



Universidad Internacional de La Rioja
Facultad de Ciencias de la Salud

Máster en Universitario en Avances en Oncología y
Hematología Pediátricas

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

| | |
|--|--|
| Trabajo fin de estudio presentado por: | Mariana Sánchez Magdaleno |
| Tipo de trabajo: | Estudio Observacional |
| Directores | José María Bastida Bermejo Josune Zubicaray Salegui |
| Fecha: | 10/09/21 |

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Resumen

Introducción: La *Next Generation Sequencing* (NGS) ha revolucionado el diagnóstico de los trastornos plaquetarios congénitos (TPC). Los TPC pueden ser trombocitopenias hereditarias (TH) o trombopatías hereditarias (TFP).

Objetivos: Establecer la utilidad de la NGS en el diagnóstico de los TPC inespecíficos pediátricos y clasificarlos por sus características clínicas, hemorrágicas y moleculares. Evaluación del sangrado mediante ISTH-BAT.

Métodos: Estudio genético mediante NGS de 84 niños con sospecha de TPC inespecífico. El fenotipo de los pacientes se definió mediante ISTH-BAT, hemograma y frotis de sangre periférica y estudios de función plaquetaria y citometría de flujo.

Resultados: La NGS permitió el diagnóstico de 32 pacientes, 23 TH y 9 TFP. El ISTH-BAT fue mayor en los TFP que en los TH.

Conclusión: La NGS ayudó al diagnóstico de los pacientes pediátricos con TPC inespecífico. El ISTH-BAT podría ser útil para establecer un sangrado patológico en relación a la alteración de la función plaquetaria.

Palabras clave: trastorno plaquetario congénito, secuenciación masiva, trombocitopenia hereditaria, trastorno hereditario de la función plaquetaria, ISTH-BAT.

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Abstract

Introduction: Next Generation Sequencing (NGS) has revolutionized the diagnosis of Inherent Platelet Disorders (IPD). IPD can be inherent thrombocytopenias (IT) or inherent platelet functional disorders (IPFD)

Objectives: Establish the usefulness of NGS in the diagnosis of pediatric non-specific IDP and to classify them by their clinical, hemorrhagic and molecular characteristics. Evaluation of bleeding by ISTH-BAT.

Methods: Genetic study by NGS of 84 children with suspected non-specific TPC. The phenotype of the patients was defined by ISTH-BAT, hemogram and peripheral blood smear and platelet function and flow cytometry studies.

Results: NGS allowed the diagnosis of 32 patients, 23 IT and 9 IPFD. ISTH-BAT was higher in IPFD than in IT patients.

Conclusion: NGS aided the diagnosis of pediatric patients with non-specific IPD. ISTH-BAT could be useful to establish pathological bleeding in relation to altered platelet function.

Keywords: inherited platelet disorders, next generation sequencing, inherited thrombocytopenia, inherited platelet function disorder, ISTH-BAT.

Índice de contenidos

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 8 |
| 1.1 Clasificación y características de los trastornos plaquetarios congénitos..... | 8 |
| 1.2 Megacariopoyesis y fisiología plaquetaria..... | 9 |
| 1.3 Diferencias en la hemostasia primaria entre adultos y niños..... | 12 |
| 1.4 Trombocitopenias hereditarias..... | 13 |
| 1.5 Trastornos de la función plaquetaria..... | 13 |
| 1.6 Diagnósticos de los trastornos plaquetarios congénitos..... | 14 |
| 1.6.1 Historia clínica y exploración física..... | 14 |
| 1.6.2 Pruebas de cribado..... | 15 |
| 1.6.3 Pruebas específicas de laboratorio más utilizadas..... | 15 |
| 1.6.4 Algoritmo diagnóstico actual..... | 16 |
| 1.7 Aplicaciones de la secuenciación masiva..... | 17 |
| 2. Hipótesis de trabajo y objetivos | 19 |
| 3. Pacientes y métodos..... | 21 |
| 3.1 Pacientes..... | 21 |
| 3.1.1 Criterios de inclusión y de exclusión..... | 21 |
| 3.1.2 Variables recogidas..... | 22 |
| 3.1.3 Información a los pacientes y disposiciones ético-legales..... | 23 |
| 3.2 Métodos..... | 24 |
| 3.2.1 Estudios funcionales/morfológicos..... | 24 |
| 3.2.2 Estudios genéticos..... | 24 |
| 3.2.2.1 Extracción de DNA..... | 24 |
| 3.2.2.2 <i>Next Generation Sequencing</i> | 24 |
| 3.2.2.3 <i>Categorización de las variantes genéticas</i> | 26 |
| 3.2.3 Análisis estadístico..... | 26 |
| 4. Resultados..... | 27 |
| 4.1 Resultados del estudio molecular | 27 |

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

| | |
|--|----|
| 4.2. Análisis de los datos personales, clínicos y familiares | 29 |
| 4.3. Análisis de la clínica hemorrágica según la escala ISTH-BAT | 30 |
| 5. Discusión..... | 34 |
| 6.Conclusiones..... | 37 |
| 7.Anexos..... | 38 |
| 8.Referencias bibliográficas..... | 41 |

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Principales factores de transcripción relacionados con la megacariopoyesis (modificado de Varda R. Deutsch) | 10 |
| Figura 2. Genes relacionados hasta la fecha con los Trastornos Plaquetarios Congénitos (modificado de Krishnaswamy et al)..... | 14 |
| Figura 3. Algoritmo diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios según recomendaciones actuales (modificado de Palma-Barqueros)..... | 17 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Escala de sangrado ISTH- BAT (<i>Bleeding Assessment Tool</i>) (modificado de Rodeghiero F et al) | 23 |
| Tabla 2. Principales genes relacionados con los TPC incluidos en la plataforma <i>Next Generation Sequencing</i> para el cribado molecular de trastornos plaquetarios congénitos usado en nuestro trabajo (modificado de Bastida et al)..... | 25 |
| Tabla 3. Variantes genéticas identificadas mediante <i>Next Generation Sequencing</i> | 28 |
| Tabla 4. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes incluidos. | 29 |
| Tabla 5. Distribución de la clínica hemorrágica en función de la localización del sangrado y la gravedad de la sintomatología según el ISTH-BAT..... | 31 |
| Tabla 6. Comparación de la distribución de la clínica hemorrágica en función de la localización del sangrado y la gravedad de la sintomatología según el ISTH-BAT entre el grupo de trombocitopenias y trombopatías hereditarias..... | 32 |

1. Introducción

Las diátesis hemorrágicas hereditarias (DHH) forman un grupo extenso y heterogéneo de trastornos hereditarios y/o congénitos poco frecuentes relacionados con la hemostasia. Existen dos grandes grupos de DHH; los trastornos plaquetarios hereditarios, aquellos en los que se afecta la hemostasia primaria, y los trastornos de la coagulación hereditarios, en los que se produce una alteración de la hemostasia secundaria (1).

1.1 Clasificación y características de los trastornos plaquetarios congénitos

Los trastornos plaquetarios congénitos (TPC) son responsables de una predisposición al sangrado con una gran variabilidad individual dependiendo del tipo de trastorno, edad, sexo y exposición a eventos hemorrágicos (2,3). Los TPC considerados más graves suelen debutar ya en la infancia pudiendo ser clínicamente relevantes. Por el contrario, en otros trastornos la clínica hemorrágica puede aparecer sólo en situaciones de compromiso hemostático como cirugías o partos. Así mismo, las plaquetas participan en otros muchos procesos como la fisiología vascular, la inflamación, la inmunidad o patología tumoral (4).

Los TPC comprenden un grupo muy heterogéneo de enfermedades raras causadas por alteraciones moleculares en alguno de los genes que codifican proteínas con un papel relevante en la megacariopoyesis, o proteínas importantes para la estructura y función plaquetaria. De este modo, los TPC se pueden clasificar en trombocitopenias hereditarias (TH), que son aquellos en los que el defecto principal es la cifra de plaquetas en la sangre y trombocitopatías o trastornos hereditarios de la función plaquetaria (TFP). No obstante, no son raros los TPC mixtos que combinan trombocitopenia con cierto grado de disfunción plaquetaria, y viceversa (5).

1.2 Megacariopoyesis y fisiología plaquetaria

La megacariopoyesis es un proceso complejo que tiene como objetivo la diferenciación, maduración, formación y liberación de plaquetas. Mediante la síntesis diaria de 1000-3000 plaquetas junto con la eliminación de las plaquetas envejecidas, se logra mantener un equilibrio fisiológico con cifras sanguíneas que oscilan entre 150 a $400 \times 10^9/L$ (6).

El desarrollo plaquetario comienza con la diferenciación de la célula madre hematopoyética (HSC) hacia el progenitor mieloide común y, a su vez, éste origina el progenitor bipotencial megacariocítico-eritroide (MEP). Posteriormente, estos precursores se diferencian y maduran hacia la línea megacariocítica dando lugar a la célula formadora de colonias de megacariocitos (Meg-CFC) que evolucionarán hasta convertirse en megacariocitos maduros, adecuados para una óptima producción de plaquetas (6).

Este proceso tan complejo está regulado por una serie de factores de transcripción y citoquinas (Figura 1). Por un lado, la trombopoyetina (TPO) es la principal citoquina y la más potente pues estimula todas las fases de la megacariopoyesis y la trombopoyesis, impulsando la proliferación y maduración de los progenitores, el aumento del tamaño y la maduración de los megacariocitos. En segundo lugar, la regulación a través de la expresión de genes, coordinados por factores de transcripción, resulta clave para este proceso. Dos de los principales factores de transcripción implicados son *GATA-1* y su cofactor *FOG1*, que impulsa la diferenciación de los megacariocitos, y *PU.1*, que regula los precursores de granulocitos y monocitos. Otros factores clave son *RUNX1*, *NFE2*, microRNA (miR-150), el factor de transcripción Myb, y la interleucina-3. Las variantes en estos genes han sido identificadas en desórdenes hematológicos, en los cuales hay un defecto en el desarrollo de megacariocitos, en cantidad o calidad de las plaquetas (7).

