

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

USO DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS) PARA EL
DIAGNÓSTICO DE ALTERACIONES HEMOSTÁTICAS
HEREDITARIAS

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la
consideración de la Comisión del Programa de Estudios
de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar al grado y
título de Especialidad en Hematología

MARÍA JOSÉ SUÁREZ SÁNCHEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

“Este trabajo final de investigación aplicada fue aceptado por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Hematología.”

Dra. Ingrid Salas

**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**

Dra. Melissa Granados

Profesora Guía

Dra. Mariela Solano

Lectora

Dra. Melissa Carazo

Lectora

Dr. Walter Rodríguez

Coordinador Programa de Posgrado en Especialidad en Hematología

Dra. María José Suárez Sánchez

Sustentante

Tabla de contenidos

Hoja de aprobación	ii
Resumen	iv
Lista de figuras.....	v
Lista de abreviaturas	vi
Licencia de publicación	viii
Objetivo general	1
Objetivos específicos	1
Justificación	1
Introducción	2
Sistema hemostático	2
Endotelio vascular	2
Actividad anticoagulante	3
Actividad fibrinolítica	3
Tono vascular y permeabilidad	4
Plaquetas	5
Adhesión	6
Activación y secreción	8
Agregación	9
Coagulación	9
Tenasa extrínseca	10
Tenasa intrínseca	11
Vía de contacto	11
Protrombinasa	12
Terminación	13
Sistema de Proteína C y Proteína S	13
Formación de Fibrina	14
Sistema fibrinolítico	15
Capítulo I: Desórdenes plaquetarios	17
Desórdenes que afectan el número de plaquetas	17
Desórdenes asociados a MYH9	17
Trombocitopenia amegacariocítica trombocitopénica	18
Trombocitopenias asociadas a defectos esqueléticos	18
Trombocitopenia ligada al X con diseritropoyesis	19
Desorden plaquetario familiar con predisposición a la leucemia aguda (FDP/AML)	19
Desórdenes que afectan la función plaquetaria	20
Deficiencias de los gránulos alfa	20
Deficiencias de los gránulos densos	21
Deficiencias en los receptores plaquetarios	22
Defectos en los receptores de agonistas plaquetarios	23
Defectos en las proteínas citoplasmáticas	24
Importancia del diagnóstico de los DHPs	25
Diagnóstico de los DHPs	25
Capítulo II: Deficiencias de factores de coagulación	27
Hemofilia	27
Enfermedad de von Willebrand	30
Capítulo III: Trombofilias hereditarias	33
Deficiencia de Antitrombina	33
Deficiencia de Proteína C	34
Deficiencia de Proteína S	35
FV Leiden	36
Protrombina G20210A	37
Capítulo IV: NGS como alternativa para el diagnóstico de los desórdenes de sangrado	38
Secuenciación de Nueva Generación	39
Diseño de paneles de NGS	41
Uso de NGS en los desórdenes de sangrado	43
Conclusiones	46
Referencias	49

RESUMEN

Los desórdenes de sangrado pueden deberse a deficiencias en los factores de coagulación, a desórdenes plaquetarios o a defectos en el sistema fibrinolítico. Son un grupo heterogéneo de desórdenes causados por variantes de ADN en un gran número de loci (1,2).

La mayoría de estos desórdenes están asociados a alteraciones en pruebas de laboratorio, sin embargo, muchas de estas están disponibles únicamente en laboratorios especializados de coagulación. Generalmente estas pruebas son suficientes para identificar las deficiencias en los factores de coagulación, pero no así para los defectos plaquetarios, los cuales terminan siendo clasificados como desórdenes plaquetarios no especificados, esto dificulta el tratamiento y la prevención de secuelas hematológicas y no hematológicas. Así mismo, hay pacientes cuyas alteraciones no presentan ninguna alteración a nivel de laboratorio, por exclusión estos pacientes se clasifican como tendencia a sangrados no especificada (3,4).

El diagnóstico molecular puede ayudar a realizar un diagnóstico definitivo y es importante por diversas razones: diferentes variantes genéticas pueden causar un fenotipo similar y sólo el análisis genético permite distinguirlas, permite al clínico conocer el pronóstico del paciente y realizar un mejor manejo clínico, permite realizar el estudio familiar y conocer si se deben de realizar estudios no hematológicos asociados (5,6).

Tradicionalmente el análisis genético, utilizado principalmente para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y hemofilia, ha consistido en el análisis de todos los exones del gen en cuestión, las regiones intrónicas flaqueantes y las regiones UTR 5' y 3' por secuenciación de Sanger, esto permite la identificación de las variantes en la gran mayoría de los pacientes. Sin embargo, debido a que los genes se estudian secuencialmente, este análisis es costoso y requiere mucho tiempo (5,6).

La secuenciación de nueva generación (NGS) permite la secuenciación paralela de muchos genes al mismo tiempo por lo que permite realizar paneles para estudiar grupos de desórdenes. Gracias a los avances en esta tecnología y el mayor uso de estas es posible secuenciar las regiones codificantes o grupos de genes a un costo mucho menor. La NGS actualmente se encuentra disponible para los laboratorios diagnósticos y se ha empezado a utilizar para el estudio genético de desórdenes de sangrados (5,6).

}El uso de NGS en desórdenes hemostáticos ha sido útil no sólo para la identificación de variantes en pacientes que no contaban con un diagnóstico si no que ha permitido también el descubrimiento de múltiples genes causantes de estos desórdenes y la identificación de más genes como los responsables de algunos de estos síndromes (5,6).

Lista de figuras

Figura 1. Funciones antitrombóticas del endotelio	4
Figura 2. Función plaquetaria	6
Figura 3. Proteínas involucradas en la adhesión y activación plaquetaria	7
Figura 4. Sistema de coagulación: tenasa extrínseca, tenasa intrínseca y complejo protrombinasa	10
Figura 5. Estructura del fibrinógeno y su conversión a fibrina	15

Lista de abreviaturas

Secuenciación de Nueva Generación	NGS
Adenosin monofosfato cíclico	cAMP
Ecto-adenosin difosfatasa	ADPasa
Adenosin difosfato	ADP
Receptor de la proteína C endotelial EPCR	EPCR
Inhibidor de la vía del factor tisular	TFPI
Activador de plasminógeno tisular	t-PA
Activador de plasminógeno de uroquinasa	u-PA
Inhibidor del activador del plasminógeno	PAI-1
Glicoproteína	GP
Factor de von Willebrand	vWF
Adenosin trifosfato	ATP
Receptor de tromboxano	TB
Factor derivado de plaquetas	PDGF
Factor de crecimiento transformante beta	TGF- β
Inhibidor de fibrinólisis activado por trombina	TAFI
Desórdenes hereditarios de plaquetas	DHP
Trombocitopenia con diseritropoyesis ligada al X	XLT
Desórdenes plaquetarios asociados a leucemia aguda	FDP/AML
Macrotrombocitopenia mediterránea benigna	BBM
Trombocitopenia familiar 2	THC2
Trombocitopenia amegacariocítica trombocitopénica	CAMT
Receptor de trombopoyetina	TPO
Trombocitopenia con radio ausente	TAR
Trombocitopenia amegacariocítica con sinostosis radio-ulnar	ATRUS
Síndrome de plaqueta gris	GPS
Neurodeaquina 2	NBEAL2
Síndrome de Paris Trousseau	PTS
Síndrome de Quebec	QPD
Uroquinasa activadora del plasminógeno	PLAU
Síndrome de Hermansky Putlak	HPS
Complejos de biogénesis relacionados con lisosomas	BLOC
Síndrome de Chediak-Higashi	CHS
Linfocitosis hemofagocítica	HLH
Síndrome de Bernard Soulier	BSS
Enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario	PT-vWD
Trombocitopenia de Glanzmann	GT
Síndrome de Wiskkot-Aldrich	WAS
Tiempo de tromboplastina	TTP
Tiempo de protrombina	TP
Tiempo de trombina	TT
Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples	MLPA

Ensayo de hibridación de genómica comparativo	ACGH
Variantes en el número de copias	CNV
Concentrado de factores II, VII, IX y X activados	FEIBA
Enfermedad de von Willebrand	VWD
Tromboembolismo venoso	VTE
Factor V Leiden	FVL
Protrombina	PT
Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis	ISTH
Variantes de un nucleótido simple	SNV



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, MARIA JOSE SUAREZ SANCHEZ, con cédula de identidad 111940031, en mi condición de autor del TFG titulado Uso de secuenciación de Nueva Generación (NGS) para el diagnóstico de alteraciones hemostáticas hereditarias.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-67-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el jueves 29 de julio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante María José Suárez Sánchez carné #A45283, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Hematología. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Melissa Granados Zamora, MSc. quien preside y tutora, Mariela Solano Vargas, MSc. y Melissa Carazo Gutiérrez, MSc. lectoras.

ARTICULO 1

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: "Uso de secuenciación de nueva generación (NGS) para el diagnóstico de alteraciones hemostáticas hereditarias".

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado [x] Reprobado []

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 19:55 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Melissa Granados Zamora, Mariela Solano Vargas, Melissa Carazo Gutiérrez, and María José Suárez Sánchez.

Observaciones: Mención honorífica

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita
Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones

OBJETIVO GENERAL

Describir alteraciones hemostáticas hereditarias y el uso de secuenciación de nueva generación (NGS) como una alternativa para su diagnóstico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Señalar los diferentes desórdenes plaquetarios hereditarios y su diagnóstico tradicional.
- Describir las diferentes deficiencias hereditarias en los factores de coagulación y su diagnóstico tradicional.
- Detallar los diferentes defectos en el sistema fibrinolítico y su diagnóstico tradicional.
- Analizar el uso de secuenciación de nueva generación para el diagnóstico de alteraciones hemostáticas hereditarias.

JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones hereditarias hemostáticas son un conjunto de patologías que, a pesar de que comparten algunas características clínicas, son muy diversas desde el punto de vista fisiopatológico. Aunque, en algunas de estas alteraciones, como hemofilia y enfermedad de von Willebrand, el diagnóstico es accesible para la mayoría de laboratorios de hematología, hay una gran cantidad de alteraciones cuyo diagnóstico queda inconcluso. La NGS permite la secuenciación paralela de muchos genes al mismo tiempo por lo que permite realizar paneles de desórdenes con características clínicas similares de una manera rápida y efectiva. Actualmente esta técnica se encuentra disponible para los laboratorios de diagnóstico y se ha empezado a utilizar en algunos países para el estudio genético de desórdenes de sangrados por lo que es importante estudiar esta aplicación y valorar su posible utilización en nuestro país.

INTRODUCCIÓN

La hemostasis preserva la integridad vascular a través del balance de los procesos fisiológicos que mantienen la circulación sanguínea en condiciones normales y previenen el sangrado tras el daño vascular. Para mantener la fluidez sanguínea se requiere un endotelio vascular intacto y una serie compleja de vías regulatorias que mantienen a las plaquetas en un estado quiescente y al sistema de coagulación bajo control. Tras un daño vascular, se requiere una respuesta rápida y eficiente para detener el sangrado, sin embargo, esta respuesta debe de ser estrictamente controlada para evitar la formación excesiva de trombos. Un desbalance en cualquiera de estos sistemas puede provocar hemorragias o trombosis (1,2)

Sistema Hemostático

Los principales componentes del sistema hemostático son el endotelio vascular, las plaquetas, el sistema de coagulación y el sistema fibrinolítico (1).

Endotelio Vascular

El endotelio tiene un papel activo en el mantenimiento de la integridad vascular. Las células endoteliales forman una capa que separa la sangre de los componentes protrombóticos del subendotelio tales como colágeno, elastina y fibrina. El endotelio sano, más que ser una barrera estática, es un órgano dinámico que regula activamente la hemostasia inhibiendo las plaquetas, suprimiendo la coagulación, promoviendo la fibrinólisis y modulando el tono y la permeabilidad vascular (1,2).

Inhibición plaquetaria

Las células endoteliales sintetizan prostaciclina y óxido nítrico, estas sustancias no sólo actúan como potentes vasodilatadores, sino que también inhiben la activación y agregación

plaquetaria al estimular a la adenilato ciclasa y por lo tanto los niveles intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (cAMP). Adicionalmente, las células endoteliales expresan CD39, una ecto-adenosin difosfatasa (ADPasa) asociada a membranas. CD39 atenúa la activación plaquetaria al degradar el adenosin difosfato (ADP), un agonista plaquetario (Figura 1) (1,2).

Actividad anticoagulante

Las células endoteliales juegan un papel esencial en la regulación de la generación de trombina a través de varios mecanismos, uno de ellos es la producción de proteoglicanos de heparán sulfato, que se unen a la antitrombina circulante acelerando la tasa de inhibición de la trombina y otra enzimas coagulantes (Figura 1) (1).

Las células endoteliales regulan la generación de trombina expresando trombomodulina y el receptor de la proteína C endotelial (EPCR) en la superficie (Figura 1). La trombomodulina se une a la trombina y altera la especificidad de su substrato de manera que deja de actuar como procoagulante y se convierte en un potente activador de la proteína C. La proteína C activada actúa como anticoagulante al degradar e inactivar al factor V y factor VIII activados (Fva y FVIIIa), factores claves en la generación de trombina. La proteína S actúa como cofactor de esta reacción, y la EPCR potencia esta vía al unirse a la proteína C y presentarla al complejo trombina-trombomodulina para su activación. Adicionalmente la proteína C activa regula la inflamación y preserva la función de barrera del endotelio (1).

