



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Caracterización Funcional y Molecular de Nuevas
Variantes Genéticas y Desarrollo de una Nueva
Aproximación de Terapia Génica en Trastornos
Plaquetarios Congénitos

D^a Verónica Palma Barqueros

2021



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Caracterización funcional y molecular de nuevas variantes genéticas y desarrollo de una nueva aproximación de terapia génica en Trastornos Plaquetarios Congénitos

Functional and molecular characterization of new genetic variants and development of a new gene therapy approach in Congenital Platelet Disorders.

Verónica Palma Barqueros

Directores:

Dr. José Rivera Pozo

Dra. Elena Almarza Novoa

Tutor:

Dr. Vicente Vicente García

A mi abuelo Andrés

Resumen

Introducción: Los Trastornos plaquetarios congénitos [TPC] son un grupo heterogéneo de enfermedades raras que afectan al recuento de plaquetas o a sus funciones. Su severidad clínica es variable, desde complicaciones insignificantes a potencialmente mortales. Su diagnóstico genético se ha visto facilitado en los últimos años con la introducción de la secuenciación masiva. Por el contrario, no ha habido grandes avances en su manejo clínico.

Objetivo: Caracterizar una serie de pacientes con sospecha de padecer un TPC, identificar su patología molecular subyacente, y demostrar la patogenicidad de sus variantes moleculares. Adicionalmente, explorar el potencial de la terapia génica en los TPC clínicamente severos

Metodología: Reclutamos pacientes con diátesis hemorrágica, disfunción plaquetaria y/o trombocitopenia en el proyecto multicéntrico de “*Caracterización Funcional y Molecular de pacientes con TPC*”. Re-evaluamos su historial clínico y antecedentes familiares, estudiamos el fenotipo plaquetario, y abordamos el diagnóstico genético mediante secuenciación masiva de un panel de genes prediseñado. Se evaluó la patogenicidad de las variantes candidatas identificadas en los enfermos, aplicando los criterios de ACMG, y realizando ensayos específicos. Aplicando la tecnología CRISPR/Cas9, generamos un modelo de células CD34⁺ con fenotipo de Trombastenia de Glanzmann [TG] (*CD34⁺ TG-like*). Diseñamos un vector viral como potencial terapia génica para la TG.

Resultados: Hemos caracterizado funcional y molecularmente 50 pacientes de 14 familias no emparentadas. **i)** Demostramos que la diátesis hemorrágica en una niña está causada por la presencia en heterocigosis de la variante p.Asn143Ser en *PTGS1* (ciclooxigenasa -1). Se demostró un patrón de disfunción plaquetaria *aspirina-like*, con defecto de agregación plaquetaria selectivo para ácido araquidónico y reducida capacidad de síntesis plaquetaria de TXA₂. Estudios en plaquetas y en células 293THEK, demostraron que la mutación provoca la pérdida de un N-glicano generando una proteína hipoglicosilada con un efecto dominante negativo en la función. **ii)** Caracterizamos un pedigrí con macrotrombocitopenia tipo SRC-RT, con 7 portadores de la variante p.E527K en Src. Confirmamos un defecto de agregación, activación y secreción plaquetaria, más marcado, pero no exclusivo, para agonistas de GPVI; un defecto de marcadores α -granulares mediante inmunofluorescencia en frotis sanguíneos; también la ganancia de función de esta mutación causando fosforilación constitutiva en tirosinas de proteínas plaquetarias incluyendo Src, PLC γ 2 y BTK. Evidenciamos que en estos pacientes coexisten complicaciones de tipo inmune y neurológico. Su respuesta plaquetaria a la esplenectomía y los esteroides, así como el aparente estado inflamatorio en algunos de ellos, sugiere cierta similitud clínica con la trombocitopenia inmune [PTI]. **iii)** Describimos la serie más larga, descrita hasta la fecha, de pacientes con *TUBB1*-RT (9 familias), identificando en ellos 6 variantes en *TUBB1* (p.Cys12Leufs12*, p.Thr107Pro, p.Gln423*, p.Arg359Trp, p.Gly109Glu, and p.Gly269Asp). Se observó en ellas una penetrancia incompleta, con una mayoría de pacientes portadores con macrotrombocitopenia, otros sin trombocitopenia pero con plaquetas grandes y una minoría de portadores con plaquetas normales. Encontramos en un pedigrí, por primera vez en *TUBB1*-RT, que la mutación responsable, p.Gly109Glu, causa enfermedad solo en homocigosis, poniendo de manifiesto la importancia de la carga alélica. Los estudios plaquetarios (expresión de GPs, agregación, activación y secreción, *spreading*) demostraron un escaso efecto de estas mutaciones en la funcionalidad plaquetaria, acorde con la moderada o ausente clínica hemorrágica en pacientes con *TUBB1*-RT. La expresión de estas mutaciones (solo las *missense*) en células CHO demostró que afectan significativamente la expresión y localización de la tubulina- β 1. Los ensayos de cultivo *in vitro* de células CD34⁺ de los enfermos, demostraron que las mutaciones alteran la diferenciación/maduración de los Mks y la