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

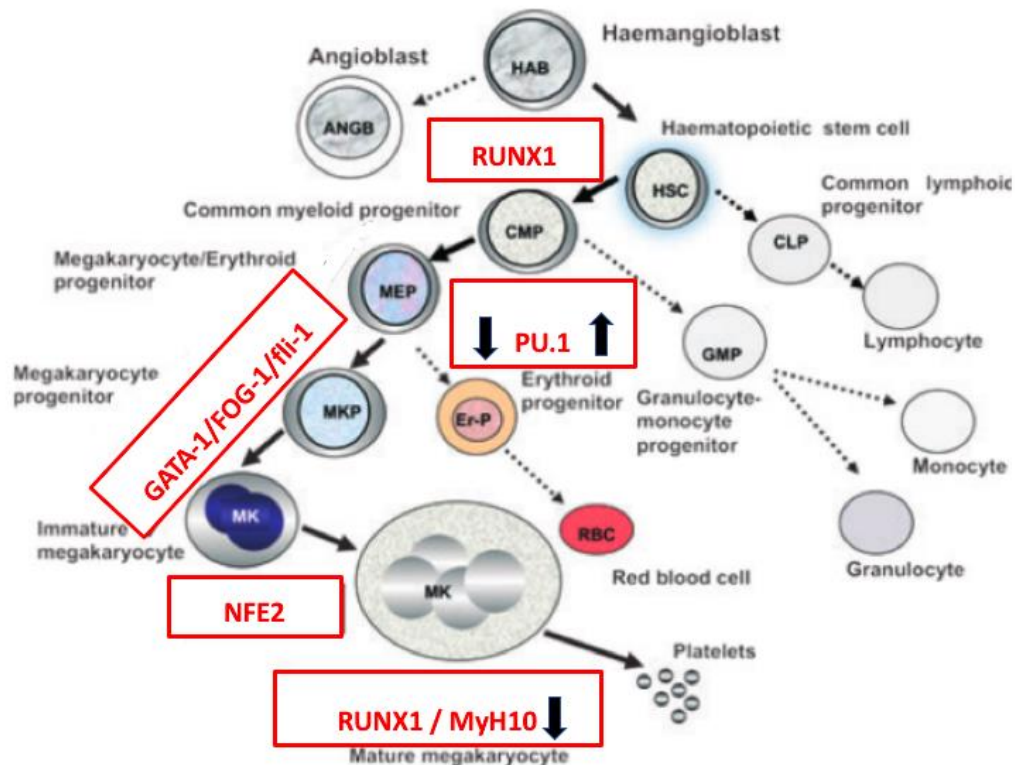


Figura 1. Principales factores de transcripción relacionados con la megacariopoyesis (modificado de Varda R. Deutsch (7)).

Una vez que se obtiene un megacariocito maduro éste emite pseudópodos por evaginación de su membrana hacia los sinusoides de la médula ósea, influenciado por factores quimioatrayentes como el *stromal-derived factor 1* (SDF-1), donde van a liberar a las proplaquetas (8). Se cree que núcleos gigantes de megacariocitos que han perdido parte del citoplasma salen de la médula ósea y se acumulan en los vasos pulmonares, siendo capaces de producir plaquetas activas (9,10).

Estos mecanismos citoesqueléticos que ocurren en el megacariocito como parte de la transición hasta plaquetas maduras resultan fundamentales para que se constituya el citoesqueleto esencial que permita a las plaquetas, una vez liberadas, ejercer un funcionamiento correcto (6,11).

Los mecanismos implicados en la función plaquetaria son múltiples y afectan a una gran cantidad de proteínas. Las distintas fases que intervienen en la formación del coágulo se describen a continuación:

- **Adhesión:** la lesión de la pared vascular produce la exposición de diferentes sustancias como son el colágeno, el factor de Von Willebrand (FVW), el ADP o la trombina. El FVW facilita la adhesión inicial al unirse al complejo glicoproteínico (GP) Ib/IX/V. Estas interacciones permiten una ralentización en la velocidad de circulación de las plaquetas para que tengan lugar otras interacciones de unión, como la que ocurre entre el colágeno y GPIa/IIa. El FVW y el colágeno forman sólidas uniones con GPIIb/IIIa y GPIa/IIa respectivamente, anclando a las plaquetas en su lugar (12).
- **Activación:** las plaquetas adheridas al vaso dañado secretan agonistas los cuales interactúan con sus receptores transmembrana. Esta estimulación da lugar a interacciones de proteína G que permiten la activación de enzimas (fosfatidilinositol 3-quinasa, PI3K y la fosfolipasa C, PLC) elevando consecuentemente el calcio citoplásmico y la fosforilación de proteínas de sustrato. La activación de estas vías favorece la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP), la síntesis de TxA₂, el incremento del calcio citosólico y la disminución del AMPc. Todo ello es causa de la activación, la señalización intracelular y la modificación de la morfología y el contenido plaquetario (6).
- **Agregación:** implica la adhesión entre plaquetas mediante la formación de puentes de fibrinógeno después de producirse un cambio conformacional reversible en la integrina α IIb β 3 (receptor del fibrinógeno) que, a su vez, favorece la aparición de miles de receptores por plaqueta y la afinidad de la integrina por el fibrinógeno. Tanto el aumento del calcio intracelular como la activación de las PLC y las PI3K serán indispensables para la activación de las integrinas y la secreción plaquetaria (13,14).

- **Secreción:** se produce la organización polar, produciendo la liberación del contenido de los gránulos α y densos conduciendo a la actividad procoagulante de la plaqueta (14,15).
- **Fase procoagulante:** expresión de fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria aumentando la formación de trombina y favoreciendo el ensamblaje de los factores de la coagulación (14,16).

1.3 Diferencias hemostasia primaria entre adultos y niños

La hemostasia es un proceso evolutivo que comienza en el útero y depende de la edad. Aunque esta evolución ocurre a lo largo de la vida, los cambios son más marcados durante la infancia y, por lo tanto, son los más relevantes desde el punto de vista clínico. Sin embargo, el sistema hemostático de los fetos sanos, los lactantes y los niños deben considerarse fisiológicos (17). A pesar de que en el recién nacido la cifra de plaquetas y el volumen plaquetario medio es el mismo que en los adultos no ocurre lo mismo con la funcionalidad. El primer mes de vida, las plaquetas se encuentran hiporreactivas; no obstante, esta disminución de su función está compensada con la mayor capacidad de adhesión de las plaquetas a los vasos dañados, gracias al aumento de la concentración de FVW y sus multímeros de alto peso molecular por lo que no existe un mayor riesgo de hemorragia. El endotelio infantil tiene mayor capacidad antitrombótica. El aumento de la prostaciclina (PGI₂), antiagregante plaquetar y del óxido nítrico (NO), vasodilatador vascular, dificultan la interacción entre las plaquetas. Además, se encuentran elevados los proteoglicanos, provocando un mayor estímulo sobre la antitrombina (AT) y sobre el cofactor de la heparina II (17,18).

1.4 Trombocitopenias hereditarias

En las TH el defecto más llamativo es el bajo número de plaquetas circulantes. Constituyen un grupo amplio y heterogéneo de trastornos congénitos poco frecuentes producidos por alteraciones en los genes relacionados con la megacariopoyesis, proteínas del citoesqueleto y receptores de membrana plaquetaria, entre otros (1,19).

En los últimos años, gracias al progreso en las técnicas moleculares, se han descubierto nuevos genes y variantes involucradas en la etiopatogenia de las TH. Se pueden clasificar en función del tamaño plaquetario (VPM), defecto genético subyacente, patrón de herencia, manifestaciones clínicas asociadas y si se encuentran asociados a síndromes o alteración fisiopatológica a nivel de la megacariopoyesis y de la estructura plaquetaria. Dentro de las clásicas TH se encuentran el Síndrome de Bernard-Soulier (SBS), la enfermedad relacionada con MYH9 (MYH9-RD) o el Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), entre muchas otras (1,19).

1.5 Trastornos hereditarios de la función plaquetaria

Los TFP están caracterizados por la disfunción (típicamente hipofuncional) de las plaquetas, resultantes de defectos de los receptores de membrana, de los gránulos, de los elementos implicados en la transducción de señales u otros defectos de la maquinaria bioquímica de las plaquetas (1). Las alteraciones más estudiadas y conocidas son las relacionadas con la adhesión y agregación; no obstante, en los últimos años, se han determinado alteraciones moleculares relacionadas con la señalización, almacenamiento y secreción de gránulos, así como de la actividad procoagulante. La gravedad de la clínica hemorrágica es variable, siendo el sangrado muco-cutáneo el síntoma más frecuente. Como ejemplo de este tipo de trastornos plaquetario hereditario se encuentran la Trombastenia de Glanzmann (TG), el síndrome de Chediak-Higashi o el Síndrome de Hermansky-Pudlak, entre muchos otros (1,20).

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

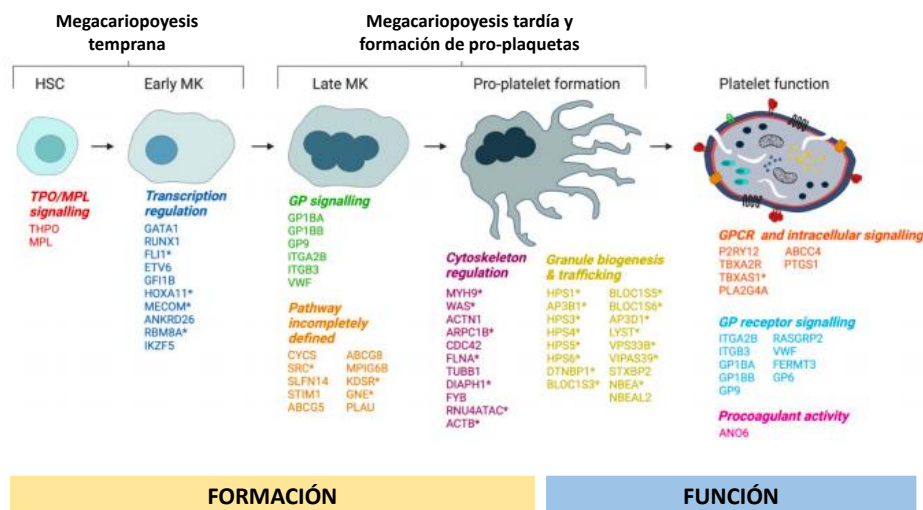


Figura 2. Genes relacionados hasta la fecha con los Trastornos Plaquetarios Congénitos (modificado de Krishnaswamy et al)(21).

1.6 Diagnóstico de los Trastornos Plaquetarios Hereditarios

1.6.1 Historia clínica y exploración física

La historia clínica, tanto personal como familiar, son esenciales para el diagnóstico de un TPC. Se debe sospechar alguna de estas enfermedades ante la presencia de clínica hemorrágica desproporcionada o espontánea, falta de respuesta a tratamientos para la trombocitopenia inmune (PTI), presencia de familiares con historia de hemorragia y/o trombocitopenia, antecedentes de consanguinidad o una exploración física con malformaciones que se asocien a estas patologías, entre otros (19).

Las escalas de sangrado (*Bleeding assesment tools*, BAT), en especial la elaborada por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH), el ISTH-BAT, es un instrumento clínico validado que incluye datos sobre la frecuencia y la gravedad de los síntomas hemorrágicos. Evalúan 14 apartados referidos a distintas localizaciones del sangrado, con un

tiempo estimado de 20 minutos. Como resultado de la suma de los diferentes apartados se obtiene el *score* de sangrado final (*Bleeding Score*, BS). Clásicamente ha sido utilizada para la sospecha de enfermedad de von Willebrand (EVW). No obstante, recientemente, ha sido validada como herramienta para establecer que un sangrado es patológico y predecir futuras hemorragias en pacientes con TPC, ayudando a identificar los casos que requieren un tratamiento más intensivo, en especial aquellos con TFP (22,23).

1.6.2 Pruebas de cribado

- **Pruebas generales:** bioquímica y coagulación, recuento sanguíneo completo y frotis de sangre periférica, centrándose especialmente en número de plaquetas y su morfología (1).