Las células endoteliales al mismo tiempo que sintetizan factor tisular sintetizan al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), un inhibidor natural de la coagulación (2).

Actividad Fibrinolítica

El endotelio promueve la fibrinólisis al sintetizar y liberar el activador de plasminógeno tisular y uroquinasa (t-PA y u-PA), los cuales inician la fibrinólisis al convertir el

plasminógeno en plasmina. Las células endoteliales íntegras sintetizan t-PA constitutivamente pero también lo liberan en respuesta a estímulos como trombina y bradiquinina mientras que las células endoteliales dañadas liberan u-PA (1).

Las células endoteliales también producen el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), el principal regulador de t-PA y u-PA (Figura 1). Por tanto, la actividad fibrinolítica neta depende del equilibrio dinámico entre la liberación del activador del plasminógeno y del PAI-1. La fibrinólisis se localiza en la superficie celular gracias a que las células expresan anexina II, un co-receptor del plasminógeno y t-PA, que promueve su interacción. De modo que, los vasos sanguíneos sanos inhiben la trombosis y ayudan a mantener las plaquetas en estado quiescente (1).

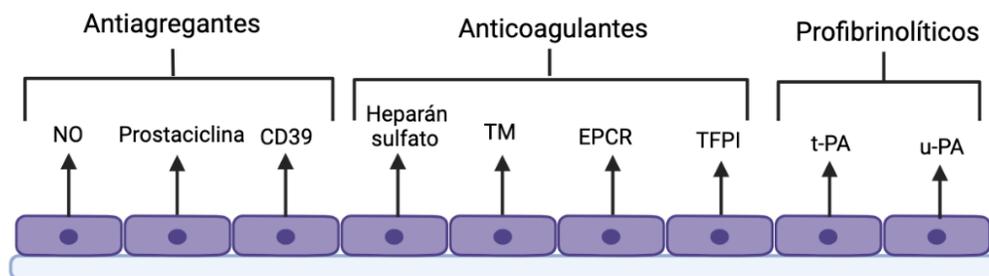


Figura 1. Funciones antitrombóticas del endotelio. NO: óxido nítrico, TM: trombosmodulina, EPCR: receptor endotelial de la proteína C, TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular, t-PA: activador del plasminógeno tisular, u-PA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa. Figura modificada de Hoffbrand, realizada en BioRender.com (2021) (1).

Tono vascular y permeabilidad

Además de sintetizar potentes vasodilatadores, tales como prostaciclina y óxido nítrico, las células endoteliales también producen una serie de péptidos regulatorios conocidos como endotelinas que inducen vasoconstricción, lo que inmediatamente disminuye el flujo sanguíneo en el sitio de lesión y favorece la interacción con las plaquetas y los factores de coagulación. La permeabilidad celular endotelial está determinada por las interacciones

intercelulares entre estas células. La vasodilatación, la trombocitopenia, y altas dosis de heparina pueden aumentar la permeabilidad endotelial. La proteína C activada contribuye a la función de barrera del endotelio (1,2).

Plaquetas

Las plaquetas son estructuras pequeñas discoidales que se producen en la médula ósea por la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos. Debido a que son anucleadas, la capacidad de las plaquetas para sintetizar proteínas es limitada. Consecuentemente, la composición proteica de las plaquetas está determinada por la célula madre y por los factores endocitados de la circulación (1,2).

La trombopoyetina, regula la proliferación y maduración de los megacariocitos y por lo tanto, la producción de plaquetas. El conteo normal de plaquetas es de aproximadamente $250 \times 10^9/L$ ($150\text{--}400 \times 10^9/L$) y tienen una vida media de 10 días (1,2).

Las glicoproteínas de la superficie plaquetaria son particularmente importantes para las reacciones de adhesión y agregación plaquetaria. La adhesión al colágeno se presenta gracias a la glicoproteína Ia (GPIa) mientras que las glicoproteína Ib y IIb/IIIa son importantes en la unión de las plaquetas con el factor de von Willebrand (vWF) y al subendotelio vascular (2).

La membrana plasmática se invagina al interior de la plaqueta para formar un sistema abierto de membrana (canalicular) que provee una gran superficie por la cual las proteínas plasmáticas de coagulación pueden ser absorbidas selectivamente. La membrana fosfolipídica es particularmente importante para la activación de factor X y protrombina (2).

Las plaquetas contiene tres tipos de gránulos: densos, α y lisosomas. Los gránulos α contienen quimioquinas, citoquinas, moléculas de adhesión, reguladores fibrinolíticos, factores angiogénicos, inmunomoduladores y factores de coagulación. Estas proteínas son sintetizadas por los megacariocitos (como el vWF) o adquiridos por endocitosis (como el fibrinógeno). Los gránulos densos contienen adenosin difosfato (ADP), adenosin trifosfato (ATP), serotonina y calcio. Los lisosomas contienen enzimas hidrolíticas. Las plaquetas

también son ricas en proteínas de señalización y de citoesqueleto, las cuales son importantes para activarse rápidamente tras la quiescencia. Al activarse las plaquetas liberan el contenido de sus gránulos a un sistema canicular (2, 4).

Al presentarse un daño en la íntima de un vaso se expone la matriz subendotelial, las plaquetas se adhieren a las proteínas expuestas de la matriz. Las plaquetas adheridas sufren una activación y no solo liberan sustancias que reclutan más plaquetas sino que promueven la generación de trombina y la subsecuente formación de fibrina. La trombina a su vez es un potente agonista plaquetario y amplifica el reclutamiento y activación de plaquetas, las plaquetas activadas se agregan y forman un tapón que sella el sangrado (Figura 2)(1).

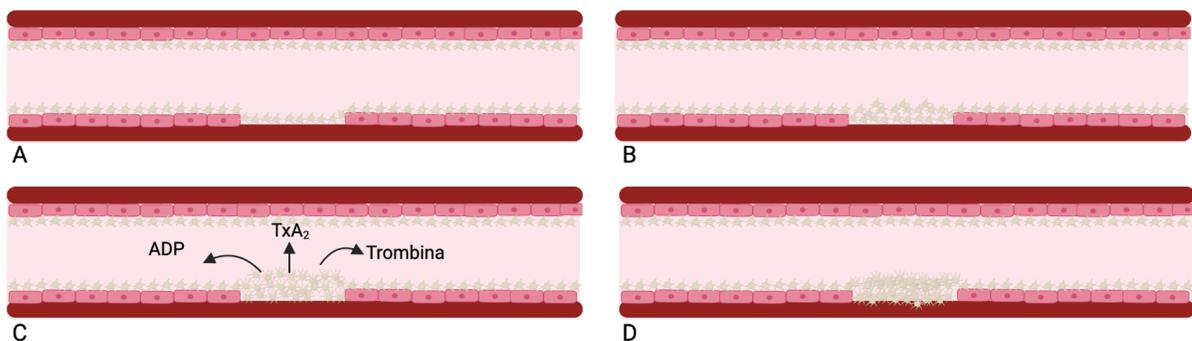


Figura 2. Función plaquetaria. A. Daño al endotelio que expone los componentes de la matriz subendotelial. B. Las plaquetas se adhieren a la matriz expuesta. C. Las plaquetas activadas secretan ADP, tromboxano A₂ (TxA₂) y favorecen la formación de trombina. El ADP, TxA₂ y la trombina favorecen la activación de más plaquetas y la agregación plaquetaria Figura modificada de Hoffbrand, realizada en BioRender.com (2021)(1).

Adhesión

Las plaquetas se adhieren al factor de vWF expuesto y al colágeno, originado por las células endoteliales y el subendotelio respectivamente. La monocapa de plaquetas promueve la generación de trombina y de fibrina. Estos eventos dependen de los receptores expresados

constitutivamente en la superficie de las plaquetas, $\alpha 2\beta 1$ y la glicoproteína (GP) VI que se une al colágeno, y GPIb α y GPIIb/IIIa, ($\alpha_{IIb} \beta_3$) que se une a vWF (Figura 3)(1).

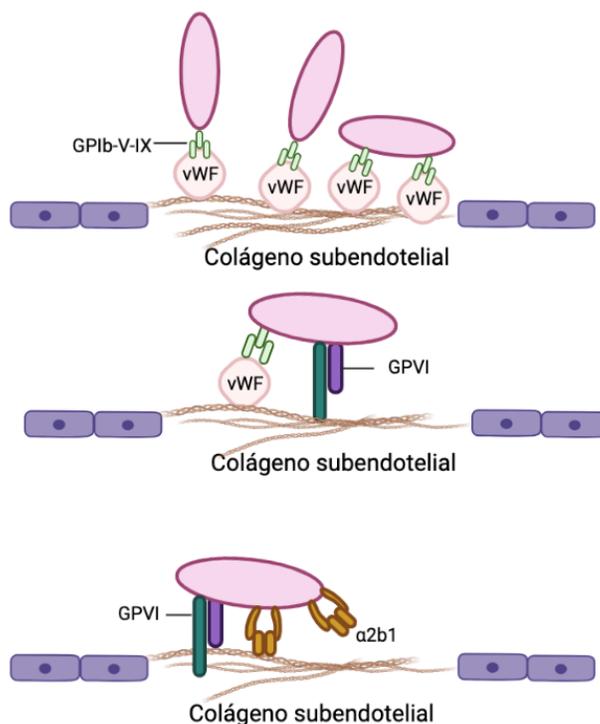


Figura 3. Proteínas involucradas en la adhesión y activación plaquetaria. Figura modificada de Hoffbrand, realizada en BioRender.com (2021) (1).

El vWF, sintetizado por las células endoteliales y megacariocitos se ensambla en multímeros que van desde 550 a 10000 kDa. Cuando es liberado de los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales o del los α -gránulos de las plaquetas, la mayoría del vWF entra a circulación donde transporta al FVIII, pero el vWF liberado de la superficie abluminal de las células endoteliales se acumula en la matriz subendotelial. Los multímeros de vWF actúan como una “goma” que une las plaquetas a la pared del vaso sanguíneo dañado, adicionalmente proveen sitios de unión al colágeno lo que aumenta la adhesión de las plaquetas. Los multímeros son cortados en el plasma en multímeros más pequeños y en monómeros por la metaloproteínasa plasmática llamada ADAMTS13 (1,2).

Activación y secreción

La adhesión de las plaquetas al colágeno y al vWF activa las vías de señalización que conllevan a la activación de las plaquetas. Estas vías incluyen la síntesis dependiente de cicloxigenasa 1 (COX-1) y la liberación de tromboxano A₂, y desencadena la liberación de ADP. El tromboxano A₂ es un potente vasoconstrictor y, al igual que el ADP, favorece el reclutamiento y activación de más plaquetas. Este proceso resulta en la expansión del tapón de plaquetas. Para activar las plaquetas, el tromboxano A₂ y el ADP se deben unir a sus respectivos receptores en la membrana de las plaquetas. El receptor de tromboxano (TB) es una proteína G que se encuentra tanto en las plaquetas como en el endotelio, lo que explica el efecto vasoconstrictor del mismo. (1,2).

A pesar de que el TB y varios receptores de ADP utilizan diferentes vías de señalización, todas desencadenan un aumento de la concentración de calcio intracelular, lo que induce cambios en las plaquetas gracias a rearrreglos del citoesqueleto, movilización y liberación de gránulos y la subsecuente agregación plaquetaria. Las plaquetas activadas promueven la coagulación pasando la fosfatidilserina de la membrana interna a la membrana externa. Esta exposición de los fosfolípidos aniónicos es esencial para el ensamblaje de los complejos de los factores de coagulación. Una vez ensamblados estos factores, se desencadena la generación de trombina y la subsecuente formación de fibrina. Adicionalmente, la trombina amplifica el reclutamiento y activación de plaquetas, promoviendo la expansión del tapón de plaquetas(1,2).

Las plaquetas activadas también promueven la formación de fibrina y su estabilización al liberar los factores V, XI, XIII y fibrinógeno. Las plaquetas activadas también liberan proteínas de adhesión, como vWF, trombospondina, fibronectina, lo que aumenta la adhesión plaquetaria en los sitios de daño endotelial, así como factor derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que promueven la reparación tisular (1,2).

Agregación

La GPIIb/IIIa media la unión plaqueta-plaqueta que permite la formación de agregados de plaquetas. En las plaquetas no activas, GPIIb/IIIa presenta muy poca afinidad por su ligando. Al darse la activación plaquetaria, GPIIb/IIIa sufre una transformación conformacional que potencia la afinidad por su ligando, por el fibrinógeno y por el vWF. La unión del GPIIb/IIIa con el fibrinógeno y el vWF induce señales del interior al exterior de la célula que aumentan la activación de plaquetas y resultan en la activación de más receptores GPIIb/IIIa, creando una retroalimentación positiva. La fibrina une las plaquetas agregadas y las ancla al sitio del daño(1).