formación de proplaquetas. Los datos obtenidos en esta serie de familias y mutaciones de *TUBB1*, nos ha permitido reclasificar la patogenicidad de las variantes identificadas y definir criterios de patogenicidad ACGM adaptados a mutaciones en *TUBB1*. **iv)** La caracterización del fenotipo plaquetario (agregación, activación, cuantificación de gránulos por microscopía electrónica e inmunofluorescencia), los estudios de segregación familiar y, de forma muy novedosa, el análisis del transcriptoma plaquetario, apoyan fuertemente la patogenicidad de las variantes de *RUNX1* p.Gln268* y p.Thr196Ala, pero no así de p.Asn159Ser. Hasta el 70% de los genes previamente descritos como diana de *RUNX1*, (incluyendo entre otros *MYL9*, *MYH9*, *ALOX12*, *TREML1* e *ITGA2*), mostraron en nuestro *microarray* una expresión alterada en los portadores de las variantes p.Gln268* y p.Thr196Ala, en comparación con controles sanos. Estos datos se confirmaron, para algunos genes, mediante RT-qPCR. En el caso de p.Asn159Ser solo el 7% de los genes mostraron expresión alterada. Clasificamos los 120 genes más infraexpresados en 5 grupos: genes implicados en el citoesqueleto (18%); genes que participan en la transducción de señales (40%); genes relacionados con la interacción con ADN; genes implicados en el ciclo celular; genes asociados, al menos ocasionalmente, con procesos tumorales. También, encontramos un gran número de genes sobreexpresados, siendo el primero *CA1*, el gen que codifica la anhidrasa carbónica I (*Fold change* 140.04 vs. controles). Entre los sobreexpresados, hay genes que codifican proteínas de origen eritroide, transportadores de membrana, proteínas ribosomales y otras implicadas en la síntesis, modificación y degradación de proteínas y *LXN*, gen que codifica la latexina que es una proteína reconocida recientemente como supresor tumoral en neoplasias hematológicas. **v)** Desarrollamos un modelo celular con fenotipo de TG en el que demostramos la eficacia de un vector viral para revertir el fenotipo patológico.

Conclusiones: Presentamos el diagnóstico clínico, funcional y molecular de un amplia número de pacientes con sospecha de TPC, caracterizando 11 variantes genéticas en 4 genes distintos. Reportamos el tercer caso de disfunción plaquetaria y sangrado asociado a patología molecular de *PTGS1*. Esta paciente revela la importancia de la N-glicosilación en la funcionalidad de la COX-1. Caracterizamos la cuarta familia con la mutación p.E527K y SRC-RT, que pone de manifiesto la coexistencia de alteraciones plaquetarias, inmunes y neurológicas en esta patología. La aparente parcial similitud con la PTI, podrían ayudar a establecer futuras estrategias de tratamiento. El estudio de la serie más larga descrita hasta la fecha de *TUBB1*-RT, revelan que la penetrancia incompleta es un fenómeno común en esta enfermedad, resalta la importancia de la carga alélica en la enfermedad, consolida el defecto de maduración de Mks, y el escaso efecto deletéreo de estas mutaciones en la reactividad plaquetaria, acorde con la moderada/ausente clínica hemorrágica en pacientes con *TUBB1*-RT. El análisis de transcriptoma plaquetario en tres casos con sospecha de *RUNX1*-RT, demuestran que puede ser una herramienta útil para establecer la patogenicidad de mutaciones nuevas de *RUNX1*, identificadas en pacientes con o sin historial familiar de neoplasia. Por último, demostramos la utilidad de la tecnología CRISPR/Cas9 para diseñar modelos de TPC, como la Trombastenia de Glanzmann. También mostramos la eficacia de un vector viral para revertir *in vitro* el fenotipo de la TG. Estos datos pre-clínicos son un importante avance en el camino hacia el potencial uso clínico de la terapia génica como alternativa curativa en TPC graves.