1.6.3 Pruebas específicas de laboratorio más utilizadas

- **Agregometría (*Light Transmission Aggregometry*, LTA):** técnica *gold standard* para el diagnóstico de las alteraciones de la función plaquetaria. Mide la transmisión de luz a través de una muestra de plaquetas en suspensión que aumenta cuando las plaquetas son agregadas por un agonista como el ADP, el ácido araquidónico, el colágeno, la epinefrina y la ristocetina, entre otros. Se trata de una prueba técnicamente difícil y que precisa de tiempo para su realización (24).
- **Citometría de flujo (CMF):** analiza el tamaño, el volumen, las glicoproteínas de membrana (GP) y los gránulos plaquetarios. Además, también es útil para evaluar la función plaquetaria pudiendo aplicarse en el estudio de la reactividad plaquetaria *in vitro*, el análisis de plaquetas activadas circulantes o las interacciones entre plaquetas, entre otros. Su principal limitación es su elevado precio y que requiere personal cualificado. Es una técnica relativamente sencilla para el diagnóstico del SBS o de la TG empleando anticuerpos o ligandos específicos para los complejos Ib/IX y IIb/IIIa (25).

- **Microscopía electrónica:** utilizada como estudio específico de las alteraciones granulares (26).
- **Estudios moleculares:** única prueba de laboratorio específica y que permite llevar a cabo un diagnóstico de confirmación de aquellos trastornos de base genética ya conocida. Tradicionalmente, el análisis molecular para obtener un diagnóstico confirmatorio estaba dirigido a un solo gen, secuenciación de *Sanger*, lo que hacía necesario que el profesional tuviese una sospecha sólida del posible origen. Esto no siempre era factible, sobre todo frente a un fenotipo inespecífico. No obstante, en el momento actual, el estudio molecular se puede abordar de una forma menos dirigida gracias a la *Next Generation Sequencing* (NGS) o secuenciación de alto rendimiento en la que se estudio de forma simultanea múltiples genes o variantes, todo el exoma o incluso el genoma completo (3).

1.6.4 Algoritmo diagnóstico actual

Las recomendaciones actuales para la estratificación del diagnóstico de los TPC se describen en la Figura 4.

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

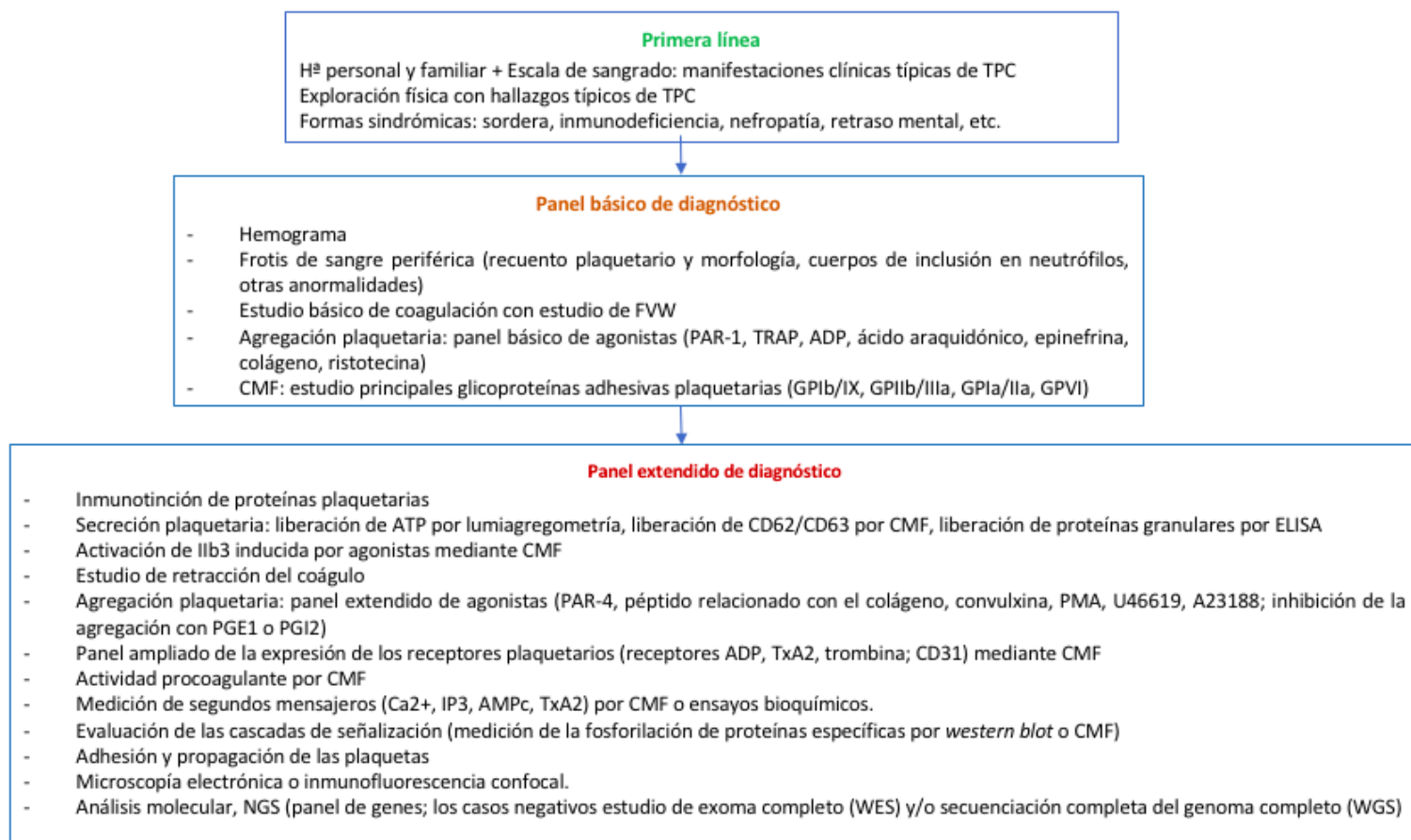


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios según recomendaciones actuales (modificado de Palma-Barqueros et al (1)).

1.7 Aplicaciones de la secuenciación masiva

El desarrollo de la NGS ha permitido la secuenciación en paralelo de múltiples fragmentos de DNA capaz de generar una gran cantidad de datos en tiempo más corto y a un precio asequible (3). Su gran desarrollo se ha debido, entre otros, a la necesidad de mejorar el diagnóstico de aquellas enfermedades de causa congénita con gran variabilidad genética y heterogeneidad clínica, cuando el estudio de los genes candidatos ha sido negativo o cuando el estudio del genoma puede ser más coste-eficiente que el análisis consecutivo de los genes candidatos (27,28). Tres de las principales formas de aplicación son las siguientes:

- **Paneles de Genes:** secuenciación de un conjunto limitado de genes candidatos conocidos que pueden producir una determinada enfermedad (en torno a 10-100 genes). Presenta

un menor riesgo de hallar variantes de significado incierto, un coste menor, facilidad en el manejo de datos y la interpretación de sus resultados. No obstante, se trata de un diseño fijo será necesario en el que será necesario ir introduciendo nuevos genes identificados (27,28).

- **Secuenciación del exoma** (*Whole Exome Sequencing, WES*): secuenciación de las regiones codificantes del genoma (exones). Como ventajas se encuentran que no precisa ir actualizándose y puede ser reinterpretada. No obstante, presenta un mayor coste y aporta más información, lo que dificulta su análisis y hace más posible la aparición de variantes de significado incierto y hallazgos incidentales(27–29).

- **Secuenciación del genoma completo** (*Whole Genome Sequencing, WGN*): secuenciación de toda la información genética de un organismo. Aunque presenta una gran sensibilidad para detectar variaciones estructurales presenta una gran complejidad del análisis (27–29).

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

Los trastornos plaquetarios congénitos (TPC), debido a que las plaquetas desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la hemostasia, pueden dar lugar a alteraciones fenotípicas importantes. Además, algunos de ellos, pueden asociar un cuadro sindrómico grave no relacionado con la hemostasia.

Los niños con clínica hemorrágica se ven comúnmente en la práctica clínica. En el paciente pediátrico, saber si un sangrado es patológico, puede resultar complicado. No obstante, los síntomas que ocurren con una frecuencia, duración o gravedad inusual deben incitar a considerar un trastorno hemorrágico subyacente. Así mismo, aquella PTI, causa frecuente de trombocitopenia en la infancia, que resulta refractaria a más de dos líneas tratamiento también debe hacer sospechar una posible causa congénita.

Aunque el diagnóstico definitivo se obtiene con el diagnóstico molecular, hasta hace unos años, éste se consideraba un último paso no esencial en el proceso de diagnóstico de los TPC, quedándose sin diagnosticar un gran número de pacientes, sobre todo aquellos con un fenotipo inespecífico. Desde que en 2010 comenzó a utilizarse la NGS se ha ido ampliado sustancialmente los conocimientos sobre los TPC, identificando la base molecular de un gran número de ellos. De hecho, la creciente disponibilidad de esta metodología a un menor coste está cambiando el proceso de diagnóstico tradicional incorporando de forma precoz el estudio molecular, sobre todo en los casos de sospecha de un TPC específico donde su utilidad ha sido ampliamente demostrada. En cambio, existen pocos datos sobre el rendimiento del estudio molecular en los TPC inespecíficos. No obstante, dada la dificultad que existe a la hora de diagnosticarlos con las pruebas tradicionales resulta lógico plantearse que un diagnóstico molecular precoz podría facilitar su manejo clínico, sobre todo en los tipos graves.

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Por todo ello los objetivos que se plantearon en nuestro trabajo fueron:

1. Evaluar el rendimiento diagnóstico de la secuenciación masiva en los TPC pediátricos con un fenotipo inespecífico o incierto.
2. Describir los tipos de TPC en pacientes pediátricos en base a sus características clínicas, hemorrágicas, de laboratorio y moleculares.
3. Evaluación del ISTH-BAT en población pediátrica.

3. Pacientes y métodos

3.1 Pacientes

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional de base poblacional, en el que se incluyeron un total de 84 pacientes con sospecha de TPC con un fenotipo clínico incierto en los que previamente se habían descartado causas adquiridas y/o alteraciones en la hemostasia secundaria y/o alteraciones del tejido conectivo. Se establecieron dos grupos de pacientes en función de si el diagnóstico de sospecha era de TH (n= 54) o de TFP (n=30). Seis de los pacientes con trombocitopenia habían sido diagnosticados previamente de PTI refractaria a tres o más líneas de tratamiento. Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron atendidos en la Unidad de Trombosis y Hemostasia, adscrita al Servicio de Hematología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca entre 2014-2021.

3.1.1 Criterios de inclusión y de exclusión

Criterios de inclusión:

Para ser incluidos en uno de los dos grupos debían cumplir los siguientes tres criterios:

1. Edad menor a 18 años.

2. Sospecha de TPC. Debían cumplir mínimo dos criterios:

- Escala de sangrado patológico ≥ 2 , definido por la *International Society of Thrombosis and Hemostasis Bleeding Assessment Tool (ISTH-BAT)*.
- Diagnóstico de PTI refractaria a, mínimo, 3 líneas de tratamiento.
- Manifestaciones clínicas sindrómicas
- Antecedentes familiares de primer o segundo grado con clínica hemorrágica y o trombocitopenia.
- Hemograma con trombocitopenia (Plaquetas $<150 \times 10^9/L$).

