.* 2012;10(8):1653-61.
8. Glembofsky AC, Bluteau D, Espasandin YR y col. Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with FPD/AML: potential role for candidate RUNX1-targets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2014;12(5):761-72.
9. Pecci A, Klersy C, Gresele P y col. MYH9-related Disease: A novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2014;35(2),236-47.
10. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D y col. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat.* 2014;35(9):1033-45.
11. Bottega R, Nicchia E, Alfano C y col. Gray platelet syndrome: Novel mutations of the NBEAL2 gene. *Am J Hematol.* 2017;92(2):E20-E22.
12. Heller PG, Glembofsky AC, Gandhi MJ y col. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood* 2005;105(12):4664-70.
13. Odstrcil-Bobillo MS, Kohan D, Heller PG y col. Ileitis as presentation of lymphoma in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Medicina (B Aires).* 2020;80(1):81-83.
14. Noris P, Pecci A, Di Bari F y col. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica.* 2004;89(10):1219-25.
15. Simeoni I, Stephens JC, Hu F y col. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood.* 2016;127(23):2791-803.
16. Bastida JM, Lozano ML, Benito R y col. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2018;103(1):148-62.



**Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa):** No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.