Coagulación

La coagulación resulta en la generación de trombina, que convierte fibrinógeno soluble en fibrina. La coagulación ocurre a través de una serie concertada de pasos de activación, en el que una proteasa nascente activa un precursor enzimático inactivo, un proceso que se repite en forma de cascada. Existen complejos enzimáticos, de los cuales los principales están compuestos por enzimas dependientes de vitamina K y cofactores no enzimáticos ensamblados en las membranas aniónicas de fosfolípidos, para esto es necesario la presencia de calcio. Dado que un complejo enzimático activa un substrato que se convierte en el componente enzimático del complejo subsecuente, un pequeño estímulo puede producir una respuesta robusta. Inicialmente una pequeña cantidad de trombina activa cofactores no enzimáticos y plaquetas. Las plaquetas activadas proveen la superficie aniónica donde se ensamblan los complejos de coagulación que a su vez, promueven una mayor generación de trombina. Los tres complejos enzimáticos involucrados en la generación de trombina son: la tenasa extrínseca, la tenasa intrínseca y la protrombinasa(1).

La coagulación se puede dividir en tres fases: iniciación, propagación y terminación (Figura 4). Estas fases reflejan el exquisito control sobre la actividad de la trombina. La fase de iniciación, la cual es mediada principalmente por la tenasa extrínseca, es responsable de la generación de trombina necesaria para el impulso inicial para la activación de plaquetas y de

la coagulación. La propagación de esta fase está mediada por la tenasa intrínseca y es responsable por la explosión en la generación de la trombina necesaria para sostener la respuesta de coagulación. La fase de terminación, que es mediada por una serie de inhibidores de proteasas, asegura que la generación de trombina sea localizada y finita. Cada complejo enzimático presenta una composición, un ensamblaje y una regulación similar(1).

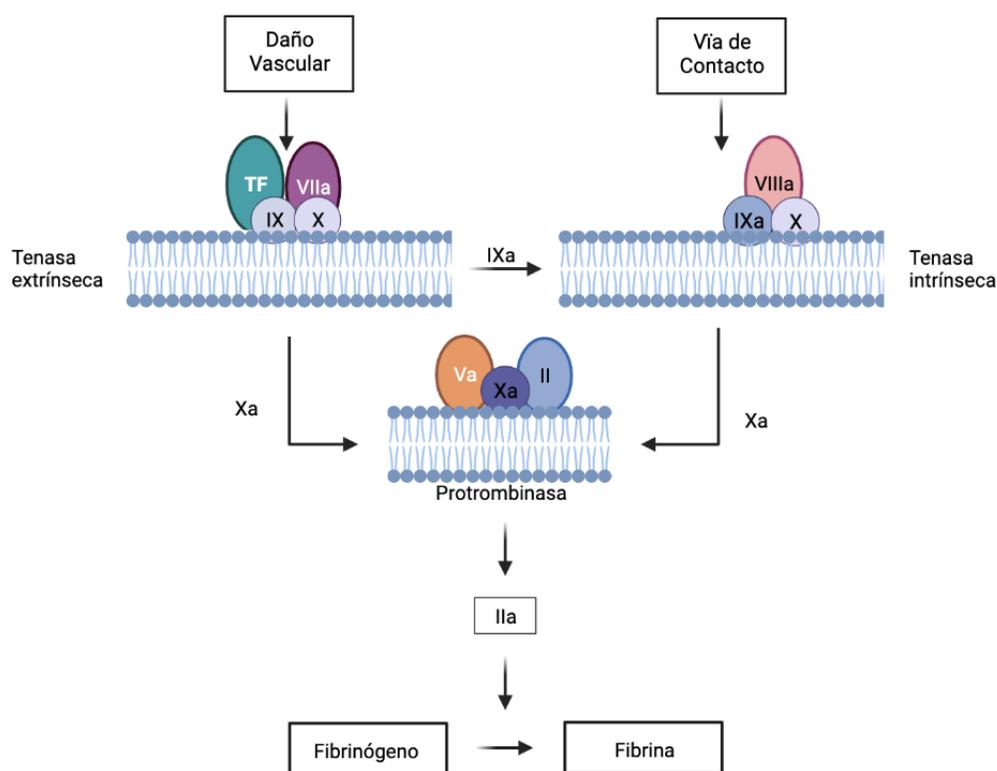


Figura 4. Sistema de coagulación: tenasa extrínseca, tenasa intrínseca y complejo protrombinasa. Figura modificada de Hoffbrand, realizada en BioRender.com (2021) (1).

Tenasa extrínseca

Este complejo se forma tras la exposición del factor tisular, ya sea por la presencia de macrófagos y otras células que lo expresan o por la exposición de fibroblastos subendoteliales o células de músculo liso que lo expresan constitutivamente. El factor tisular es una proteína integral de membrana que sirve como receptor del factor VIIa. La sangre contiene cantidades

trazas de factor VIIa pero este no tiene ningún efecto en ausencia del factor tisular. Aunque el factor tisular está presente en algunas superficies celulares, se ha propuesto que se encuentra de manera encriptada, en su forma inactiva. Se cree que la activación se presenta por un rearrreglo de un puente disulfuro catalizado por una disulfuro isomerasa y la exposición de la fosfatidilserina en la membrana externa. El factor VIIa se une al factor tisular en presencia de calcio para formar el complejo de tenasa extrínseca, el cual es un potente activador de los factores IX y X. Una vez activados, los factores IXa y Xa sirven como los componentes enzimáticos de la tenasa intrínseca y de la protrombinasa, respectivamente. Dado que se producen niveles suficientes de factor Xa y trombina en respuesta al factor tisular, el complejo extrínseco se considera un mediador esencial en la fase de iniciación (1).

Tenasa intrínseca

El factor IXa se une al factor VIIIa en las plaquetas aniónicas o en las superficies celulares para formar el complejo de tenasa intrínseco. El FVIII circula en la sangre unido al vWF. La trombina escinde al factor VIII y lo libera del vWF, convirtiéndolo a su estado activo. Cuando las plaquetas están activas expresan sitios de unión para el factor VIIIa. Una vez en la superficie plaquetaria, el factor VIIIa, en presencia de calcio, se une al factor IXa para formar el complejo de la tenasa intrínseca, el cual activa al factor X. Dado que la tenasa intrínseca activa al factor X a una tasa hasta 50-100 veces más rápida que la tenasa extrínseca, juega un papel fundamental en la propagación de la cascada de la coagulación (1).

Vía de contacto

Su nombre se debe a que sus constituyentes (factores XII, XI, IX y calicreina), requieren contacto con agentes artificiales como ácido eláxico o sílica para su activación. Por esta razón, la vía de contacto perdió relevancia cuando se identificó la vía del factor tisular y actualmente se considera que la vía necesaria para la activación de la coagulación es esta última, y que la vía de contacto no tiene relevancia clínica ya que pacientes con deficiencias de factor XII, precalicreina, y quininógeno de alto peso molecular no presentan problemas de sangrado. Sin embargo, se han detectado pacientes con deficiencias severas de factor XI

pueden sangrar tras un trauma o cirugía. La capacidad de la trombina de retroalimentar y activar el factor XI unido a las plaquetas puede ayudar a explicar este fenómeno. También es posible que el factor XI derivado de las plaquetas sea más importante que el circulante (1).

No se puede ignorar esta vía porque los catéteres y otros dispositivos médicos desencadenan el proceso de coagulación a través de ella. El factor XII se puede unir a superficies artificiales y sufrir un cambio conformacional que resulta en su activación. El factor XIIa convierte la precalicreína en calicreína en una reacción que es acelerada por el quininógeno de alto peso molecular. A su vez, el factor XIIa y la calicreína retroalimentan la activación del factor XII. El factor XIIa propaga la coagulación al activar al factor XI. El factor XIa es el activador principal del factor IX (1).

Adicionalmente, se considera que la vía de contacto contribuye también a la estabilidad del trombo arterial y venoso (1).

Protrombinasa

Siendo el único productor de trombina, el complejo de protrombinasa es esencial en la hemostasia. El factor Xa se une al factor Va, su cofactor activado, en los fosfolípidos aniónicos de la superficie de membrana, para formar el complejo de protrombinasa. Las plaquetas activadas liberan factor V de sus gránulos α . Este factor V derivado de plaquetas parece jugar un papel más importante que su contraparte plasmático. Mientras que el factor V plasmático requiere de la trombina para ejercer su función de cofactor, el factor V plaquetario es liberado con cierta actividad. Las plaquetas activadas expresan sitios de unión para el factor Va en la superficie. El factor Va unido a la membrana sirve como receptor del factor Xa. La actividad catalítica del factor Xa aumenta hasta 10^5 veces cuando el factor Xa se incorpora en el complejo protrombinasa (1).

Terminación

Debido a que la trombina activa al fibrinógeno, a las células y a las plaquetas, y media los procesos anticoagulantes y antifibrinolíticos, es fundamental regular su actividad y ubicación. Por lo tanto, la fase de terminación juega un papel fundamental en el balance de las fuerzas procoagulantes. Dos inhibidores principales modulan la coagulación: TFPI y antitrombina. TFPI, el cual se localiza en las plaquetas y en las células endoteliales de la microvasculatura, inhibe al factor VIIa en presencia de Xa. De manera que el TFPI, detiene la iniciación de la coagulación mediada por el factor tisular, pero hasta que se ha generado suficiente factor Xa para propagar la coagulación. Los altos niveles de trombina producidos durante la fase de amplificación son controlados por la antitrombina. Este inhibidor de proteasa también inhibe a otras proteasas, incluyendo a los factores VIIa, IXa y Xa. Aunque la antitrombina es abundante, presenta solo actividad moderada, excepto en presencia de glicosaminoglucanos como el heparán sulfato. Otra proteína, el cofactor de heparina II también inhibe a la trombina. La α 2-macroglobulinas, α 2-antiplasmina, el inhibidor de la esterasa C1 esterase inhibitor y la α 1- antitripsina también presentan efectos inhibitorios sobre las serin proteasas circulantes (1,2).

Sistema de Proteína C y proteína S

La trombina se une al receptor de la superficie celular endotelial llamado trombomodulina. El complejo resultante activa la serin proteasa dependiente de vitamina K, la proteína C, la cual inhibe a los factores V y VIII. El efecto de la proteína C es potenciado por otra proteína dependiente de vitamina K, la proteína S, que une la proteína C a la superficie de las plaquetas. El receptor de la proteína C endotelial localiza a la proteína C en la superficie endotelial, promoviendo la activación por el complejo trombina-trombomodulina. Adicionalmente, la proteína C activada potencia la fibrinólisis. Al igual que las otras serin proteasas, la proteína C activada es inactivada por los inactivadores de proteasas, como por ejemplo la antitrombina (2).

Formación de Fibrina

La trombina convierte al fibrinógeno soluble en fibrina insoluble. El fibrinógeno es una molécula dimérica, cada mitad está compuesta de tres cadenas polipeptídicas, $A\alpha$, $B\beta$ y γ . Las cadenas están unidas entre si por puentes de sulfuro. El fibrinógeno presenta una estructura trimodular con un dominio E central rodeado de dos dominios D. La trombina se une a la región amino terminal de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ del fibrinógeno donde corta en ciertas uniones peptídicas y libera los fibrinopéptidos A y B para generar monómeros de fibrina. Los fibrinopéptidos liberados crean nuevos extremos aminos que permiten nuevas interacciones entrecruzadas entre los dominios E y D formando la fibrina. La estabilidad de la fibrina se aumenta por las plaquetas y las células procoagulantes. Las plaquetas se unen a la fibrina por medio de GPIIb/IIIa y promueve la formación de redes densas de fibrina pero además liberan factor XIII. Las uniones covalentes entre las cadenas α y β de los monómeros de fibrina con el factor XIII, estabilizan la fibrina, lo que le confiere cierta resistencia a la tensión y a la degradación. El factor XIII circula como un heterodímero construido de subunidades A y B. Los sitios activos de unión al calcio del factor XIII se encuentran en la subunidad A. Las plaquetas contienen grandes cantidades de factor XIII en su citoplasma pero este factor XIII contiene únicamente subunidades A. Tanto el factor XIII plasmático como el plaquetario son activados por la trombina. La hemostasia depende del balance dinámico entre la formación de fibrina y su degradación. El sistema fibrinolítico es quien media su degradación (Figura 5) (1).

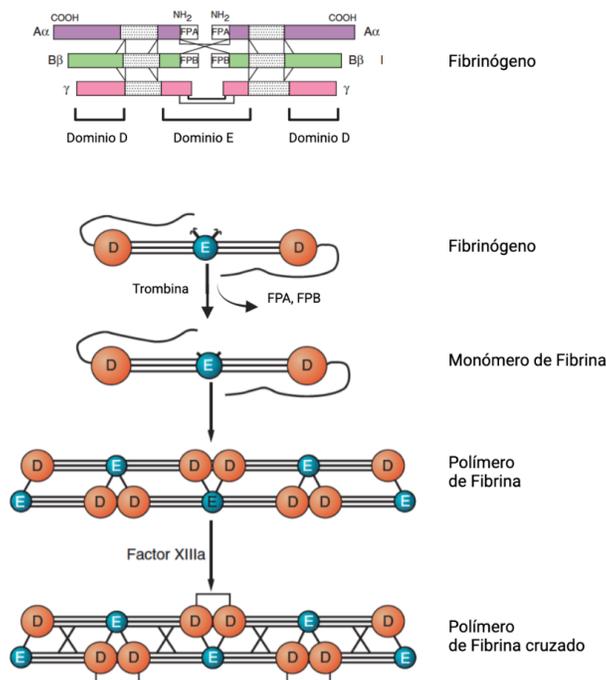


Figura 5. Estructura del fibrinógeno y su conversión a fibrina. Figura modificada de Hoffbrand, realizada en BioRender.com (2021)(1).