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

- Test de agregación plaquetaria mediante LTA patológico.
- CMF patológica en relación con la alteración de las glicoproteínas de membrana y/o gránulos plaquetarios.

3. **Fenotipo inespecífico:** la historia personal, los antecedentes familiares, la evaluación del sangrado mediante la escala ISTH-BAT, el frotis de sangre periférica, la LTA y la CMF no sugieren un TPC específico.

Criterios de exclusión:

- Sospecha de TPC con un fenotipo específico.
- Trastornos plaquetarios de causa adquirida o secundaria.
- Colagenopatías.
- Coagulopatías y *VWD*, tanto adquiridas como hereditarias.

3.1.2 Variables recogidas

| Demográficas | Clínicas | Laboratorio |
|--|---|--|
| - Edad. - Sexo. - Historia familiar de TPC, hemorragia, trombocitopenia, leucemia mieloblástica aguda o síndrome mielodisplásico. - Consanguinidad. | - Clínica hemorrágica mediante escala ISTH-BAT (Tabla 1). - Clínica no hemorrágica asociada. - Exploración física - Sospecha inicial (TH o TFP). - Diagnóstico final. | - Hemograma con recuento y volumen plaquetario medio. - Frotis de sangre periférica. - LTA. - CMF. - Estudio genético. |

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Tabla 1. Escala de sangrado ISTH- BAT (Bleeding Assessment Tool) (modificado de Rodeghiero F et al (30)).

| SANGRADO | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------------------|-------|--|---|--|--|
| Epistaxis | No | >5/año > 10 min | Consulta médica | Taponamiento Cauterización Antifibrinolíticos | Transfusión Terapia sustitutiva Desmopresina |
| Cutáneo-mucoso | No | >5 equimosis (>1cm) en áreas expuestas | Consulta médica | Extenso | Hematoma espontáneo, requiere transfusión |
| Pequeñas heridas | No | >5/año > 10 min | Consulta médica | Cirugía | Transfusión o terapia sustitutiva o desmopresina |
| Cavidad oral | No | Presente | Consulta médica | Cirugía Antifibrinolíticos | Transfusión o terapia sustitutiva o desmopresina |
| Gastrointestinal | No | Presente (no secundario) | Consulta médica | Cirugía Antifibrinolíticos | Transfusión o terapia sustitutiva o desmopresina |
| Hematuria | No | Presente (macroscópica) | Consulta médica | Cirugía Ferroterapia | Transfusión o terapia sustitutiva o desmopresina |
| Extracción dentaria | No | <25% intervenciones | >25% intervenciones | Cirugía Taponamiento | Transfusión, terapia sustitutiva o desmopresina |
| Cirugía | No | <25% intervenciones | >25% intervenciones | Cirugía Antifibrinolíticos | Transfusión, terapia sustitutiva o desmopresina |
| Metrorragia | No | Consulta médica, compresas/2 h, coágulos o >100 en PBAC | > 2 bajas/año Antifibrinolíticos Hormonoterapia Ferroterapia | Hormonas + ferroterapia Desde menarquia y > 12 meses | Tratamiento urgente Transfusión, terapia sustitutiva o desmopresina Cirugía |
| Posparto | No | Consulta médica Oxitocina Loquios > 6 semanas | Antifibrinolíticos Ferroterapia | Transfusión, terapia sustitutiva, desmopresina o revisión quirúrgica | Requiere cuidados críticos o intervención quirúrgica |
| Muscular | Nunca | Posttraumático | Espontáneo | Terapia sustitutiva o desmopresina | Transfusión o cirugía |
| Hemartrosis | Nunca | Posttraumático | Espontáneo | Terapia sustitutiva o desmopresina | Transfusión o cirugía |
| Sistema Nervioso Central | Nunca | - | - | Subdural | Intracerebral |
| Otros* | No | Presente | Consulta médica | Cirugía y antifibrinolíticos | Transfusión, terapia sustitutiva o desmopresina |

* sangrado cordón umbilical, cefalohematoma, el hematoma en mejilla por succión durante lactancia, conjuntival, circuncisión o venopunción. Su presencia en la infancia requiere una investigación detallada independientemente de la puntuación global

3.1.3 Información a los pacientes y disposiciones ético-legales

El estudio se ajustó a la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Bioético del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL, Salamanca, España).

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Los pacientes incluidos en el estudio o sus tutores legales, tras ser informados, firmaron el consentimiento informado (CI) antes de la realización de los estudios funcionales y del estudio molecular.

3.2 Métodos

3.2.1 Estudios funcionales/morfológicos

- **Test de agregación plaquetaria o Light Transmission Aggregometry (LTA):** se realizó con plasma rico en plaquetas (PRP) en el agregómetro (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Alemania) según las guías de estandarización (31).
- **Citometría de Flujo (CMF):** se utilizaron los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos 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); los utilizados para el estudio de los gránulos α y densos fueron: PE*CD62 (Pselectina) y PE*CD63 (granulophysin). Las determinaciones se realizaron con el citómetro FacsCalibur (BD Biosciences, San José, EE.UU) (32).

3.2.2 Estudios genéticos

3.2.2.1 Extracción de DNA

Para el aislamiento del DNA se utilizó el kit comercial QIAmp® DNA *Mini kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del DNA 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(3).

3.2.2.2 Next Generation Sequencing

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Utilizando *Design Studio* (Illumina, San Diego, CA, USA), se diseñó una plataforma NGS con 1399 sondas dirigidas a 1106 regiones incluyendo exones, regiones no traducidas (UTRs) y regiones flanqueantes, de 73 genes que se asocian a los TPC y/o son importantes en la fisiología de las plaquetas (Tabla 2)(3,33,34).

Tabla 2. Genes relacionados con los TPC incluidos en la plataforma de Next Generation Sequencing (NGS) para el cribado molecular de trastornos plaquetarios congénitos usado en nuestro trabajo. (Modificado de Bastida et al (3))

| Mecanismo de acción | Gen implicado |
|---|---|
| Factores de transcripción | CYCS, FLI1, GATA1, GFI1B, HOXA11, MECOM, MPL, RBM8A, RUNX1, STIM1, USF1, TBX1 |
| Receptores de agonistas | P2RX1, P2RY1, P2RY12, TBXA2R, ADRA2A, GP6, CD36, ITGA2, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, A2M, ITGA2B, ITGB3 |
| Secreción de gránulos | NBEAL2, PLAUI, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, LYST, MLPH, BLOC1S3, BLOC1S6, DTNBP1, AP3B1, VIPAS39, VPS33B, RAB27A, MYO5A, PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2, ANO6 |
| Proteínas del citoesqueleto y estructurales | ACTN1, WAS, MYH9, FLNA, ANKRD26, ANKRD18A, DIAPH1, MASTL, TUBB1, PRKACG, ABCG5, ABCG8 |
| Síntesis enzimática y señalización | GNAI3, GNAQ, GNAS, PLA2G4, TBXAS1, PTGS1, PLCB2, PTS, DPAGT1, DHCR24, RGS2, RASGRP2 |

Los datos de secuencias generados por NGS se asignaron al genoma humano de referencia (hg19) con el software informático integrado MiSeq integrado (MiSeq Reporter, Illumina), que utiliza un kit de herramientas de análisis del genoma (GATK) para la selección de variantes de un solo nucleótido, de nucleótidos (SNV) y de inserciones/deleciones cortas (InDels) (3,33).

La cobertura por base fue de ≥ 100 lecturas. El primer paso consistió en un filtro de calidad basado en una puntuación Phred > 20 , una calidad > 20 y una cobertura > 30 en cada posición dentro de las lecturas, para indicar una alta calidad de la secuencia. A continuación, los datos se filtraron en función de la gravedad de la consecuencia, con el fin de priorizar las variantes que conducen a un cambio de aminoácidos en la secuencia de la proteína (*missense*, *nonsense* y los que se producen en el sitio de empalme y en los UTR). Salvo en casos excepcionales, no

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

se tuvieron en cuenta las variantes sinónimas e intrónicas. Las frecuencias alélicas menores (MAF) se consultaron en el *Exome Variant Server*, *1000 Genomes Browser* y las bases de datos del de agregación del exoma (ExAC); las variantes con un MAF de $<0,05$ se seleccionaron para su posterior análisis. Las demás variantes se buscaron en distintas fuentes, como el dbSNP147, el Catálogo de Mutaciones Somáticas en el Cáncer (COSMIC), el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) ClinVar, la base de datos profesional HGMD base de datos profesional, PubMed, *Online Mendelian Inheritance in hombre* (OMIM) y las bases de datos de variantes específicas en un intento de identificar las variantes que causan TPC.

Por último, se empleó la secuenciación tipo *Sanger* para validar todas las variantes identificadas mediante la tecnología de NGS (3).

3.2.2.3 Categorización de las variantes genéticas

La evaluación de la posible patogenicidad de las variantes descritas en nuestro trabajo se realizó siguiendo las directrices del *American College of Medical Genetics and Genomics* y de *la Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP)* (33,35). Estas recomendaciones se basan en el análisis, entre otras cosas, de la frecuencia alélica, tipo de mutación, predicciones *in-silico*, análisis de segregación y posibles relaciones genotipo-fenotipo que, combinados, clasifican la variante en una de las siguientes 5 categorías: *pathogenic (P)*, *likely pathogenic (LP)*, *variant of uncertain significance (VUS)*, *likely benign (LB)*, o *benign (B)* (33,35).

3.2.3. Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE) y las variables cualitativas con sus frecuencias absolutas (n) y relativas (%). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de variables continuas. En el caso de las variables paramétricas, se aplicó la prueba t de análisis de varianza (ANOVA). En el caso de las variables no paramétricas, los grupos se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney (dos grupos) o la prueba de Kruskal-Wallis (más de dos grupos). Finalmente, en la comparación

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

de variables cualitativas se aplicó el test chi-cuadrado. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 22.0 (SPSS, EE. UU.).

4. Resultados

4.1. Resultados del estudio molecular

Los resultados del estudio molecular permitieron llegar a un diagnóstico final en un total de 27 pacientes (32,14%). De estos 27, 18 pacientes eran TH [SBS (n = 4, 3 de ellos monoalélicos), MYH9-RD (n=3), WAS (n =2), ACTN1-RD (n=2), síndrome de Di George (n=2, 1 de ellos incompleto), RUNX1-RD, (n=2), TUBB1-RT (n=1), ANKRD26-RT (n=1), trombocitopenia-2 (mutación en MASTL) (n =1)] y 9 pacientes pertenecían al grupo de TFP [RASGRP2-RD (n= 4), RUNX1-RD, (n=2), FERMT3-RD (síndrome de LAD-III) (n=1), COX1-RD (n=1), TG (n=1)]. Además, nuestros resultados mostraron que 5 pacientes (todos con TH) eran portadores de variantes categorizadas como VUS, pero, por el conocido papel del gen afecto en el desarrollo o función plaquetaria junto con la clínica que presentaban, tenían una alta sospecha de sitosterolemia (n=1), CYCS-RD (n=1), ACTN1-RD (n=1), MECOM-RD (n=1) y FLNA-RD (n=1). Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio mostraron que el rendimiento final del diagnóstico molecular fue del 38,09% (n=32) para el total de la muestra, el rendimiento fue del 42,5% (n=23) para los pacientes con TH y del 30% (n=9) para los pacientes con TFP.

En la tabla 3 se recogen las variantes genéticas que se describieron en el estudio molecular de los pacientes incluidos en nuestro trabajo. Se describieron un total de 37 variantes, de las cuales 14 ya están publicadas en la bibliografía y 23 es la primera vez que se asocian a pacientes con sospecha de TPC (Tabla 3). Según los criterios del ACMG y AMP, del total de las variantes encontradas, 29 fueron categorizadas como *P* o *LP* y 8 como *VUS*. Se describieron 31 variantes genéticas tipo *missense*, 4 deleciones, 1 *nonsense* y 1 mutación localizada en la región 5'UTR. Estas 37 variantes estaban repartidas en 19 genes diferentes (Tabla 3). La tabla 3 también muestra como 6 pacientes eran portadores de variantes en homocigosis, 25 en heterocigosis, 2 en hemicigosis y 2 en heterocigosis compuesta. En referencia a la herencia, en 11 pacientes se describió una herencia autosómica dominante, en 8 una herencia autosómica recesiva, en 3 pacientes ligada al cromosoma X, 9 casos no fueron casos familiares y en 4 de los pacientes la herencia fue desconocida (Tabla 3)

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Tabla 3. Variantes genéticas identificadas mediante *Next Generation Sequencing*

| Caso | Gen | Estado | Herencia | Tipo de mutación | c.DNA | Cambio proteico | Descrita | Categorización ACMG/AMP |
|------|--------------|------------------------|----------|------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | WAS | Hemicigoto | X | Delección | c.1409_1417delTGATGCACG | p.470_473del | No | LP |
| 2 | CYCS | Heterocigoto | AD | Missense | c.290C>A | p.Ala97Asp | No | VUS |
| 3 | RUNX1 | Heterocigoto | AD | Missense | c.167T>C | p.Leu56Ser | Koh CP et al (36) | LP |
| 4 | RUNX1 | Heterocigoto | E | Delección | del21q22.12 | p.Arg166Gln | Tsai et al (37) | P |
| 5 | ACTN1 | Heterocigoto | D | Missense | c.2597C>T | p.P866L | Downes et al (38) | VUS |
| 6 | RASGRP2 | Homocigoto | AR | Nonsense | c.706C>T | p.Gln236* | No | P |
| 7 | ITGA2B | Homocigoto | AR | Missense | c.2063C>T | p.Ala688Val | No | P |
| 8 | WAS | Hemicigoto | X | Delección | c.802delC | p.Arg268Gly fs 40 | No | P |
| 9 | PTGS1 | Heterocigoto | E | Missense | c.428A>G | p.Asn143Ser | No | LP |
| 10 | FLNA | Heterocigoto | E | Missense | c.3695C>T | p.Thr1232Ile | No | VUS |
| 11 | ACTN1 | Heterocigoto | AD | Missense | c.2551G>A | p.Glu851Lys | No | LP |
| 12 | RASGRP2 | Homocigoto | AR | Missense | c.887G>A | p.Cys296Tyr | No | LP |
| 13 | FERMT3 | Homocigoto | AR | Missense | c.593T>C | p.L198P | No | LP |
| 14 | RASGRP2 | Homocigoto | AR | Missense | c.1142C.T | p.Ser381Phe | No | P |
| 15 | ITGA2B | Heterocigoto | AD | Missense | c.2063C>T | p.Ala688Val | No | LP |
| 16 | GATA1 | Heterocigoto | X | Missense | c.1208C>T | p.Thr403Ile | No | VUS |
| 17 | GP1BB | Heterocigoto | E | Missense | c.119G>A | p.Gly40Glu | No | LP |
| 18 | RUNX1 | Heterocigoto | E | Missense | c.C520T | p.R174X | Song et al (39) | P |
| 19 | MYH9 | Heterocigoto | D | Missense | c.277A>G | p.N93D | Pecci et al (40) | LP |
| 20 | GP1BA | Heterocigoto compuesto | AR | Missense | c.T673A/C.1661delG | p.C225S/P.W554fs | Simsek et al (41)/ No | LP / LP |
| 21 | TUBB1 | Heterocigoto | AD | Missense | c.319A>C | p.Thr107Pro | No | LP |
| 22 | MYH9 | Heterocigoto | AD | Missense | c.C3493T | p.R1165C | Kunishima et al (42) | P |
| 23 | MYH9 | Heterocigoto | AD | Missense | c.G4546A | p.V1516M | Pecci et al (43) | P |
| 24 | RUNX1 | Heterocigoto | E | Missense | c.1205C>T | p.Ser402Phe | No | LP |
| 25 | FLNA | Heterocigoto | D | Missense | c.G2522A | p.R841Q | No | VUS |
| 26 | MASTL | Heterocigoto | AD | Missense | c.836C>G | p.Pro279Arg | No | LP |
| 27 | GP1BB | Heterocigoto | D | Missense | c.G127T | p.G43W | Savoia et al(44) | LP |
| 28 | GP1BA | Heterocigoto | AD | Missense | c.334G>C | p.Gly112Arg | Matsubara et al (45) | LP |
| 29 | ANKRD26 | Heterocigoto | AD | 5' UTR | c.-125T>G | - | Balduini et al (46) | P |
| 30 | MECOM | Heterocigoto | E | Missense | c.1751C>T | p.Pro584Leu | No | VUS |
| 31 | RASGRP2 | Homocigoto | AR | Missense | c.914C>G | p.Gly305Asp | Bermejo et al (47) | LP |
| 32 | ABCG5 | Heterocigoto compuesto | AR | Missense | c.139G>A / c.728G>T | p.Val471Ile / p.Arg243Leu | No / No | VUS/VUS |
| 33 | ACTN1 | Heterocigoto | AD | Missense | c.1959C>G | p.Ile653Met | Downes et al (38) | P |
| 34 | TBX1 / GP1BB | Heterocigoto | E | Delección | del22q11.2 | - | Song et al (48) | P |
| 35 | RUNX1 | Heterocigoto | E | Missense | c.1189T>C | p.Ser397Pro | No | LP |

X: herencia ligada al X; AD: herencia autosómica dominante; AR: herencia autosómica recesiva; E: espontánea; D: desconocido; P: *pathogenic*; LP: *likely pathogenic*; VUS: *variant of uncertain significance*

4.2 Análisis de los datos personales, clínicos y familiares

En nuestro estudio se incluyeron un total de 84 pacientes (Anexo 1). La edad media fue de $8,85 \pm 4,71$ años y 45 (53,5%) eran mujeres (Tabla 4). En referencia a la historia familiar 37 pacientes (44,04%) tenían antecedentes en la familia de hemorragia y/o de trombocitopenia. En 1 paciente la persona afecta era su hermano, en 8 era el padre, en 12 era la madre y 16 pacientes presentaban más de un familiar afecto. En 8 familias se describió consanguinidad (Tabla 4).

El recuento plaquetario medio fue de $175 \times 10^9/L \pm 19 \times 10^9/L$. Los niveles para los pacientes con TH fueron de $81 \times 10^9/L \pm 29 \times 10^9/L$, mientras que para los pacientes con TFP fue de $270 \times 10^9/L \pm 10 \times 10^9/L$ ($p < 0,001$). Cincuenta y cuatro pacientes (64,3%) presentaban trombocitopenia según los criterios de inclusión (Tabla 4). En referencia a las pruebas de LTA y CMF en los pacientes con TFP, no había ninguno a los que no se haya tenido acceso al resultado de al menos una de las pruebas funcionales.

Tabla 4. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes incluidos diferenciados por tipo de TPC.

| | TH (n= 54) | TFP (n= 30) | TOTAL (n= 84) |
|---------------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| Edad media: años \pm DE | 9,14 \pm 4,87 | 8,33 \pm 4,42 | 8,73 \pm 4,64 |
| Sexo: V, n (%) / M, n (%) | 27 (50,0%) / 27 (50,0%) | 12 (40,0%) / 18 (60,0%) | 39 (46,4%) / 45 (53,6%) |
| Antecedentes familiares, n (%) | 28 (51,8%) | 10 (33,3%) | 38 (45,2%) |
| Consanguinidad, n (%) | 2 (3,7%) | 6 (20%) | 8 (9,5%) |
| Plaquetas x $10^9/L$: media \pm DE | 81 \pm 29 | 270 \pm 10 | 175 \pm 19 |
| Tipo de trombocitopenia, n (%) | Micro: 3 (5,5%) Normo: 18 (33,3%) Macro: 22 (40,7%) Desconocido: 11 (20,3%) | - | - |
| LTA alterada, n (%) | 4 (7,4%) | 25 (83,3%) | 29 (34,5%) |
| CMF alterada, n (%) | 4 (7,4%) | 15 (50,0%) | 19 (22,6%) |

TH: trombocitopenia hereditaria, TFP: trastorno hereditario de función plaquetaria, V: varón, M: mujer, LTA: Light Transmission Aggregometry CMF: citometría de flujo, DE: desviación estándar.

4.3. Análisis de la clínica hemorrágica según la escala ISTH-BAT

La puntuación media de la BS fue de $3,09 \pm 3,22$. De los 14 apartados evaluados por el ISTH-BAT, la frecuencia de los síntomas se detalla en la Tabla 4. El 45,2% de los pacientes refería epistaxis (n=38), de los cuales, el 36,9% precisó tratamiento hemostático local y/o antifibrinolíticos y/o transfusión de hemoderivados. El 42,8% de los casos (n=36) refería clínica cutánea, de los cuales, el 44,4% no precisó asistencia médica. El 5,9% de los pacientes (n=5) refería sangrado en relación con pequeñas heridas y el 8,3% (n=7) presentó sangrado en cavidad oral y/o encías. En cuanto a la metrorragia (n=7, 8,3%), el 85,8% (n=6) habían requerido tratamiento hormonal, hemostático o ferroterapia. Ninguna de las mujeres estudiadas había tenido descendencia en el momento del estudio. Un total de 6 niños (7,1%) asoció sangrado excesivo durante un procedimiento quirúrgico; éste fue grave (BS>2) en el 66,7% de los casos (n=4). Durante extracciones dentarias en el 5,9% de los casos (n=5) se produjo sangrado, siendo considerado grave en el 40% de ellos (n=2). Los sangrados a nivel gastrointestinal (n=2, 2,3%), de sistema nervioso central (SNC) (n=2, 2,4%) y musculares (n=1, 1,2%) fueron muy poco frecuentes. No hubo casos de hematuria ni hemartrosis. No se asociaron diferencias significativas entre el valor medio de BS entre ambos sexos (varones $2,83 \pm 2,95$; mujeres $3,31 \pm 3,44$; p: 0,512) (Tabla 5).

La BS fue significativamente mayor en los pacientes con alteración en la función plaquetaria (LTA, n=27) frente a los sujetos que tenían una función plaquetaria normal (n= 33) ($5,07 \pm 3,73$ vs. $1,76 \pm 2,44$; p<0,001). Cabe señalar que en 25 de los pacientes incluidos en nuestro estudio no tuvimos acceso al resultado de la prueba.