Sistema Fibrinolítico

La fibrinólisis inicia cuando los activadores de plasminógeno convierten el plasminógeno en plasmina, la cual degrada la fibrina en fragmentos solubles. La sangre contiene dos activadores de plasminógeno inmunológica y funcionalmente distintos, t-PA y u-PA. t-PA media la degradación intravascular de fibrina, mientras que el u-PA se une a receptores específicos en la superficie de las células donde activa el plasminógeno unido a las células. La proteólisis pericelular durante la migración celular y el remodelamiento y la reparación tisular son de las principales funciones del u-PA.

La regulación de la fibrinólisis ocurre a diferentes niveles. La fibrina es el sustrato del sistema fibrinolítico y sirve como un estímulo transitorio pero esencial, que va cediendo conforme se va degradando. Las serpinas, PAI-1, y en menor medida, el PAI-2, inhiben a los activadores de plasminógeno, mientras que α_2 -antiplasmina inhibe plasmina. Las células

endoteliales sintetizan PAI-1, el cual inhibe tanto t-PA como u-PA, mientras que los monocitos y la placenta sintetizan PAI-2, que inhibe específicamente a u-PA (1).

El inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (TAFI) también modula la fibrinólisis y provee un vínculo entre la fibrinólisis y la coagulación (1).

Un desbalance en cualquiera de estos sistemas hemostáticos puede provocar ya sea hemorragias o trombosis. Los desórdenes de sangrado, pueden deberse, por lo tanto, a deficiencias en los factores de coagulación (87%), a desórdenes plaquetarios (3%) o a defectos en el sistema fibrinolítico (3%) (5,6).

CAPÍTULO I: DESÓRDENES PLAQUETARIOS

Los desórdenes plaquetarios son un grupo grande de desórdenes con diátesis hemorrágica variable que va desde sangrados moderados a severos, principalmente a nivel de piel y mucosas. Los desórdenes hereditarios de plaquetas (DHP) son considerados raros con una frecuencia de 1: 10000 pero usualmente son subdiagnosticados debido a la dificultad en el diagnóstico, particularmente en casos leves(7).

Los DHP se pueden caracterizar en cuantitativos, cualitativos o ambos. Algunos casos de DHP están asociados a síndromes, ya que las proteínas involucradas son importantes en otras células y órganos. Otro grupo de DHP, causados por mutaciones en genes involucrados en la diferenciación celular, están asociados con un aumento en el riesgo de enfermedades hematológicas malignas. Basado en esto, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación para los DHPs: DHPs que afectan únicamente plaquetas, DHPs pertenecientes a un síndrome e DHPs asociadas a un riesgo aumentado de enfermedades hematológicas malignas(8).

Desórdenes que afectan el número de plaquetas

Este grupo comprende los desórdenes asociados a MYH9, trombocitopenia amegacariocítica congénita, trombocitopenias asociadas a defectos esqueléticos, trombocitopenia con diseritropoyesis ligada al X (XLT), desórdenes plaquetarios asociados a leucemia aguda (FDP/AML), macrotrombocitopenia mediterránea benigna (BBM) y trombocitopenia familiar 2 (THC2) (9).

Desórdenes asociados a MYH9

Son un grupo de desórdenes autosómicos dominantes con trombocitopenia y están causadas por mutaciones en el gen *MYH9*. Este gen codifica para la cadena pesada de la miosina IIA no muscular que forma parte del citoesqueleto contráctil de los megacariocitos, plaquetas y neutrófilos (4,9).

En estos pacientes la megacariopoyesis es inefectiva y las plaquetas son más grandes de lo normal (macrotrombocitosis) con inclusiones granulocíticas tipo Döhle. Los valores de plaquetas se encuentran entre $20 \times 10^3/\mu\text{L}$ - $130 \times 10^3/\mu\text{L}$ pero los sangrados suelen ser leves. Las pruebas de agregación plaquetaria son normales. Adicionalmente, los pacientes pueden presentar grados variables de enfermedad renal, nefropatía, pérdida auditiva, cataratas

preseniles y aumento de enzimas hepáticas. Según las características clínicas estos desórdenes eran conocidos como anomalía May-Hegglin, síndrome Epstein, síndrome Fechtner, síndrome Sebastian. Tiene una frecuencia estimada de 1 en 300 000 lo que representa el 12% de las trombocitopenias hereditarias (4,9).

El diagnóstico definitivo se realiza por la identificación de la mutación en el gen *MHY9* y se ha observado una asociación entre el genotipo y el fenotipo, donde las mutaciones que afectan el dominio principal de la proteína MYH9 resultan en una trombocitopenia más severa. El riesgo de manifestaciones no hematológicas depende de la variante patogénica (4).

Trombocitopenia amegacariocítica congénita (CAMT)

Es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una trombocitopenia sintomática que se manifiesta desde muy temprano con un fenotipo de sangrados severos. El conteo de plaquetas suele estar por debajo de los $50 \times 10^3/\mu\text{L}$. En el aspirado de médula ósea se observa la hipoplasia megacariocítica que puede progresar a un fallo medular. Esta enfermedad se debe a mutaciones en el receptor de trombopoyetina (TPO) y pueden por lo tanto identificarse en estudios genéticos (9).

Trombocitopenias asociadas a defectos esqueléticos

Este grupo de DPHs engloba trombocitopenias asociadas a defectos esqueléticos, dentro de estas se encuentran: Trombocitopenia con radio ausente (TAR) y trombocitopenia amegacariocítica con sinostosis radio-ulnar (ATRUS) (9).

- TAR es una enfermedad autosómica recesiva que se manifiesta muy temprano en el desarrollo, presentando diátesis hemorrágica que tiende a mejorar gracias a un aumento progresivo del conteo de plaquetas. En este caso, el diagnóstico es sencillo debido a la presencia de anomalías bilaterales en el radio y megacariocitos disminuidos en la médula ósea, el tamaño y la función plaquetaria son normales. Esta enfermedad se ha asociado a defectos en la señalización TPO/c-mpl (9).
- ATRUS es una trombocitopenia amegacariocítica autosómica dominante asociada a anemia aplásica, sinostosis radio-ulnar, clinodactilia, sindactilia, displasia y pérdida auditiva neurosensorial. Al igual que TAR, ATRUS se presenta con una trombocitopenia severa al nacimiento pero que mejora con el tiempo. Está asociada a mutaciones en el gen *HOXA11*, un gen de la familia homeobox que codifica para

proteínas importantes en el desarrollo esquelético y en la hematopoyesis: La detección de mutaciones en *HOXA11* permite confirmar el diagnóstico (9).

Trombocitopenia ligada al X con diseritropoyesis

Este desorden plaquetario ligado al X se debe a mutaciones en el gen *GATA1*, que codifica para el factor de transcripción GATA1, el cual tiene un papel bien establecido en la diferenciación eritroide y megacariocítica. Como resultado, los pacientes presentan trombocitopenia con una megacariopoyesis defectuosa. El diagnóstico se obtiene con la identificación de la mutación en *GATA1* (9).

Desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia aguda (FDP/AML)

Es una enfermedad rara, autosómica dominante que se presenta por mutaciones en el gen *RUNX1*, el cual codifica para factores de transcripción clave en la hematopoyesis. Por esta razón, estos pacientes no sólo presentan alteraciones en la megacariopoyesis sino que tienen un mayor riesgo de desarrollar malignidades hematológicas, como síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide aguda (9).

Aunque en estos pacientes los conteos plaquetarios se encuentran moderadamente reducidos (entre $80 \times 10^3/\mu\text{L}$ - $150 \times 10^3/\mu\text{L}$) pueden presentar diátesis hemorrágica debido a una disfunción plaquetaria similar a la producida por aspirina. Debido a lo anterior, para un adecuado diagnóstico es importante no sólo la identificación de la mutación sino también la agregometría (9).

Desórdenes que afectan la función plaquetaria

Deficiencias de los gránulos alfa

- *Síndrome de plaqueta gris (GPS)*: es un desorden autosómico recesivo que cursa con plaquetas grandes y pálidas, esto debido a una deficiencias de los gránulos alfa. El GPS es causado por variantes en el gen que codifica para la proteína tipo neurodequina 2 (NBEAL2). Experimentalmente se ha observado que la ausencia de este gen está involucrado con liberación ectópica de los gránulos alfa, lo que ocasiona una fibrosis medular progresiva, hematopoyesis extramedular y esplenomegalia. Los pacientes con GPS cursan por lo tanto con macrotrombocitopenia con la presencia de plaquetas grises, esplenomegalia, fibrosis medular y sangrados que van desde leves a severos (4,10).

- *Síndrome de Paris Trousseau (PTS)*: es un desorden autosómico dominante con alteraciones cuantitativas y cualitativas. Se caracteriza por macrotrombocitopenia neonatal con la presencia de gránulos alfa gigantes. PTS se ha asociado con deleciones terminales en el cromosoma 11 que incluyen el gen FLI1 que codifica para el factor de transcripción FLI1, el cual es importante para la diferenciación megacariocítica. Los sangrados en estos pacientes suelen ser leves pero pueden ser importantes ante desafíos hemostáticos. El fenotipo es variable clínicamente y puede incluir rasgos dismórficos, discapacidad intelectual, defectos cardiacos congénitos, malformaciones en el tracto gastrointestinal, renales, reproductivas o a nivel del sistema nervioso central. En los pacientes con PTS, la macrotrombocitopenia puede resolver con el tiempo pero no así la disfunción plaquetaria, se observan megacariocitos inmaduros en la médula (4).
- *Síndrome de Quebec (QPD)*: es un desorden autosómico dominante causado por una ganancia de función que ocasiona un aumento de hasta 100 veces en la liberación de uroquinasa en las plaquetas. Se debe a una duplicación en tándem de 78kb del gen de la uroquinasa activadora del plasminógeno (PLAU) que provoca una interacción ectópica con un potenciador de los megacariocitos. A diferencia de los otros síndrome plaquetarios, el sangrado puede mantenerse hasta 3 días y no responde a las transfusiones plaquetarias(4,10).

Deficiencias de los gránulos densos

- *Síndrome de Hermansky Putlak (HPS)*: es un desorden autosómico recesivo caracterizado por diátesis hemorrágica debido a la deficiencia de gránulos densos acompañada de albinismo oculocutáneo ocasionado por defectos en los melanosomas. Se han descrito 10 genes que ocasionan HPS: *HPS1*, *AP3B1*, *HPS3*, *HPS4*, *HPS5*, *HPS6*, *DTNBP1*, *BLOC1S3*, *BLOC1S6* y *AP3D1*. Las proteínas HPS se ensamblan formando los complejos de biogénesis relacionados con lisosomas (BLOCs), proteínas adaptadoras asociadas a clatrina y otros complejos importantes en la maduración de los gránulos densos y de los melanosomas. Algunos pacientes, además de los sangrados y el albinismo ocular presentan fibrosis pulmonar, colitis granulomatosa y neutropenia. La severidad del sangrado es variable (4,11).

- *Síndrome de Chediak-Higashi (CHS)*: es un desorden autosómico recesivo caracterizado por inmunodeficiencias con infecciones bacterianas recurrentes, anormalidades neurológicas progresivas, albinismo oculocutáneo, alto riesgo de desarrollar linfocitosis hemofagocítica (HLH) y defectos en los gránulos densos. CHS es causado por defectos en el regulador de tráfico lisosomal LYST. La característica patognomónica de CHS es la presencia de gránulos grandes eosinofílicos dentro de los neutrófilos, indicativos del defecto en el tráfico vesicular. Los pacientes con CHS tienen mal pronóstico, mueren en etapas tempranas principalmente por infecciones o por la HLH secundaria. Los gránulos densos están disminuidos, no ausentes, los pacientes presentan epistaxis y petequias principalmente (4,11).

Defectos en los receptores plaquetarios

- *Síndrome de Bernard Soulier (BSS)*: es un desorden autosómico recesivo causado por mutaciones en el complejo GpIb/IX/V, el principal receptor del vWF. Debido a esto, las plaquetas presentan dificultades para unirse al subendotelio vascular. Los pacientes con BSS presentan macroplaquetas con trombocitopenia leve o moderada. El tamaño aumentado de las plaquetas se debe a la falta de interacción entre la proteína de unión a la actina del citoesqueleto plaquetario y el dominio citoplasmático del polipéptido GpIb. Así mismo, el complejo GpIb/IX/V es el principal locus de los residuos de ácido siálico y la falta de estos disminuye la vida media de las plaquetas, lo que conlleva a la trombocitopenia. En estos pacientes, los sangrados se presentan desde la infancia con petequias, epistaxis y sangrados gastrointestinales; los sangrados severos suelen presentarse únicamente ante un estrés hemostático. El diagnóstico a nivel de laboratorio se realiza por la presencia de trombocitopenia, aunque puede presentarse con niveles normales de plaquetas, un aumento en el volumen plaquetario, tiempo de sangrado y PFA-100 aumentados y agregación plaquetaria normal con epinefrina, ADP, colágeno y ácido araquidónico pero ausente

con bajas dosis de trombina y ristocetina. La confirmación del diagnóstico se realiza por citometría de flujo (9,10).