Tabla 5. Distribución de la clínica hemorrágica en función de la localización del sangrado y la gravedad de la sintomatología según el ISTH-BAT.

| Clínica hemorrágica | | | | | |
|--------------------------|-------|-------------------|--------------------|-------|-----------------|
| | Grado | N (%) | | Grado | N (%) |
| Epistaxis | | 38 (45,2%) | Cirugía | | 6 (7,1%) |
| | I | 11 (28,9%) | | I | 1 (16,7%) |
| | II | 13 (34,2%) | | II | 1 (16,7%) |
| | III | 8 (21,1%) | | III | 3 (50%) |
| | IV | 6 (15,8%) | | IV | 1 (16,7%) |
| Cutáneo-mucoso | | 36 (42,8%) | Metrorragia | | 7 (8,3%) |
| | I | 16 (44,4%) | | I | 1 (14,3%) |
| | II | 15 (41,7%) | | II | 5 (71,4%) |
| | III | 5 (13,9%) | | III | 1 (14,3%) |
| Heridas | | 5 (5,9%) | Posparto | | - |
| | I | 3 (60%) | Muscular | | 1 (1,2%) |
| | II | 2 (40%) | | II | 1 (100%) |
| Cavidad oral | | 7 (8,3%) | Hemartrosis | | - |
| | I | 3 (42,9%) | SNC | | 2 (2,4%) |
| | II | 3 (42,9%) | | III | 1 (50%) |
| | IV | 1 (14,3%) | | IV | 1 (50%) |
| Gastrointestinal | | 2 (2,3%) | Otros | | 1 (1,2%) |
| | IV | 2 (100%) | | IV | 1 (100%) |
| Hematuria | | - | | | |
| Extracción dental | | 5 (5,9%) | | | |
| | I | 2 (40%) | | | |
| | II | 1 (20%) | | | |
| | III | 1 (20%) | | | |
| | IV | 1 (20%) | | | |

SNC: sistema nervioso central

La media de la BS para los casos con TH fue significativamente menor que la BS de los pacientes con TFP, siendo respectivamente de $1,92 \pm 2,00$ y $4,93 \pm 3,91$; $p < 0,001$. El porcentaje de pacientes para cada apartado de los diferentes tipos de sangrado se observa en la Tabla 6. Se encontró un mayor número de pacientes que presentaban epistaxis en el grupo con posible TFP ($p < 0,001$) respecto al grupo con sospecha de TH; en referencia al grado de epistaxis no hubo diferencias estadísticamente significativas. También fue más frecuente el sangrado de pequeñas heridas ($p = 0,043$), el sangrado en cavidad oral ($p = 0,005$) y el sangrado durante una cirugía ($p = 0,015$) en el grupo de TFP. Al igual que ocurría en epistaxis, no se encontraron diferencias significativas en la gravedad del sangrado. Respecto al resto de tipos de sangrado no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 6).

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Tabla 6. Comparación de la distribución de la clínica hemorrágica en función de la localización del sangrado y la gravedad de la sintomatología según el ISTH-BAT entre el grupo de trombocitopenias y trombocitopatías hereditarias.

| Clínica hemorrágica | | | | |
|--------------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Grado | TFP N (%) | TH N (%) | p valor |
| Epistaxis | | 22 (73,3%) | 16 (29,6%) | < 0,001 |
| | I | 6 (27,3%) | 5 (31,3%) | 0,586 |
| | II | 6 (27,3%) | 7 (43,8%) | |
| | III | 6 (27,3%) | 2 (12,5%) | |
| | IV | 4 (18,2%) | 2 (12,5%) | |
| Cutáneo-mucoso | | 16 (53,3%) | 20 (37,0%) | 0,258 |
| | I | 8 (50%) | 9 (45%) | 0,835 |
| | II | 6 (37,5%) | 9 (45%) | |
| | III | 2 (12,5%) | 2 (10%) | |
| Heridas | | 4 (13,3%) | 1 (1,8%) | 0,043 |
| | I | 2 (50%) | 1 (100%) | 0,361 |
| | II | 2 (50%) | - | |
| Cavidad oral | | 6 (20%) | 1 (1,8%) | 0,005 |
| | I | 2 (33,3%) | 1 (100%) | 0,459 |
| | II | 3 (50%) | - | |
| | IV | 1 (16,7%) | - | |
| Gastrointestinal | | 2 (6,7%) | - | 0,063 |
| | IV | 2 (100%) | - | - |
| Hematuria | | - | - | - |
| Extracción dental | | 3 (10%) | 2 (3,7%) | 0,499 |
| | I | 1 (33,3%) | 1 (50%) | 0,572 |
| | II | 1 (33,3%) | - | |
| | III | 1 (33,3%) | - | |
| | IV | - | 1 (50%) | |
| Cirugía | | 5 (16,6%) | 1 (1,8%) | 0,015 |
| | I | - | 1 (100%) | 0,112 |
| | II | 1 (20%) | - | |
| | III | 3 (60%) | - | |
| | IV | 1 (20%) | - | |
| Metrorragia | | 3 (10%) | 4 (7,4%) | 0,984 |
| | I | - | 1 (25%) | 0,688 |
| | II | 2 (66,7%) | 3 (75%) | |
| | III | 1 (33,3%) | - | |
| Muscular | | 1 (3,3%) | - | 0,191 |
| | II | 1 (100%) | - | - |
| SNC | | 1 (3,3%) | 1 (1,8%) | 0,704 |
| | III | - | 1 (100%) | 0,157 |
| | IV | 1 (100%) | - | |
| Otros sangrados | | 1 (3,3%) | - | - |
| | IV | 1 (100%) | - | - |

SNC: sistema nervioso central, TH: trombocitopenia hereditaria; TFP: trastorno hereditario de la función plaquetaria.

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

Analizando el nivel de sangrado en función del ser portador o no de variantes genéticas nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($3,44 \pm 2,80$ en pacientes portadores de mutación y $2,62 \pm 1,62$ en no portadores de mutación; $p=0,364$). Nuestros resultados tampoco asociaron el tipo de sangrado ni su grado con el estudio genético.

5. Discusión

El estudio molecular ofrece la posibilidad de mejorar el diagnóstico de los TPC. Sin embargo, la experiencia en población pediátrica es aún limitada. En el presente estudio pediátrico, se ha utilizado un panel de 73 genes, en una plataforma de NGS, relacionados con los TPC. Se estudiaron un total de 84 pacientes pediátricos con sospecha de TPC con un fenotipo inespecífico o incierto.

Nuestro estudio encontró variantes candidatas de enfermedad en el 38,09% de los pacientes estudiados; porcentaje similar al de otras series de adultos en el que se utilizaron tanto panel genético (3) como estudio del exoma completo (49). El 62% de estas variantes no habían sido descritas hasta la fecha, lo que pone de manifiesto la gran variabilidad molecular de los TPC. De especial relevancia fue el diagnóstico de TPC autosómicos recesivos graves o desordenes ligados al cromosoma X destacando dos WAS, un SBS en heterocigosis compuesta, un caso de TG o una posible sitosterolemia. Debido a las numerosas diferencias respecto a los criterios de inclusión y variabilidad genética entre los diferentes estudios publicados, resulta complicado comparar las tasas de diagnóstico (50). La interpretación adecuada de la patogenicidad de las variantes genéticas candidatas encontradas por NGS en las TPC sigue siendo un reto. Llama la atención que casi un 24% de las variantes fueron clasificadas como VUS lo que, ante una alta sospecha de causa congénita, obligaría a plantearse realizar estudios a nivel celular o murino e, incluso, ampliar el estudio molecular con WES o WGS. Algunos autores empiezan a plantearse si los pacientes con un TPC de fenotipo inespecífico podrían beneficiarse de estudiar directamente el exoma o incluso el genoma sin saltándose el panel genético (51).

Además, a pesar de la mejora diagnóstica tras la introducción de la NGS en el diagnóstico, es preciso combinarlo con el resto de los estudios de diagnóstico puesto que su resultado debe evaluarse en el contexto clínico del paciente. Algunos de los genes mutados descritos en nuestro trabajo pueden asociarse a una mayor predisposición a neoplasias hematológicas como es el caso de *RUNX1*, o *ANKRD26*. Existen algunos grupos de investigación (52) que

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

deciden excluir estos genes de los estudios pediátricos. Greinacher et al (29,53) recomienda no estudiarlos si no son relevantes para el paciente puesto que sólo un subgrupo de individuos con estas variantes genéticas (10-30%) desarrollará leucemia y el riesgo individual de aparición se desconoce en gran medida. Además, la realización de recuentos sanguíneos frecuentes no influiría de forma apreciable en el momento del diagnóstico y el tratamiento.

Respecto a la presentación clínica y las características plaquetarias, éstas fueron muy variables, lo que es coherente con la heterogeneidad de los TPC (2). La mayor parte de los niños (64,3%) presentaban trombocitopenia como principal característica hematológica en consonancia con los hallazgos recientes de otras series de TPC en las que se incluían pacientes mayormente adultos (3).

Respecto a la clínica hemorrágica, los síntomas predominantes, evaluados con la escala ISTH-BAT, fueron la epistaxis y la clínica cutánea, datos similares a los publicados en otros estudios pediátricos (22,54). Esta predominancia se observa tanto en la población total a estudio, así como su distribución por TH o TFP. En nuestra muestra, al incluir pacientes adolescentes, la metrorragia tuvo un porcentaje no desdeñable. Al igual que en estudios previos (23), la BS de los pacientes con TFP fue significativamente mayor a la de los casos con TH. Esta diferencia también se observa cuando estudiamos por separado el grado de epistaxis, de sangrado de heridas, de cavidad oral y la hemorragia durante cirugías lo que nos podría hacer plantearnos estudiar su utilidad como un criterio para sospechar un TFP.

En relación con esto, se observó también que la BS fue mayor en los pacientes con alteración de la LTA respecto a los que esta prueba era normal lo que podría predecir el riesgo de encontrar una alteración en la función plaquetaria, resultados que coinciden con los ya publicados en población adulta (55). Así pues, podríamos plantearnos también en este caso ampliar el estudio con pruebas más específicas de función plaquetaria.

A pesar de las ventajas encontradas en el uso de la escala ISTH-BAT de sangrado en nuestros pacientes, el uso de escalas de sangrado en población pediátrica siempre ha sido

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

controvertido debido a que los niños pequeños tienen pocas posibilidades de recibir puntuaciones altas. Es de esperar que algunos niños con un TPC no presenten síntomas hemorrágicos hasta una etapa tardía de la infancia debido a la falta de exposición a factores de riesgo hemostáticos comunes como la cirugía, la extracción dental y la menarquia. No obstante, en una de las últimas publicaciones de Gresele et al de (23), donde se estudia el uso del ISTH-BAT como herramienta de hemorragia en los TPC, la muestra pediátrica no difiere de la población adulta, lo que sugiere que el ISTH BAT es un buen predictor de la hemorragia también en sujetos pediátricos (22).