- *Enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario (PT-vWD)*: es una enfermedad autosómica dominante rara que cursa con defectos cuantitativos y cualitativos de plaquetas debido a un aumento en la función de GpIb, una subunidad del receptor de vWF. En PT-vWD se presenta un aumento en la afinidad entre GpIb y el vWF, como consecuencia, las plaquetas forman espontáneamente los multímeros de alto peso molecular de vWF y por lo tanto una mayor agregación plaquetaria y un mayor aclaramiento. Aunque la agregación plaquetaria puede ocasionar trombosis, en estos pacientes prevalecen los sangrados por la trombocitopenia. Los sangrados suelen ser leves pero pueden aumentar ante los retos hemostáticos. A nivel de laboratorio se observa trombocitopenia, macrocitos plaquetaria, tiempos de sangrados aumentados. La agregación plaquetaria con bajas dosis de ristocetina se encuentra aumentada y se observa una disminución de los multímeros de vWF de alto peso molecular. Los niveles plasmáticos de vWF presentan incongruencias entre las pruebas funcionales y no funcionales. Se debe de hacer diagnóstico diferencial con la enfermedad de von Willebrand (VWD) (9).
- *Trombocitopenia de Glanzmann (GT)*: aunque es una enfermedad rara, es la patología por disfunción plaquetaria más frecuente. Es un trastorno autosómico recesivo que se debe a una deficiencia o disfunción de la integrina de membrana $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GpIIb-IIIa), la cual, tras la activación, se una glicoproteínas como fibrinógeno, vWF y fibronectina, mediando así la agregación plaquetaria. Además de la alteración en la agregación plaquetaria, la deficiencia de GpIIb-IIIa afecta la expansión de las plaquetas en la matriz subendotelial, disminución del contenido de fibrinógeno en las plaquetas, disminución de la retracción del coágulo y alteración en la fosforilación de múltiples plaquetas. Los pacientes presentan púrpuras, epistaxis, hemorragias gíngivales y menorragias. Los síntomas se presentan después del nacimiento en pacientes homocigotos, los pacientes heterocigotos suelen ser asintomáticos aunque se puede presentar una gran variabilidad de síntomas. A nivel de laboratorio se observa un tiempo de sangrado prolongado y la prueba de PFA-100 prolongados, la

agregación plaquetaria se encuentra disminuida con todos los agonistas. El diagnóstico definitivo se realiza por el análisis de la presencia de GpIIb-IIIa por citometría de flujo. Esta técnica ha permitido subclasificar la enfermedad según la cantidad de GpIIb-IIIa en tipo I (< del 5%), tipo II (entre 10-20%) y tipo III (hasta 50%). Se han identificado hasta 126 mutaciones responsables de GT distribuidas en dos genes, *ITGAB* y *ITGB3* (9,11,12).

Defectos en los receptores de agonistas plaquetarios

- *Defectos del receptor P2Y12*: es un desorden autosómico recesivo ocasionado por mutaciones en el gen *P2RY12* que ocasionan que se trunque el receptor P2RY12 o que sea disfuncional. El ADP activa las plaquetas a través de dos receptores tipo proteína G, el P2Y1 y P2Y12. El P2Y1 media la movilización de iones calcio y es el responsable de los cambios morfológicos en las plaquetas inducidos por ADP , mientras que el P2Y12 amplifica la respuesta al ADP y a los otros agonistas como tromboxano A₂, trombina y colágeno por lo que juega un papel fundamental en la formación y estabilización del coágulo. Los pacientes con esta alteración presentan púrpuras, sangrados en mucosas, menorragias y sangrados tras traumas o cirugías (11,13).
- *Defectos en el receptor de tromboxano*: el gen *TBXA2R* codifica para el receptor de tromboxano prostanoides tipo alfa, el principal receptor de tromboxano A₂ en las plaquetas. Su activación conlleva a la movilización de Ca²⁺ y la consecuente agregación plaquetaria. Se han reportado mutaciones en este gen con transmisión autosómica dominante que ocasionan sangrados mucocutáneos leves (11).

Defectos en las proteínas citoplasmáticas

Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS): es un síndrome ligado a cromosoma X con un amplio espectro de síntomas que incluyen infecciones, eczemas severos, autoinmunidad, trombocitopenia y malignidades. Es causado por variantes en el gen *WAS* que codifica para la proteína WAS. La proteína WAS juega un papel fundamental en el remodelamiento de la actina en el citoesqueleto celular y su deficiencia compromete las sinapsis inmunes necesarias para la función de células T, B y natural killers, lo que ocasiona los problemas de autoinmunidad, mayor riesgo a infecciones y a malignidades. La trombocitopenia se debe a un mayor aclaramiento y a una megacariopoyesis ineficaz. La severidad de la enfermedad está asociada al tipo de alteración genética: mutaciones sin sentido y alguna de cambio de sentido llevan a fenotipos más severos mientras que la disminución de la actividad proteica se debe únicamente a mutaciones de cambio de sentido, variantes asociadas a ganancia de función conllevan a neutropenia ligada al X. Los pacientes presentan inicialmente sangrados que van desde petequias hasta sangrados gastrointestinales o intracraneales, los sangrados pueden ser fatales hasta en el 20% de los casos. Los desórdenes de autoinmunidad y las malignidades se presentan más adelante en la enfermedad (4).

Importancia del diagnóstico de los DHPs

Es importante reconocer los DHP para evitar diagnósticos erróneos con trombocitopenias inmunes, se considera que al menos el 10% de los pacientes con DHPs son esplenectomizados y la gran mayoría recibe tratamiento innecesario con esteroides, algunos pacientes son mal diagnosticados con síndromes mielodisplásicos y pueden incluso llegar a recibir quimioterapia (8).

Un adecuado diagnóstico es importante también para el asesoramiento genético y el diagnóstico prenatal. En formas sindrómicas como los trastornos por *MYH9*, que se asocian con un aumento de riesgo de enfermedad renal, un adecuado diagnóstico permite realizar controles de la función renal para evitar la progresión a insuficiencia (8).

Así mismo, un adecuado diagnóstico de los DHPs puede favorecer la generación de conocimiento, el identificar la causa de estos trastornos puede ayudar a entender los mecanismos relacionados y por lo tanto, favorecer el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (8).

Diagnóstico de los DHPs

La primera línea para el diagnóstico de los DHPs consiste en una adecuada historia familiar y un exhaustivo examen físico. Actualmente se cuenta con sistemas de puntaje de sangrados estandarizados, se debe tomar en cuenta en el análisis inicial la morfología y los conteos plaquetarios (8).

De segunda línea se cuentan con los ensayos de función plaquetaria, el estándar de oro es la medición de la agregación plaquetaria por transmisión de luz, sin embargo, esta prueba cuenta con algunos inconvenientes: requiere sangre fresca y al menos 80 000 plaquetas/uL. Esto último dificulta el análisis en pacientes con trombocitopenia. La citometría de flujo funcional puede realizarse con cantidades menores pero es una prueba poco estandarizada. La ausencia o disminución de las glicoproteínas de membrana sí puede estudiarse por citometría de flujo (8).

La tercera línea de estudio incluye pruebas más especializadas como microscopía electrónica, Western Blot y evaluaciones enzimáticas. A pesar de todas estas herramientas y enfoques el diagnóstico de DPHs sigue siendo complejo y poco estandarizado, razón por la cual las pruebas genéticas están siendo cada vez más utilizadas (8).

CAPÍTULO II: DEFICIENCIAS DE FACTORES DE COAGULACIÓN

Como se mencionó anteriormente, en el proceso de hemostasia, para la estabilización del coágulo primario se requiere la formación de fibrina, que se genera a través de la cascada de coagulación que incluye los diferentes factores: fibrinógeno, protrombina, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXIII. La deficiencia hereditaria de cualquiera de estos factores puede resultar en una coagulopatía que conlleva a sangrados, ya sean espontáneos o ante un reto hemostático (post trauma o cirugía). Las enfermedades de sangrados más frecuentes son la hemofilia (A y B) y la enfermedad de von Willebrand. Las deficiencias de los factores restantes, debido a su baja frecuencia, se conocen en conjunto como enfermedades raras de la coagulación (14).

Hemofilia

La hemofilia es ocasionada por una ausencia, deficiencia o disfunción del FVIII de la coagulación en el caso de hemofilia A y del FIX en el caso de hemofilia B. Dado el importante papel de estas glicoproteínas en el proceso de coagulación, estos pacientes presentan una disminución o atraso en la generación de trombina y por lo tanto un defecto en la formación del coágulo y diátesis hemorrágica. Según la actividad del factor se clasifica en leve (5-40% de factor), moderada (1-5% de factor) y severa (<1% de factor). Es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X por lo que generalmente son los hombres quienes manifiestan la enfermedad y las mujeres son portadoras asintomáticas o se encuentran levemente afectadas. El 30% de los pacientes con hemofilia no tienen antecedentes familiares de la enfermedad, por lo que su enfermedad se debe a mutaciones espontáneas. La prevalencia global de hemofilia A es de 1 caso por cada 5000 nacimientos masculinos y 1 en cada 30 000 en hemofilia A (15).

- **Genética molecular:** ambos genes se encuentran en el cromosoma X. El gen del FVIII se encuentra en la banda distal (Xq28) del brazo largo, está constituido por 26 exones que codifican por un transcrito de ARNm de 9kb. Hay una gran

heterogeneidad alélica en los pacientes con hemofilia A con mutaciones identificadas en todos los exones y en sus puntos de unión con los intrones. La mutación más frecuente es una inversión intracromosomal en el intrón 22 que se encuentra en el 45% de los pacientes con hemofilia severa, seguida por una inversión en el intrón 1 presente en el 1-2% de los casos de hemofilia. Adicionalmente, se han identificado más de 2000 variantes responsables de hemofilia A, dentro de las cuales se encuentran mutaciones puntuales (66.5%), deleciones (23%), duplicaciones (4.8%), inserciones (1.6%) e indels (1.3%). Dentro de las mutaciones puntuales, las mutaciones de cambio de sentido son las más frecuentes independientemente del tipo de enfermedad, mientras que las de sin sentido se encuentran con más frecuencia en los pacientes con hemofilia severa. El gen del factor IX también se localiza en el brazo largo del cromosoma X en la banda Xq27 y está codificado por un fragmento de ADN de 33.5 kb, contiene 8 exones y codifica para un ARNm de 2.8 kb. La gran mayoría de los casos de hemofilia B se deben a mutaciones puntuales (16).

- **Hallazgos clínicos:** los pacientes con hemofilia severa presentan sangrados espontáneos recurrentes, principalmente hemartrosis en las rodillas, codos y tobillos. Las hemorragias recurrentes en las articulaciones pueden ocasionar sinovitis y daños articulares permanentes. También se presentan sangrados a nivel muscular, pero suelen darse como consecuencia de lesiones leves. Pueden presentarse hemorragias en el tracto gastrointestinal y en el tracto urinario, ocasionando hematuria. Existe un riesgo significativo de hemorragia intracraneal, la cual constituía la principal causa de muerte antes de que el tratamiento existiera. Los pacientes con hemofilia moderada o leve no suelen presentar sangrados espontáneos, sino que se presentan tras un trauma o una cirugía, inclusive si es de grado menor (17).

- **Hallazgos de laboratorio:** estos pacientes presentan el tiempo de tromboplastina (TTP) prolongado con el tiempo de trombina (TP) normal, el diagnóstico se realiza con la cuantificación del factor respectivo (15).
- **Diagnóstico molecular:** el algoritmo diagnóstico depende del tipo de hemofilia, en los casos de hemofilia A severa se debe analizar primero las inversiones de intrón 22 e intrón 1, en los casos negativos para estas inversiones y los casos de hemofilia moderada y leve se debe analizar el gen del FVIII completo, esto se puede realizar por secuenciación directa de los 26 exones, análisis de ligamentos o secuenciación de nueva generación. En los casos donde no se detecta la mutación se puede realizar MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) o aCGH (ensayo de hibridización genómica comparativo) para identificar variantes en el número de copias (CNV). En el caso de hemofilia B, el análisis suele hacerse por secuenciación directa, sin embargo en algunas casos se debe recurrir a análisis de CNV o secuenciación de nueva generación. En el 5% de los pacientes no se identifica la mutación, esto puede deberse a un mal diagnóstico o por mutaciones en regiones no codificantes. Una vez identificada la mutación en el paciente puede realizarse el estudio familiar e identificar así a las portadoras (16).
- **Tratamiento:** el principal tratamiento es la terapia de reemplazo con el factor deficiente, recombinante o derivado de concentrados plasmáticos. Este se puede administrar bajo demanda, en respuesta a un evento de sangrado, o de manera profiláctica. Actualmente se recomienda el tratamiento profiláctico para disminuir los riesgos de daños en las articulaciones, pero su alto costo y la necesidad de realizar infusiones intravenosas hasta 3 veces por semana dificulta su aplicación. En pacientes con hemofilia leve se puede utilizar desmopresina, un análogo de vasopresina que aumenta los niveles de FVIII y factor von Willebrand (15,17).

La principal complicación para el tratamiento de los pacientes hemofílicos es el desarrollo de inhibidores. Un inhibidor es un anticuerpo IgG policlonal de alta afinidad que neutraliza al factor utilizado en la terapia de reemplazo. El 30% de los pacientes como hemofilia A severa desarrolla inhibidores y se considera un evento multifactorial, asociado al tipo de mutación causante de la hemofilia, polimorfismos en locus HLA y otros genes inmunoreguladores y etnia. El desarrollo de inhibidores en pacientes con hemofilia B, es menos frecuente, aproximadamente únicamente el 4-5% de estos pacientes desarrollan inhibidores en algún momento de sus vidas(15,17).

El tratamiento de pacientes con inhibidores se debe dirigir en dos direcciones: controlar los sangrados, para esto se utilizan agentes “bypass” como FEIBA (concentrado de factores II, VII, IX y X activados) y controlar la respuesta inmune por medio de la inmutolerancia. La inmutolerancia consiste en la aplicación constante de infusiones de factor por largos periodos de tiempo para buscar erradicar la presencia de inhibidores, sin embargo es altamente costosa (15,17).

Así mismo, las opciones terapéuticas para los pacientes hemofílicos han evolucionado rápidamente en los últimos años, desde concentrados de factor con vidas medias extendidas hasta nuevos agentes hemostáticos que se administran de manera subcutánea, dentro de estos últimos se encuentra un anticuerpo monoclonal que mimetiza el efecto del FVIII uniendo al FIXa y FXa, así como un ARN sintético que regula la antitrombina y un anticuerpo monoclonal dirigido contra el inhibidor del factor tisular. Así mismo, ya se han reportado casos exitosos de terapia génica tanto para hemofilia A como para hemofilia B (18).

Enfermedad de von Willebrand (VWD)

La enfermedad de von Willebrand es el desorden de sangrado hereditario más frecuente, con una prevalencia de entre 0.1-1%. Fue descrito por primera vez por Erik von Willebrand en una familia escandinava en 1926; la VWD afecta a individuos de ambos géneros de todas las razas (19).

El gen del factor von Willebrand está localizado en el cromosoma 12 en el locus 12p13.3, comprende 178kb y contiene 52 exones. La enfermedad de von Willebrand se caracteriza por una gran heterogeneidad, se clasifica de acuerdo al tipo de defecto, ya sea cuantitativo parcial o total (tipo 1 y 3 respectivamente) o cualitativo (tipo 2). El tipo 2 se subdivide en 2A, 2B, 2N o 2M según la alteración que se presente. Usualmente, en la enfermedad de von Willebrand se presenta una disminución del FVIII por la deficiencia del factor von Willebrand, pero en el tipo 2N se debe a mutaciones que alteran el sitio de unión entre ambas proteínas. La transmisión de la enfermedad es autosómica dominante pero el tipo 3N es autosómica recesiva, por lo que, aunque se trata de una forma más severa, es menos frecuente (16).

- **Hallazgos clínicos:** la severidad de los sangrados es variable, las mujeres suelen verse más afectadas, se presentan principalmente sangrados mucocutáneos, epistaxis y menorragias, sangrados postraumáticos o postcirugías, la hemartrosis y sangrados en tejidos blandos son poco frecuentes, excepto en el tipo 3 (20).
- **Hallazgos de laboratorio:** los hallazgos de laboratorio son muy variables. Los pacientes pueden presentar un tiempo de sangrado y TTP prolongado, así como agregación plaquetaria con ristocetina anormal. El conteo de plaquetas, el TP, el TT y la agregación plaquetaria con otros agonistas se encuentran normales. El diagnóstico y la clasificación definitiva requiere de diversos ensayos para evaluar no

sólo los niveles de factor sino su capacidad de unirse a los diferentes ligandos. Dentro de las pruebas especializadas se encuentran cuantificación de FVIII y factor von Willebrand, prueba de funcionalidad del factor von Willebrand con ristocetina y el estudio de multímeros (20).

Se puede realizar diagnóstico molecular, sin embargo su importancia es inversamente proporcional al número y calidad de pruebas fenotípicas que se realicen. Si se utilizan todos los ensayos disponibles, la identificación de los defectos moleculares, solo confirma el fenotipo del paciente (19).

- **Tratamiento:** el tratamiento incluye terapias complementarias, como ácido tranexámico y terapias que aumentan directamente los niveles de VWF, como desmopresina y concentrados de VWF (21).

Deficiencias raras de la coagulación

Las deficiencias raras de la coagulación constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades donde se incluyen las deficiencias de fibrinógeno, protrombina y los factores V, V y VIII combinada, VII, X, XI y XIII. Usualmente son desórdenes que se transmiten de manera autosómica recesiva y su prevalencia en la población general varía desde 1 caso por cada 500 000 en la deficiencia de FVII, hasta 1 caso cada 2 000 000 para el FXIII, pero esto puede aumentar en zonas con alta consanguinidad. Los pacientes con estas deficiencias presentan un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde sangrados mucocutáneos hasta sangrados en el sistema nervioso central, aunque en menor frecuencia. El tratamiento se basa en el reemplazo del factor deficiente, ya sea por derivados de concentrados plasmáticos o por productos recombinantes (22,23).

Las pruebas de tamizaje de coagulación, TTP, TP y TT, son la base para el diagnóstico, corroborándose con la cuantificación del factor deficiente. El estudio subsecuente de mutaciones puede permitir confirmar el diagnóstico y facilitar el estudio familiar (22,24).

CAPÍTULO III: TROMBOFILIAS HEREDITARIAS

Así como, deficiencias en las proteínas plaquetarias o en los factores de coagulación conllevan a problemas de sangrado, un exceso en estos factores o bien, deficiencias en los inhibidores del proceso de coagulación pueden ocasionar un estado de hipercoagulabilidad. Los estados de hipercoagulabilidad se pueden dividir en tres categorías: desórdenes heredados, desórdenes adquiridos y mixtos. Los desórdenes heredados, conocidos como trombofilias, pueden por lo tanto deberse a pérdida en la función de alguna de las vías de anticoagulantes naturales o por un aumento en la función de las proteínas procoagulantes (20)

Las causas más frecuentes de las trombofilias heredadas son el factor V Leiden y la mutación G20210A en el gen de protrombina, estas mutaciones en conjunto representan entre el 50-70% de las trombofilias hereditarias diagnosticadas. Las deficiencias de antitrombina, proteína C (PC) y proteínas S (PS), son responsables de la mayoría de los casos restantes, que, aunque son menos frecuentes, se consideran más severas (25).

Otras alteraciones que se han visto asociadas a trombosis son el aumento en los niveles de factor VIII, disfibrinogenemia, variantes en el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI), aumentos en los niveles del inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina e hiperhomocitemia. Recientemente se han identificado nuevos defectos asociados a las trombofilias hereditarias, entre ellos la pseudohomocigocidad para la resistencia a la proteína C activada, factor IX Padua y resistencia a la antitrombina (25).

Deficiencia de Antitrombina

La antitrombina, un inhibidor miembro de la superfamilia de las serin proteasas sintetizadas en el hígado, regula la coagulación formando complejos covalentes con la trombina, factor X y otros procoagulantes activados como factor XIIa, XIa, IXa y VIIa. La heparina acelera la tasa de interacción con estas proteasas blanco. En la población general, la prevalencia

estimada va desde 5 a 17 por 10 000 individuos y en pacientes con tromboembolismo venoso (VTE) es de 1% (26).

Se han descrito más de 250 variaciones causantes de la deficiencia de antitrombina, incluyendo mutaciones de cambio de sentido, sin sentido, deleciones e inserciones. Las deficiencias de antitrombina se pueden categorizar en dos tipos, ambas heredadas de manera autosómica dominante. La deficiencia de antitrombina tipo I se debe a una producción o secreción disminuida de la proteína, en estos casos tanto la actividad como los niveles antigénicos se encuentran disminuidos. El tipo II se debe a defectos en la función de la proteína, los niveles de actividad se encuentran disminuidos pero no así los antigénicos (26).

Se han descrito casos homocigotos de deficiencia de antitrombina únicamente por alteraciones que afectan el sitio de unión con la heparina, se cree que la homocigosis en los otros tipos de deficiencia es incompatible con la vida. La deficiencia de antitrombina se ha asociado con un riesgo hasta 5 veces mayor de desarrollar trombosis venosa profunda (25,26)

Deficiencia de Proteína C

La proteína C es un anticoagulante natural que se activa con la generación de trombina, este proceso se acelera por el complejo formado por la trombina, el receptor endotelial de proteína C y la trombomodulina. La proteína C inactiva al factor Va a través de un corte inicial en el residuo de Arg506 del mismo, el cual es necesario para la exposición de otros dos sitios de corte, Arg306 y Arg679 (26).

La deficiencia de proteína C se hereda de manera autosómica dominante y se ha encontrado de manera heterocigota en 14-50 por cada 10 000 individuos en la población general y hasta en el 3% de los pacientes con VTE (26).

A diferencia de la deficiencia de antitrombina, la homocigosis o doble heterocigosis no es incompatible con la vida pero se ha asociado a púrpura fulminante en recién nacidos, una

enfermedad caracterizada por trombosis severa en vasos pequeños, que da como resultado necrosis isquémica cutánea o subcutánea (26).

La deficiencia de proteína C, también puede dividirse en dos subtipos. El tipo I es el más frecuente y se caracteriza por una reducción simultánea de los niveles antigénicos y de actividad, reflejo de una producción disminuida de la proteína funcional. El tipo II es raro, se caracteriza por niveles antigénicos normales con una actividad disminuida debido a una alteración cualitativa de la proteína. Se han descrito hasta 200 mutaciones diferentes causantes de la deficiencia de proteína C. En el tipo I la mayoría son mutaciones sin sentido o cambio de sentido que llevan a que la proteína se trunque prematuramente o a que se afecte su plegamiento, las deleciones o inserciones son raras. El tipo II se debe principalmente a mutaciones de cambio de sentido localizadas principalmente en los dominios γ -carboxyglutamic y de proteasa (25,26).

Deficiencia de Proteína S

La proteína S actúa como un cofactor de la proteína C activada, aumentando la capacidad de inactivar los factores Va y VIIIa. Aproximadamente el 60% de la proteína S se une a la proteína de complemento C4b, y sólo el 40% restante es funcional. Adicionalmente, la proteína S actúa como un cofactor del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) en la inhibición del factor X. La proteína S y el TFPI circulan a nivel plasmático en forma de complejo, por lo que pacientes con deficiencia de proteína S podrían presentar niveles disminuidos de TFPI (26).

En la población general, la deficiencia de proteína S tiene una prevalencia de 10 en 10 000 individuos, mientras que se encuentra hasta en un 2% de los pacientes con VTE. Se han identificado tres subtipos de deficiencia de proteína, la tipo I (niveles de antígeno y de actividad disminuidos), tipo II (niveles normales de antígeno pero actividad disminuida) y la tipo III (nivel de antígeno total normal pero la cantidad de antígeno libre y su actividad disminuida). Se han identificado hasta 200 mutaciones diferentes asociadas a esta

deficiencia, la mayoría de las mutaciones son de cambio de sentido o deleciones o inserciones pequeñas, deleciones o inserciones grandes se encuentran sólo en el 4% de los pacientes. El 95% de los casos de deficiencia de proteína S son del tipo I o III, las mutaciones en estos casos se encuentran distribuidos a lo largo de todo el gen. En algunas ocasiones en el tipo III no se encuentra mutación, se cree que estos casos podrían deberse a variaciones en otros genes como por ejemplo la proteína de unión C4b (*C4BPA*). La mutación *PROSI* Ser460Pro se encuentra frecuentemente en la deficiencia tipo III sin representar un aumento en el riesgo de trombosis, algunos estudios reportan que otras mutaciones pueden estar presentes sin significar una predisposición a VTE. Las mutaciones en el tipo II afectan principalmente los dominios de ácido γ -carboxyglutámico y del factor de crecimiento epidérmico 4, necesarios para la función de cofactor de la proteína S (26).

FV Leiden

El factor V Leiden (FVL) es un desorden autosómico dominante relacionado con una mutación de cambio de sentido en el gen del factor V en G1691A, esto ocasiona una substitución de una glutamina por una arginina en la posición 506 (R506Q). Este cambio le confiere al factor V una resistencia a la inactivación por la proteína C activada. Se han identificado otras mutaciones asociadas a la resistencia de la proteína C activada tales como Arg306→Thr (FV Cambridge), Arg306→Gly (FV HongKong), Ile359→Thr (FV Liverpool), Glu666→Asp (mecanismo desconocido), y Ala512→Val (FV Bonn), sin embargo el FVL es el responsable del 95% de los casos. La alteración en H1299R, conocida como FVR2 ocasiona una reducción de la actividad de cofactor de la proteína C activada y puede producir una resistencia a la proteína C activada leve, con un menor riesgo trombótico que FVL (25).

El FVL es la causa hereditaria más común que predispone al VTE, la mutación en heterocigocis aumenta el riesgo anual de trombosis de 1 en 1000 a 3-8 en 1000, mientras que en estado homocigoto puede aumentarlo hasta 80 en 1000. La prevalencia de FVL en heterocigocis es de 5% en la población general mientras que de 18% en los pacientes con

VTE, en estado homocigota se encuentra en aproximadamente en 10 en 10 000 individuos sanos pero en el 1% de los pacientes con VTE (25,26).

Se han reportado casos de pacientes con FVL heterocigotas que presentan adicionalmente alguna mutación heterocigota que ocasiona deficiencia de factor V, estos pacientes presentan niveles de factor 5 del 50% pero todos con FVL, a esta condición se le ha llamado pseudo-homocigosis de FVL. Estos pacientes presentan una resistencia severa a la proteína C activada y una mayor tendencia a desarrollar trombosis que los pacientes con únicamente FVL. A nivel de laboratorio se observan niveles de resistencia a la proteína C activada que no coinciden con un FVL heterocigoto (25).