Limitaciones del estudio

En este estudio una de las principales limitaciones es la heterogeneidad de la muestra. En el 54,8 de los pacientes no existían antecedentes familiares conocidos y en el 90,5% no había consanguinidad clara, que pudieran hacer pensar si realmente estamos ante un trastorno congénito, aunque no se puede descartar que las alteraciones sean de novo, o por una herencia recesiva por heterocigosis compuesta. Así mismo, se incluyeron 6 pacientes que presentaban PTI refractaria, que, aunque se pueda realizar este tipo de estudios en esta población, según las últimas guías (56), el rendimiento diagnóstico es bajo, ya que puede haber otras causas. Otra limitación ha sido la recogida de datos en cuanto a las pruebas de función plaquetaria y CMF, dado que al no identificarse no es confirmatorio que el paciente pueda englobarse como TFP, y podría ser una DHOD, siendo el rendimiento diagnóstico genético en esta población extremadamente bajo (<3% (50))

6. Conclusiones

Atendiendo a los objetivos planteados y al trabajo desarrollado las conclusiones de nuestro trabajo fueron:

1. El estudio genético con un panel de genes mediante NGS nos permitió identificar las alteraciones moleculares en el 38,09% de los pacientes con TPC de fenotipo inespecífico. Pudiendo ser útil en el estudio de las TH (rendimiento del 42,5%) y de los TFP (rendimiento del 30%)
2. La epistaxis, el sangrado de heridas, de cavidad oral y la hemorragia durante cirugías fue más frecuente en los pacientes con TFP lo que podría plantear estudiar su utilidad como un criterio de sospecha de TFP en pacientes pediátricos.
3. Los pacientes con posible diagnóstico de TFP mostraron una mayor BS que los pacientes con posible diagnóstico de TH, sugiriendo que el grado de sangrado definido por ISTH-BAT podría ser útil en la sospecha diagnóstica de un TFP.

7. Anexos

Anexo1. Características de cada uno de los pacientes incluidos en nuestro estudio.

| Caso | Sexo | Edad (años) | Historia familiar/consanguinidad | ISTHBAT | Síntomas adicionales | Recuento plaquetario | VPM | Frotis de sangre periférica | LTA | CMF | Tipo TPC |
|------|------|-------------|----------------------------------|---------|--|----------------------|------|---|-------------|-------------|----------|
| 1 | M | 13 | Desconocido | 6 | No | 182000 | 9.7 | Normal | Alterado | Normal | TFP |
| 2 | V | 13 | Sí / Sí | 0 | No | 126000 | 12.8 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 3 | M | 7 | No / Sí | 18 | No | 276000 | 7.4 | Anemia microcítica e hipocrómica. Trombocitosis reactiva. | Alterado | Normal | TFP |
| 4 | V | 9 | Sí / Sí | 9 | Retraso madurativo. Déficit de GH | 220000 | - | Normal | Alterado | Normal | TFP |
| 5 | M | 4 | Sí / Sí | 3 | Retraso madurativo. Déficit de GH | 200000 | - | Desconocido | Alterado | Alterado | TFP |
| 6 | M | 17 | No / Sí | 7 | No | 280000 | - | Desconocido | Alterado | Alterado | TFP |
| 7 | V | 4 | No / Sí | 7 | No | 193000 | - | Normal | Alterado | Alterado | TFP |
| 8 | V | 8 | No / Sí | 7 | No | 315000 | - | Normal | Alterado | Alterado | TFP |
| 9 | V | 8 | No / Sí | 7 | No | 150000 | 8.9 | Normal | Desconocido | Desconocido | TH |
| 10 | M | 15 | Sí / No | 0 | No | 88000 | 10 | Neutropenia leve | Normal | Normal | TH |
| 11 | M | 16 | Sí / No | 2 | No | 70000 | 10 | Poblaciones linfocitarias disminuidas todas en número | Normal | Normal | TH |
| 12 | V | 0 | No / No | 3 | No | 30000 | 7 | Plaquetas pequeñas | Normal | Normal | TH |
| 13 | M | 7 | Sí / No | 0 | No | 45000 | 19 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 14 | V | 8 | Sí / No | 2 | No | 950000 | 12.6 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 15 | M | 14 | No / No | 5 | No | 21000 | 14.5 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 16 | V | 14 | Sí / No | 0 | No | 76000 | 16 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 17 | V | 14 | No / No | 3 | Talla baja. Dificultad aprendizaje | 79000 | 12 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 18 | M | 16 | Sí / No | 2 | No | 80000 | 14.2 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 19 | M | 1 | No / No | 0 | Pancitopenia. Retinitis pigmentaria. Insuficiencia exocrina pancreática. | 22000 | 12.2 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 20 | V | 8 | Sí / No | 0 | No | 92000 | 14,6 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 21 | M | 13 | No / No | 2 | Déficit GH | 120000 | 9.8 | Normal | Normal | Normal | TH |

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

| | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|---------|----|--|--------|------|-------------------|-------------|----------|-----|
| 22 | M | 3 | Sí / No | 0 | No | 85000 | 10 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 23 | M | 4 | Sí / No | 4 | No | 115000 | 9.9 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 24 | V | 5 | No / No | 2 | Hipoplasia cuerpo calloso. Fisura paladar blando. Hipoacusia bilateral. Cifosis dorsal Alteración refracción. Raíz aórtica dilatada. | 35000 | 8 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 25 | V | 8 | Sí / No | 0 | No | 20000 | 14 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 26 | V | 12 | Sí / No | 1 | No | 62000 | 7.5 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 27 | V | 15 | Sí / No | 0 | No | 104000 | 8.6 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 28 | V | 0 | No / No | 3 | No | 6000 | 9 | Desconocido | Normal | Normal | TH |
| 29 | V | 14 | Sí / No | 2 | No | 100000 | 14 | Desconocido | Normal | Normal | TH |
| 30 | M | 4 | Sí / No | 6 | No | 240000 | - | Desconocido | Alterado | Normal | TFP |
| 31 | M | 6 | Sí / No | 2 | No | 237000 | - | Desconocido | Alterado | Normal | TFP |
| 32 | M | 9 | No / No | 3 | No | 38000 | 12 | Desconocido | Normal | Normal | TH |
| 33 | M | 7 | No / No | 5 | Xantomas | 98000 | 15 | Normal | Alterado | Normal | TH |
| 34 | M | 6 | No / No | 3 | No | 293000 | - | Normal | Alterado | Normal | TFP |
| 35 | V | 16 | No / No | 5 | No | 302000 | - | Normal | Alterado | Normal | TFP |
| 36 | V | 5 | No / No | 4 | No | 210000 | - | Desconocido | Alterado | Normal | TFP |
| 37 | M | 7 | No / No | 2 | No | 315000 | - | Desconocido | Alterado | Normal | TFP |
| 38 | M | 9 | Sí / No | 8 | No | 170000 | - | Desconocido | Alterado | Normal | TFP |
| 39 | M | 14 | Sí / No | 4 | Lupus | 17000 | 15 | Plaquetas grandes | Normal | Normal | TH |
| 40 | M | 15 | Sí / No | 3 | No | 94000 | 11 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 41 | M | 2 | Sí / No | 1 | No | 112000 | 8.5 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 42 | M | 13 | No / No | 2 | Agnesia Renal. Hipoplasia cuerpo calloso | 40000 | 11 | Normal | Normal | Normal | TH |
| 43 | M | 9 | Sí / No | 3 | No | 185000 | | Normal | Alterado | Normal | TFP |
| 44 | V | 5 | Sí / No | 6 | Duplicidad esplénica. Verrugas cutáneas y eccemas. | 9000 | 20 | Plaquetas grandes | Alterado | Normal | TH |
| 45 | M | 12 | Sí / No | 1 | No | 164000 | 12.8 | Normal | Normal | Alterado | TFP |
| 46 | V | 0 | No / No | 4 | No | 617000 | - | Normal | Alterado | Alterado | TFP |
| 47 | M | 5 | No / No | 5 | Estenosis pulmonar | 64000 | 14 | Normal | Alterado | Alterado | TH |
| 48 | V | 6 | No / No | 4 | No | 86000 | 11 | Normal | Alterado | Alterado | TH |
| 49 | M | 2 | No / No | 10 | No | 460000 | - | Desconocido | Alterado | Alterado | TFP |
| 50 | V | 5 | No / No | 1 | No | 436000 | - | Desconocido | Alterado | Alterado | TFP |
| 51 | V | 12 | No / No | 4 | No | 162000 | - | Desconocido | Alterado | Alterado | TFP |
| 52 | V | 6 | No / No | 4 | Inmunodeficiencia variable común | 11000 | 16.9 | Plaquetas grandes | Desconocido | Alterado | TH |
| 53 | M | 10 | No / No | 4 | TDHA. Retraso psicomotor. Escoliosis. | 457000 | 9.2 | Normal | Desconocido | Alterado | TFP |
| 54 | M | 4 | No / No | 9 | No | 310000 | - | Normal | Alterado | Alterado | TFP |

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

| | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|-------------|----|--|--------|------|-------------------|-------------|-------------|-----|
| 55 | M | 4 | No / No | 3 | Síndrome Noonan-like | 223000 | - | Normal | Alterado | Alterado | TFP |
| 56 | V | 11 | Sí / No | 1 | TDHA | 133000 | 13 | Plaquetas grandes | Normal | Desconocido | TH |
| 57 | M | 14 | Sí / No | 0 | Hipotiroidismo | 14000 | 13.3 | Plaquetas grandes | Normal | Desconocido | TH |
| 58 | V | 14 | Sí / No | 2 | Escoliosis | 203000 | - | Normal | Alterado | Desconocido | TFP |
| 59 | M | 13 | Sí / No | 3 | No | 269000 | - | Desconocido | Alterado | Desconocido | TFP |
| 60 | V | 14 | Sí / No | 0 | 1 | 271000 | 8.7 | Desconocido | Alterado | Desconocido | TFP |
| 61 | M | 3 | No / No | 3 | Inmunodeficiencia | 205000 | 12.3 | Desconocido | Alterado | Desconocido | TFP |
| 62 | M | 17 | No / No | 3 | No | 76000 | 13.3 | Normal | Desconocido | Desconocido | TH |
| 63 | V | 8 | No / No | 2 | Inmunodeficiencia variable común. Hipoacusia. Atrofia cuerpo caloso. Bronquiectasias bilaterales | 66000 | 13 | Normal | Desconocido | Desconocido | TH |
| 64 | V | 0 | No / No | 3 | No | 45000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 65 | V | 15 | No / No | 3 | Talla baja. Retraso madurativo | 13000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 66 | M | 5 | Sí / No | 5 | No | 69000 | 15.8 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 67 | V | 6 | Sí / No | 2 | No | 14600 | 12 | Desconocido | Desconocido | Alterado | TH |
| 68 | M | 9 | No / No | 3 | No | 98000 | 11.7 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TFP |
| 69 | V | 9 | No / No | 0 | No | 135000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 70 | M | 11 | Sí / No | 0 | No | 37000 | 12.5 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 71 | V | 11 | No / No | 3 | No | 49000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 72 | M | 13 | Sí / No | 0 | No | 97000 | 11.6 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 73 | M | 3 | No / No | 3 | No | 120000 | 9 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 74 | V | 16 | Sí / No | 3 | No | 19000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 75 | V | 11 | No / No | 2 | Celiaquía. Disfunción tiroidea autoinmune | 106000 | 9.2 | Normal | Desconocido | Desconocido | TH |
| 76 | M | 13 | Desconocido | 3 | No | 40000 | 17 | Plaquetas grandes | Normal | Alterado | TH |
| 77 | V | 12 | Desconocido | 12 | Síndrome de Marfan | 90000 | - | Desconocido | Normal | Alterado | TFP |
| 78 | M | 12 | Desconocido | 3 | No | 195000 | - | Desconocido | Normal | Alterado | TFP |
| 79 | V | 6 | Desconocido | 4 | No | 250000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 80 | M | 3 | Desconocido | 3 | No | 20000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 81 | V | 4 | Desconocido | 7 | No | 33000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 82 | V | 6 | Sí / No | 1 | No | 45000 | 16 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 83 | M | 9 | Desconocido | 3 | No | 32000 | - | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |
| 84 | M | 5 | Sí / No | 3 | No | 3000 | 11.5 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | TH |

M: mujer, V: varón, TPC: trastorno plaquetario congénito, TFP: trastorno hereditario de función plaquetaria, TH: trombocitopenia hereditaria, PTIr: trombocitopenia inmune, VPM: volumen plaquetario medio, LTA: *Light trasmission aggregometry*, CMF: citometría de flujo

8. Referencias bibliográficas

1. Palma-Barqueros V, Revilla N, Sánchez A, Zamora Cánovas A, Rodríguez-Alén A, Marín-Quílez A, et al. Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview. *Int J Mol Sci*. 26 de abril de 2021;22(9):4521.
2. Freson K, Turro E. High-throughput sequencing approaches for diagnosing hereditary bleeding and platelet disorders. *J Thromb Haemost JTH*. julio de 2017;15(7):1262-72.
3. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, Janusz K, Palma-Barqueros V, Del Rey M, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica*. enero de 2018;103(1):148-62.
4. Shim YJ. Genetic classification and confirmation of inherited platelet disorders: current status in Korea. *Clin Exp Pediatr*. marzo de 2020;63(3):79-87.
5. Savoia A. Molecular basis of inherited thrombocytopenias: an update. *Curr Opin Hematol*. septiembre de 2016;23(5):486-92.
6. Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol*. julio de 2010;47(3):220-6.
7. Deutsch VR, Tomer A. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br J Haematol*. 2013;161(6):778-93.
8. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Kowalska MA, Vilaire G, Pan ZK, et al. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood*. 15 de diciembre de 2000;96(13):4142-51.
9. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:569-91.
10. Lefrançais E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 6 de abril de 2017;544(7648):105-9.
11. Pecci A, Balduini CL. Lessons in platelet production from inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol*. abril de 2014;165(2):179-92.
12. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet Adhesion to Vascular Walls [Internet]. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. Morgan & Claypool Life Sciences; 2010 [citado 10 de agosto de 2021]. Disponible en:

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53456/>

13. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet Aggregation [Internet]. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. Morgan & Claypool Life Sciences; 2010 [citado 10 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53449/>
14. Swieringa F, Kuijpers MJE, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ. Targeting platelet receptor function in thrombus formation: the risk of bleeding. *Blood Rev.* enero de 2014;28(1):9-21.
15. Zhang C, Yang Y. Microparticles are the basic storage units for different proteins in platelet granules [published online ahead of print July 24, 2012]. *Blood.* doi: 10.1182/blood-2012-04-422907. *Blood.* 18 de abril de 2013;121(16):3298.
16. Stalker TJ, Welsh JD, Tomaiuolo M, Wu J, Colace TV, Diamond SL, et al. A systems approach to hemostasis: 3. Thrombus consolidation regulates intrathrombus solute transport and local thrombin activity. *Blood.* 11 de septiembre de 2014;124(11):1824-31.
17. Monagle P, Ignjatovic V, Savoia H. Hemostasis in neonates and children: Pitfalls and dilemmas. *Blood Rev.* 1 de marzo de 2010;24(2):63-8.
18. Guzzetta NA, Miller BE. Principles of hemostasis in children: models and maturation. *Paediatr Anaesth.* enero de 2011;21(1):3-9.
19. Nurden AT, Nurden P. Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica.* agosto de 2020;105(8):2004-19.
20. Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelet function: selected updates. *J Thromb Haemost JTH.* junio de 2015;13 Suppl 1:S2-9.
21. Krishnaswamy S, Ageno W, Arabi Y, Barbui T, Cannegieter S, Carrier M, et al. Illustrated State-of-the-Art Capsules of the ISTH 2020 Congress. *Res Pract Thromb Haemost.* julio de 2021;5(5):e12532.
22. Gresele P, Orsini S, Noris P, Falcinelli E, Alessi MC, Bury L, et al. Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J Thromb Haemost JTH.* marzo de 2020;18(3):732-9.
23. Gresele P, Falcinelli E, Bury L, Pecci A, Alessi M-C, Borhany M, et al. The ISTH bleeding assessment tool as predictor of bleeding events in inherited platelet disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost*

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

JTH. mayo de 2021;19(5):1364-71.

24. Tsoupras A, Zabetakis I, Lordan R. Platelet aggregometry assay for evaluating the effects of platelet agonists and antiplatelet compounds on platelet function in vitro. *MethodsX*. 26 de diciembre de 2018;6:63-70.

25. Rubak P, Nissen PH, Kristensen SD, Hvas A-M. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry. *Platelets*. 2016;27(1):66-74.

26. Gresele P, Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost JTH*. febrero de 2015;13(2):314-22.

27. 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*. julio de 2013;34(7):1035-42.

28. Maclachlan A, Watson SP, Morgan NV. Inherited platelet disorders: Insight from platelet genomics using next-generation sequencing. *Platelets*. enero de 2017;28(1):14-9.

29. Greinacher A, Eekels JJM. Diagnosis of hereditary platelet disorders in the era of next-generation sequencing: «primum non nocere». *J Thromb Haemost JTH*. marzo de 2019;17(3):551-4.

30. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Collier B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost JTH*. septiembre de 2010;8(9):2063-5.

31. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, 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 JTH*. 10 de abril de 2013;

32. 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*. 24 de diciembre de 2014;9:213.

33. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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 Off J Am Coll Med Genet.* mayo de 2015;17(5):405-24.

34. Daly ME. Transcription factor defects causing platelet disorders. *Blood Rev.* enero de 2017;31(1):1-10.

35. Niehaus A, Azzariti DR, Harrison SM, DiStefano MT, Hemphill SE, Senol-Cosar O, et al. A survey assessing adoption of the ACMG-AMP guidelines for interpreting sequence variants and identification of areas for continued improvement. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* agosto de 2019;21(8):1699-701.

36. Koh CP, Wang CQ, Ng CEL, Ito Y, Araki M, Tergaonkar V, et al. RUNX1 meets MLL: epigenetic regulation of hematopoiesis by two leukemia genes. *Leukemia.* septiembre de 2013;27(9):1793-802.

37. Tsai S-C, Shih L-Y, Liang S-T, Huang Y-J, Kuo M-C, Huang C-F, et al. Biological Activities of RUNX1 Mutants Predict Secondary Acute Leukemia Transformation from Chronic Myelomonocytic Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de agosto de 2015;21(15):3541-51.

38. Downes K, Megy K, Duarte D, Vries M, Gebhart J, Hofer S, et al. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood.* 5 de diciembre de 2019;134(23):2082-91.

39. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufirin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet.* octubre de 1999;23(2):166-75.

40. Pecci A, Klersy C, Gresele P, Lee KJD, 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.* febrero de 2014;35(2):236-47.

41. Simsek S, Noris P, Lozano M, Pico M, von dem Borne AE, Ribera A, et al. Cys209 Ser mutation in the platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene is associated with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol.* diciembre de 1994;88(4):839-44.

42. Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, Amemiya N, Choi YM, Hosaka N, et al. Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *J Hum Genet.*

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

2001;46(12):722-9.

43. Pecci A, Panza E, De Rocco D, Pujol-Moix N, Girotto G, Podda L, et al. MYH9 related disease: four novel mutations of the tail domain of myosin-9 correlating with a mild clinical phenotype. *Eur J Haematol.* abril de 2010;84(4):291-7.

44. 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.* septiembre de 2014;35(9):1033-45.

45. Matsubara Y, Murata M, Watanabe G, Ikeda Y. Enhancing effect of the (145)Met-allele of GPIb alpha on platelet sensitivity to aspirin under high-shear conditions. *Thromb Res.* 2008;123(2):331-5.

46. Balduini A, Raslova H, Di Buduo CA, Donada A, Ballmaier M, Germeshausen M, et al. Clinic, pathogenic mechanisms and drug testing of two inherited thrombocytopenias, ANKRD26-related Thrombocytopenia and MYH9-related diseases. *Eur J Med Genet.* noviembre de 2018;61(11):715-22.

47. Bermejo E, Alberto MF, Paul DS, Cook AA, Nurden P, Sanchez Luceros A, et al. Marked bleeding diathesis in patients with platelet dysfunction due to a novel mutation in RASGRP2, encoding CalDAG-GEFI (p.Gly305Asp). *Platelets.* enero de 2018;29(1):84-6.

48. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet.* octubre de 1999;23(2):166-75.

49. Johnson B, Lowe GC, Futterer J, Lordkipanidzé M, MacDonald D, Simpson MA, et al. Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica.* octubre de 2016;101(10):1170-9.

50. Ver Donck F, Downes K, Freson K. Strengths and limitations of high-throughput sequencing for the diagnosis of inherited bleeding and platelet disorders. *J Thromb Haemost JTH.* agosto de 2020;18(8):1839-45.

51. Gomez K. Genomic Analysis for the Detection of Bleeding and Thrombotic Disorders. *Semin Thromb Hemost.* marzo de 2021;47(2):174-82.

52. Andersson NG, Rossing M, Fager Ferrari M, Gabrielaite M, Leinøe E, Ljung R, et al. Genetic screening of children with suspected inherited bleeding disorders. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* marzo de 2020;26(2):314-24.

Mariana Sánchez Magdaleno

Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de niños con sospecha de trastorno plaquetario congénito con fenotipo inespecífico

53. Greinacher A, Eekels JJM. Simplifying the diagnosis of inherited platelet disorders? The new tools do not make it any easier. *Blood*. 6 de junio de 2019;133(23):2478-83.
54. Yang EJ, Shim YJ, Kim HS, Lim YT, Im HJ, Koh K-N, et al. Genetic Confirmation and Identification of Novel Variants for Glanzmann Thrombasthenia and Other Inherited Platelet Function Disorders: A Study by the Korean Pediatric Hematology Oncology Group (KPHOG). *Genes*. 6 de mayo de 2021;12(5):693.
55. Adler M, Kaufmann J, Alberio L, Nagler M. Diagnostic utility of the ISTH bleeding assessment tool in patients with suspected platelet function disorders. *J Thromb Haemost JTH*. julio de 2019;17(7):1104-12.
56. Identifying and treating refractory ITP: difficulty in diagnosis and role of combination treatment | *Blood* | American Society of Hematology [Internet]. [citado 9 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://ashpublications.org/blood/article/135/7/472/428874/Identifying-and-treating-refractory-ITP-difficulty>