Protrombina G20210A

La variante en protrombina (PT) G20210A ocasiona una disminución en el corte del extremo 3' del factor II, lo que conlleva a una acumulación de ARN y por lo tanto un aumento en la síntesis de protrombina. Esta mutación puede producir un aumento en los niveles de protrombina de hasta un 30% en heterocigotas y de 70% en homocigotas, sin embargo, en algunas ocasiones la alteración no se asocia a un aumento en los niveles de protrombina y viceversa. No todos los aumentos de protrombina se deben a esta alteración. PT G202210A predispone a un riesgo aumentado de VTE ya sea por promover la generación de trombina o por inhibir la inactivación por parte de la proteína C, una forma indirecta de la resistencia a la proteína C activada (25).

CAPÍTULO IV: NGS COMO ALTERNATIVA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS DESÓRDENES DE SANGRADO

El diagnóstico de los desórdenes de sangrado en general puede ser difícil debido a una gran cantidad de razones, entre ellas la falta de un completo entendimiento de las características genéticas, clínicas y de laboratorio, en parte debido a la heterogeneidad de la información disponible y su baja prevalencia. La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis (ISTH) actualmente estableció diferentes grados de severidad de los sangrados según los niveles de actividad de los factores involucrados, a pesar de que, en la mayoría de las patologías, no se ha establecido una relación clara entre el fenotipo a nivel de laboratorio y los síntomas (27).

El diagnóstico molecular para los desórdenes de sangrado es importante por diferentes aspectos. Sin las pruebas genéticas, en algunos casos es difícil establecer la causa de sangrado, ya que diferentes variantes pueden ocasionar un fenotipo similar. El diagnóstico molecular permite a los clínicos personalizar el manejo clínico de los pacientes y discutir con ellos su pronóstico. Entender el patrón de herencia permite realizar estudios familiares y brindar asesoría genética. En algunas patologías, es importante para informar a los pacientes de condiciones no hematológicas, como por ejemplo los pacientes con el síndrome Hermansky-Pudlack, ocasionado por anomalías en *HPS1* y *HPS4*, que requieren un monitoreo a nivel pulmonar. Igualmente, los desórdenes plaquetarios relacionados con *MYH9* tienen un mayor riesgo de desarrollar nefritis y las alteraciones por *RUNX1* están asociadas con el desarrollo de leucemia mieloide aguda (6).

A pesar de la importancia de las pruebas moleculares en el diagnóstico de los desórdenes de sangrado, estas no siempre se realizan debido al gran tamaño y complejidad genómica de los genes involucrados, así como la heterogeneidad de las mutaciones que subyacen estos desórdenes. Además, el patrón de herencia es también heterogéneo: la hemofilia A y B son ligadas al cromosoma X mientras que las enfermedades de sangrado raras son autosómicas recesivas, muchas veces debido a una doble heterogeneidad, adicionalmente, en algunos

casos, una mutación específica puede ejercer un efecto negativo dominante sobre otra mutación (27)

Clásicamente, el diagnóstico genético de este grupo de desórdenes se basa en secuenciación por Sanger de los genes candidatos. Sin embargo, debido a la gran cantidad de exones que generalmente se encuentran involucrados, esta estrategia consume una gran cantidad de tiempo y de dinero. Actualmente, las pruebas genéticas de alto rendimiento como la secuenciación de nueva generación han revolucionado las tecnologías de secuenciación de ADN ya que permiten la investigación rápida de múltiples genes a un costo cada vez más accesible (27).

Secuenciación de Nueva Generación

La secuenciación de nueva generación (NGS) es una tecnología que secuencia millones de fragmentos de ADN de manera paralela. Se utilizan análisis bioinformáticos para unir estos fragmentos mapeando las lecturas individuales en genomas de referencia. Cada base es secuenciada múltiples veces, el número de veces que sea secuenciada determina la profundidad y por lo tanto la veracidad de los resultados. NGS puede utilizarse para secuenciar genomas enteros o concentrarse en áreas específicas de interés, incluyendo los 22 000 genes codificantes (el exoma completo) o números menores de genes (28).

Se han desarrollado diferentes plataformas de NGS que se pueden clasificar en base a la longitud media de lectura (larga o corta); al modo de secuenciación (de extremo único o de ambos extremos) y la tecnología de secuenciación empleada (por ligación, hibridación o síntesis). Debido a que la tecnología de secuenciación depende de la plataforma y del sistema elegido, se deben de tomar diferentes aspectos a la hora de diseñar la prueba, entre ellos el tipo de alteración que se desea detectar, el tamaño de la región a secuenciar, la profundidad de la cobertura requerida, el volumen de muestras previsto, los tiempos de proceso requeridos y los costos. Las principales plataformas de secuenciación masiva utilizadas para los laboratorios de diagnóstico clínico son la plataforma de Illumina y de Ion Torrent (29).

- Plataforma Illumina: las plataformas de Illumina dominan la industria de secuenciación masiva de lectura corta debido a su madurez como tecnología, la amplia gama de equipos disponibles y el alto nivel de compatibilidad entre ellos. La gama de equipos disponibles varía desde el MiniSeq de bajo rendimiento hasta el HiSeq de ultrarendimiento (29).

Las plataformas de Illumina se basan en la secuenciación por síntesis mediante terminación reversible cíclica donde se emplean nucleótidos terminadores de cadena marcados con moléculas fluorescentes, al igual que en la secuenciación de Sanger, pero con la diferencia de que, tras la obtención de imagen, se elimina el nucleótido y continúa la secuenciación. En esta tecnología, el primer paso consiste en la fragmentación del ADN y la ligación de los adaptadores e índices; los adaptadores permiten la hibridación de las moléculas que se desean secuenciar a la superficie de la celda, mientras que los índices permiten la identificación de cada muestra dentro de un grupo de muestras. Tras la ligación, se da un paso de amplificación sobre la superficie de la celda donde se realiza la reacción de secuenciación. El equipo utilizado capta la fluorescencia emitida durante la síntesis de ADN en forma de imágenes a través de canales ópticos situados en cámaras LED (29).

En general la plataforma Illumina tiene una tasa de precisión global mayor a 99.5%, esto implica una tasa de errores baja. La mayoría de errores están relacionados con la posición en la lectura, la mayoría se acumula al final de los amplicones y son recurrentes inter- e intra-experimento. La plataforma muestra cierta sobrerrepresentación de errores de sustitución en regiones ricas en AT y GC. Sin embargo, esta tecnología es mucho menos susceptible a los errores en las regiones de homopolímeros observados en las plataformas de secuenciación por adición de un solo nucleótido (29).

Las plataformas de Illumina permiten llevar a cabo una amplia gama de aplicaciones: secuenciación de genes mediante paneles de amplicones y de captura, secuenciación del genoma a través de secuenciación (Whole Genome Sequencing y Whole Exome Sequencing), análisis epigenómicos, secuenciación de metilación de ADN y análisis de transcriptomas (29).

- Plataforma Ion Torrent: la plataforma Ion Torrent permite secuenciar longitudes de lectura superiores a la de otros secuenciadores de lectura corta, con un tamaño de lectura promedio de hasta 400pb, proporcionando algunas ventajas para aplicaciones que se centran en un ADN repetitivo o complejo (29).

La plataforma se basa en la secuenciación por síntesis mediante la adición de un solo tipo de nucleótidos y registra los cambios en la concentración de protones producidos durante la incorporación de dNTPs en la síntesis de ADN; esta señal de pH se transforma en digital mediante un chip semiconductor. El cambio en el pH es detectado por un sensor micropHmetro; la intensidad es proporcional al número de nucleótidos incorporados, aunque tiene una precisión limitada en la medición de longitudes de homopolímeros (29).

La tasa de error global es similar a la de otras plataformas de NGS en regiones no homopolimerizadas; sin embargo, al ser una plataforma basada en adición de nucleótidos, se han detectado más errores de secuenciación en la lectura de inserciones o deleciones, siendo más frecuentes para las inserciones. Las regiones de homopolímeros son muy problemáticas para estas plataformas, carecen de precisión de una sola base en las regiones repetitivas mayores de 6-8pb (29).

La plataforma Ion Torrent ofrece diferentes tipos de chips e instrumentos para ajustar el rendimiento del secuenciador a las necesidades del investigador. El rendimiento de estos chips oscila entre -50Mb y 15Gb, con tiempos de ejecución de la secuenciación de entre 2 y 7 horas, lo que la convierte en la más rápida de las plataformas actuales. Esto hace que el dispositivo sea adecuado para la secuenciación de grupos de genes incluyendo el perfil de transcriptoma y la identificación de sitios de splicing. Ion Torrent cuenta con instrumentos de dos capacidades: el Ion Personal Genome Machine y el Ion S5. Cuando se combinan con la preparación de librerías Ion Chef y el dispositivo de carga de chips, se convierten en plataformas muy sencillas de operar (29).

Diseño de paneles de NGS

- Estrategia del diseño: la secuenciación masiva dirigida permite estudiar un grupo de genes o regiones de interés. Existen diferentes métodos para la preparación de librerías de paneles de genes de secuenciación dirigida, por lo que para la elección del panel a utilizar se deben de tomar diversos aspectos: la plataforma de secuenciación dirigida, el tamaño del panel de genes, el tiempo de respuesta requerido y los costos. Existen dos estrategias principales para la preparación de librerías en secuenciación dirigida: amplicones y captura por hibridación (29).

Los paneles de amplicones se basan en la amplificación por PCR de las regiones de interés mediante primers específicos. Primero se generan los amplicones mediante amplificación por PCR, después se realiza una ligación en los extremos de cada amplicón con un índice específico de cada muestra, y un adaptador compatible con la plataforma de secuenciación utilizada (29).

Los paneles de captura por hibridación se basan en el enriquecimiento del ADN mediante captura con sondas específicas. Estos protocolos se dividen en tres etapas: fragmentación del ADN (mecánica o enzimática), generación y amplificación de las librerías mediante la ligación de los índices y adaptadores y el enriquecimiento de la librería en las regiones de interés mediante hibridación y captura con sondas complementarias (29).

- Diseños comerciales vrs personalizados: al de realizar una secuenciación se puede elegir entre utilizar un panel comercial o realizar un diseño personalizado. La ventaja de los paneles comerciales es que no requieren una etapa de diseño previo y están optimizados, aunque requieren un proceso de comprobación o validación en cada laboratorio. Los paneles personalizados requieren, un trabajo de selección de genes y de los primers correspondientes y requieren de un proceso largo de optimización y validación del diseño que puede tardar incluso varios meses. Sin embargo, estos últimos tienen la ventaja de ofrecer una gran flexibilidad, se pueden incluir las

regiones que uno desee y se pueden modificar a lo largo del tiempo según las necesidades que se vayan presentando (29).

En términos generales, el proceso secuenciación por NGS (extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación, análisis de resultados y elaboración de informes) puede tardar varios días (una semana aproximadamente) pero la frecuencia de montaje va a depender del panel elegido. La elección del diseño de panel va a determinar el número de muestras necesarias para realizar cada secuenciación así como el costo y por lo tanto la capacidad y tiempo de respuesta del laboratorio.

Uso de NGS en los desórdenes de sangrado

La tecnología de NGS es cada vez más accesible para laboratorios diagnósticos y se ha empezado a utilizar para el análisis genético de los trastornos hemorrágicos. Gracias a los avances y el mayor uso de estas tecnologías es posible secuenciar las regiones codificantes o grupos de genes a un costo mucho menor (6,30).

El uso de NGS para investigación en desórdenes de sangrado ha permitido el descubrimiento de múltiples genes como *NBEAL2*, *RBM8A*, *ACTN1*, *SRC* y *DIAPH1* y la identificación de más genes responsables del síndrome de Hermansky-Pudlak (6).

Actualmente se han realizado varios estudios para el uso de estas plataformas para el diagnóstico de diferentes trastornos hemorrágicos (6).

El proyecto de genotipo y fenotipo de desórdenes de plaquetas del Reino Unido (UK-GAPP) realizó un estudio con un panel de 216 genes asociados a desórdenes plaquetarios. Este panel fue probado inicialmente con 10 pacientes con diferentes desórdenes plaquetarios y se obtuvieron 4500 variantes de un nucleótido simple (SNVs) en los genes candidatos. Luego de una estrategia de filtrado que tomaba en cuenta la posición de los SNVs, la

frecuencia en la población general (según bases de datos) y el estudio con programas bioinformáticos, se logró reducir a 10 SNVs posiblemente patogénicos (7).

Leo *et al* realizaron un estudio de secuenciación del exoma en 18 casos de pacientes no relacionados entre ellos con desórdenes plaquetarios hereditarios, donde concentraron el análisis en 329 genes que regulan el tamaño, el número y la función plaquetaria. Por medio de algoritmos predictivos computacionales evaluaron la patogenicidad potencial de los genes involucrados. Se identificaron 63 posibles defectos, en 40 genes diferentes. La ventaja de este enfoque es que se obtiene información de todos los genes expresados en las células humanas, la desventaja es que no se analizan ni regiones intrónicas ni regulatorias que podrían estar involucradas (31).

Un grupo español diseñó una plataforma con 71 genes involucrados en desórdenes plaquetarios. Este estudio les permitió identificar una variante nueva en un caso de Wiskott-Aldrich. Otro grupo, con este mismo panel identificó nuevas variantes en el gen *RASGRP2* (32).

Bastida *et al*, diseñaron un panel con enriquecimiento por captura de 31 genes involucrados en coagulación, todos sus exones y las regiones flaqueantes. Analizaron 20 pacientes con un desorden hereditario de la coagulación. En todos los pacientes, se identificó la variante causante de la patología, se identificaron 21 variantes patogénicas, todas SNVs. Seis de estas eran variantes nuevas que afectaban los *F8*, *F9*, *F10*, *F11* y *VWF* y 15 variantes se habían detectado previamente. Los resultados se confirmaron con Sanger y se obtuvo un 100% de concordancia (27).

Dado que tradicionalmente, en el 5% de los pacientes con hemofilia, no se logra identificar la variante genética, un grupo alemán desarrolló una plataforma específica para el gen *F8* para tratar de identificar variantes intrónicas profundas. Se analizaron 15 casos de pacientes con hemofilia A sin ninguna variante identificada en regiones codificantes, se encontraron 23 variantes intrónicas en diferentes intrones del *F8*, 6 fueron variantes recurrentes y 3 se

habían descrito previamente. Adicionalmente, se identificó un paciente con una delección de 9.2kb en el intron 1. Luego del análisis in silico de las variantes se logró identificar una probablemente patogénica en cada uno de los 15 pacientes (33).

Un grupo en el Reino Unido diseñó un panel de NGS denominado ThromboGenomics: La plataforma versión 3.0 analiza 78 genes con un papel confirmado en desórdenes de sangrado o trombofilias, incluyendo genes involucrados en las diferentes vías de la coagulación y la formación, morfología y función plaquetaria. Al seleccionar únicamente genes con un rol conocido en trastornos hereditarios plaquetarios, defectos de coagulación y desórdenes trombóticos, esta plataforma ha adquirido una gran relevancia clínica. A la fecha se han analizado 1450 muestras con esta plataforma, se ha identificado una variante en el 60% de los casos con sospecha de un desorden de coagulación y en el 52% de los casos con sospecha de un desorden plaquetario. Se considera que los casos en los que no se encuentra una variante se debe a un mal uso de la herramienta, debido a la falta de un exhaustivo estudio clínico y falta de pruebas de laboratorio de tamizaje. (5).

Adicionalmente, esta plataforma ha demostrado tener una alta capacidad para detectar variaciones en el número de copias (CNVs), a la fecha se han identificado 26 CNVs patogénicas, 14 de ellas en *VWF*, tanto en algunos exones como del gen completo. Se identificaron 2 duplicaciones en el gen *PLAU* en dos pacientes no relacionados entre ellos con el desorden de Quebec (5).

Una limitación de las plataformas de NGS que se debe de tomar en consideración, especialmente en los pacientes en los que no se logra identificar una variante, es a poca aplicabilidad de estas técnicas para la detección de anormalidades genéticas de mayor tamaño, como inversiones grandes. Estas anormalidades tampoco se detectan por secuenciación de Sanger, y se requieren métodos especializados para buscar alteraciones específicas como las inversión de intron 1 y 22 en el gen de *F8* (5).

Aunque los costos iniciales de estas plataformas son altos, el tiempo de respuesta y el costo es menor si se compara con la secuenciación por Sanger. Los reportes de grupos que han utilizado NGS para los diferentes trastornos de sangrado reportan que estas plataformas han resultado ser precisas, reproducibles y confiables, con la ventaja de que se obtienen resultados en un tiempo menor que por métodos tradicionales (9,27).

CONCLUSIONES

Después de un daño en la pared vascular, la hemostasia se logra a través de dos procesos: activación de plaquetas seguida de su adhesión y agregación y formación de una red de fibrina por los factores de coagulación. Subsecuentemente, los factores de coagulación también están involucrados en la lisis del coágulo, la cual es una parte importante del proceso hemostático necesaria para la regeneración (1,2).

Tras un daño vascular, se requiere una respuesta rápida y eficiente para detener el sangrado, sin embargo, esta respuesta debe de ser estrictamente controlada para evitar la formación excesiva de trombos. Un desbalance en cualquiera de estos sistemas puede provocar hemorragias o trombosis (1,2)

Los desórdenes de sangrado pueden deberse, por lo tanto, a deficiencias en los factores de coagulación (87%), a desórdenes plaquetarios (3%) o a defectos en el sistema fibrinolítico (3%). Son un grupo heterogéneo de desórdenes causados por variantes de ADN en un gran número de loci (5,6).

Los desórdenes de sangrado más comunes son, la enfermedad de von Willebrand, que afecta 1 de cada 1000 nacimientos, y la hemofilia que afecta a 1 de cada 5000 hombres (5).

Las deficiencias restantes de factores de coagulación se consideran desórdenes de sangrados raros, dentro de ellos se incluyen las deficiencias de fibrinógeno, factor II, FV, deficiencia combinada de FV y FVIII y la deficiencia congénita de factores dependientes de vitamina K. Los desórdenes de sangrados raros tienen incidencias variables que van desde 1 en 500 000 para la deficiencia de FVII a 1 en 2-3 millones para deficiencias de protrombina y FXIII. Las frecuencias varían en las diferentes poblaciones con un aumento en los casos donde la endogamia y la consanguinidad son frecuentes (5,6).

Los desórdenes de plaquetas pueden deberse a anomalías en la cantidad, en la función o a ambos. A nivel molecular pueden deberse a defectos en las proteínas de membrana,

proteínas citoplasmáticas, el contenido de sus gránulos o a proteínas que regulan la transcripción y regulación (5,6).

La mayoría de estos desórdenes están asociados a alteraciones en pruebas de laboratorio, sin embargo, muchas de estas están disponibles únicamente en laboratorios especializados de coagulación. Generalmente estas pruebas son suficientes para identificar las deficiencias en los factores de coagulación, pero no así para los defectos plaquetarios, los cuales terminan siendo clasificados como desórdenes plaquetarios no especificados, esto dificulta el tratamiento y la prevención de secuelas hematológicas y no hematológicas. Así mismo, hay pacientes cuyas alteraciones no presentan ninguna alteración a nivel de laboratorio, por exclusión estos pacientes se clasifican como tendencia a sangrados no especificada (5,6).

El diagnóstico molecular puede ayudar a realizar un diagnóstico definitivo y es importante por diversas razones, diferentes variantes genéticas pueden causar un fenotipo similar y sólo el análisis genético permite distinguirlas, permite al clínico conocer el pronóstico del paciente y realizar un mejor manejo clínico, permite realizar el estudio familiar y conocer si se deben de realizar estudios no hematológicos asociados (5,6).

Tradicionalmente el análisis genético, utilizado principalmente para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y hemofilia, ha consistido en el análisis de todos los exones del gen en cuestión, las regiones intrónicas flaqueantes y las regiones UTR 5' y 3' por secuenciación de Sanger, esto permite la identificación de las variantes en la gran mayoría de los pacientes. Sin embargo, este análisis es costoso y requiere mucho tiempo por lo que los genes se estudian secuencialmente y no de manera paralela, se pueden requerir incluso años para alcanzar un diagnóstico (5,6).

La secuenciación de nueva generación (NGS) permite la secuenciación paralela de muchos genes al mismo tiempo por lo que permite realizar paneles para estudiar grupos de desórdenes. Gracias a los avances en esta tecnología y el mayor uso de estas es posible secuenciar las regiones codificantes o grupos de genes a un costo mucho menor La NGS

actualmente se encuentra disponible para los laboratorios diagnósticos y se ha empezado a utilizar para el estudio genético de desórdenes de sangrados. (5,6).

El uso de NGS en desórdenes hemostáticos ha sido útil no sólo para la identificación de variantes en pacientes que no contaban con un diagnóstico si no que ha permitido también el descubrimiento de múltiples genes causantes de estos desórdenes y la identificación de más genes como los responsables de algunos de estos síndromes (5).

Los estudios de NGS en pacientes con sangrados han demostrado la importancia del diagnóstico molecular en el manejo clínico de los pacientes y para la consejería genética, principalmente en genes relacionados con procesos de sangrados que se han asociado a un mayor riesgo de malignidades hematológicas. Sin embargo, la adecuada interpretación de los resultados obtenidos por estas tecnologías requiere de equipos multidisciplinarios y la constante verificación de los hallazgos científicos en otros grupos de investigación (5).

REFERENCIAS

1. Weitz JCF and JI. Overview of hemostasis and thrombosis. En: Hematology_ Basic Principles and Practice 7th EditionPdf. 2018. p. 1831–42.
2. Hoffbrand V, Moss P. Chapter 24: Platelets, blood coagulation and haemostasis. In: Hoffbrand's Essential Haematology. 7th ed. 2015. p. 265–79.
3. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017;171(2):273–85.
4. Al-Huniti A, Kahr WH. Inherited Platelet Disorders: Diagnosis and Management. *Transfus Med Rev* . 2020;34(4):277–85.
5. 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*. 2019;134(23):2082–91.
6. Sivapalaratnam S, Collins J, Gomez K. Diagnosis of inherited bleeding disorders in the genomic era. 2017;(7):363–76.
7. Maclachlan A, Watson SP, Morgan N V. Inherited platelet disorders: Insight from platelet genomics using next-generation sequencing. *Platelets*. 2017;28(1):14–9.
8. Greinacher A, Eekels JJM. Simplifying the diagnosis of inherited platelet disorders? The new tools do not make it any easier. *Blood*. 2019;133(23):2478–83.
9. Carubbi C, Masselli E, Nouvenne A, Russo D, Galli D, Mirandola P, et al. Laboratory diagnostics of inherited platelet disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(8):1091–106.
10. Sandrock-Lang K, Wentzell R, Santoso S, Zieger B. Inherited platelet disorders. *Hamostaseologie*. 2016;36(3):178–86.
11. Paquita Nurden, 1 Simon Stritt 2 Remi Favier3 and Alan T. Nurden1\ . Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. *Haematologica*. 2021;106(2):337–50.
12. Mutreja D, Sharma RK, Purohit A, Aggarwal M SR. Evaluation of platelet surface glycoproteins in patients with Glanzmann thrombasthenia: Association with bleeding symptoms. *Indian J Med Res*. 2017;145(5):629–34.
13. Anna Lecchi1, Eti A. Femia2, Silvia Paoletta3, Arnaud Dupuis4 PO, Christian Gachet4, Kenneth A. Jacobson3, Katharina Machura5, Gian M. Podda2 B, Zieger5 and MC. Inherited dysfunctional platelet P2Y12 receptor mutations associated with bleeding disorders. *Hamostaseologie*. 2016;36(4):279–283.
14. Menegatti M, Peyvandi F. Treatment of rare factor deficiencies other than hemophilia. *Blood*. 2019;133(5):415–24.
15. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia : diagnosis , treatments , and its complications. *Lancet [Internet]*. 2016;6736(15):1–11.
16. Swystun LL, James P. Using genetic diagnostics in hemophilia and von Willebrand disease. *Hematology*. 2015;2015(1):152–9.
17. Giangrande PLF. Management of haemophilia. *Paediatr Child Heal (United Kingdom)*. 2015;25(8):350–3.
18. Mahlangu J, Cerquiera M, Srivastava A. Emerging therapies for haemophilia - Global perspective. *Haemophilia*. 2018;24:15–21.
19. Baronciani L, Goodeve A, Peyvandi F. Molecular diagnosis of von Willebrand

- disease. *Haemophilia*. 2017;23(2):188–97.
20. Hoffbrand V, Moss P. Chapter 26: Coagulation disorders. In: Hoffbrand's Essential. 2016. p. 291–301.
 21. Peyvandi F, Garagiola I, Biguzzi E. Advances in the treatment of bleeding disorders. *J Thromb Haemost*. 2016;14(11):2095–106.
 22. Franchini M, Marano G, Pupella S, Vaglio S, Masiello F, Veropalumbo E, et al. Rare congenital bleeding disorders. *Ann Transl Med*. 2018;6(17):331–331.
 23. Peyvandi F, Menegatti M, Palla R. Rare bleeding disorders: Worldwide efforts for classification, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39(6):579–84.
 24. Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: Diagnosis and treatment. *Blood*. 2015;125(13):2052–61.
 25. Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Rev Hematol*. 2019;12(3):147–58.
 26. Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(3):140–56.
 27. Bastida JM, del Rey M, Lozano ML, Sarasquete ME, Benito R, Fontecha ME, et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia*. 2016;22(4):590–7.
 28. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98(6):236–8.
 29. Palomo L. Guia de aplicacion clinica de la secuenciacion masiva en sindromes mielodisplasicos y leucemia mielomonocitica cronica. 017. p. 48–59.
 30. Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi SVV, Megy K, Bariana TK, et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood*. 2016;127(23):2791–803.
 31. Leo VC, Morgan N V., Bem D, Jones ML, Lowe GC, Lordkipanidzé M, et al. Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost*. 2015;13(4):643–50.
 32. Sivapalaratnam S, Collins J, Gomez K. Diagnosis of inherited bleeding disorders in the genomic era. *Br J Haematol*. 2017;179(3):363–76.
 33. Bach JE, Oldenburg J, Müller CR RS. Mutational spectrum and deep intronic variants in the factor VIII gene of haemophilia A patients. Identification by next generation sequencing. *Hamostaseologie*. 2016;8(36):S25–8.