Abstract

Introduction: Inherited platelet disorders [IPD] are a heterogeneous group of rare diseases that affect the platelet count or its functions. The clinical severity is variable, from insignificant to life-threatening. Its genetic diagnosis has been facilitated in recent years with the introduction of high throughput sequencing [HTS]. On the contrary, there have not been major advances in the clinical management of IPD.

Objective: To characterize a series of patients with suspected TPC, identify the underlying molecular pathology, and demonstrate the pathogenicity of their molecular variants. Additionally, to explore the value of gene therapy in clinically severe IPD.

Methodology: We recruited patients with bleeding diathesis, platelet dysfunction and/or thrombocytopenia to the multicenter project of "*Functional and Molecular Characterization of patients with IPD*". We re-evaluate their clinical history and family background, studied the platelet phenotype, and addressed their genetic diagnosis by means of HTS of pre-designed panel of genes. The pathogenicity of the candidate variants identified in the patients was evaluated applying the ACMG criteria, and carrying out specific tests in patient samples and cell models. Using CRISPR/Cas9 technology, we generated a model of CD34+ cells of Glanzmann Thrombasthenia [GT] (*CD34+ GT-like*) phenotype. We designed a viral vector to correct the defect in the CD34+ GT-like cells.

Results: We have functionally and molecularly characterized 50 patients from 14 unrelated families. **i)** We show that the bleeding diathesis in a young girl is caused by the heterozygous presence of the p.Asn143Ser variant in *PTGS1* (cyclooxygenase -1 or COX-1). An aspirin-like platelet dysfunction pattern was demonstrated, with a selective platelet aggregation defect for arachidonic acid and a reduced platelet capacity for TXA₂ synthesis. Studies in platelets and 293 cells demonstrated that the mutation causes the loss of an N-glycan, generating a hypoglycosylated protein with a dominant negative effect on COX-1 function. **ii)** We characterize a large pedigree with SRC-RT macrothrombocytopenia, with 7 carriers of the p.E527K variant in *Src*. We confirmed a platelet aggregation, activation and secretion defect, more marked, but not exclusive, for GPVI agonists; we also found an α -granule markers defect by immunofluorescence of blood smears; the gain of function of this mutation caused constitutive tyrosine phosphorylation of platelet proteins including *Src*, *PLC β* and *Btk*. We show that in these patients coexist platelets, immune and neurological alterations. The platelet response to splenectomy and steroids, as well as the apparent inflammatory status in some of patients, suggested a certain clinical similarity to immune thrombocytopenia (ITP). **iii)** We describe the largest series, so far, of patients with *TUBB1*-RT (9 families), carrying 6 *TUBB1* variants (p.Cys12Leufs12 *, p.Thr107Pro, p.Gln423 *, p.Arg359Trp, p.Gly109Glu, and p.Gly269Asp). Incomplete penetrance was observed in these pedigrees, with most carriers presenting with macrothrombocytopenia, few others without thrombocytopenia but with large platelets, and a minority of carriers with normal platelets. We found in a pedigree, for the first time in *TUBB1*-RT, that the *TUBB1* mutation, p.Gly109Glu, causes disease only in homozygosity, highlighting the importance of allelic burden. Platelet studies (expression of GPs, aggregation, activation and secretion, spreading) showed little effect of these mutations on platelet function, consistently with the moderate or absent clinical hemorrhage in patients with *TUBB1*-RT. The expression of these mutations (only the *missense* ones) in CHO cells was shown to significantly affect the expression and localization of β 1-tubulin. *In vitro* culture of CD34+ cells from these patients demonstrated that the mutations alter the differentiation/maturation of Mks and proplatelets formation. The data obtained in this series of families and mutations of *TUBB1*, has allowed us to reclassify the pathogenicity of the identified variants and to define ACMG

pathogenicity criteria adapted to mutations in *TUBB1*. **iv)** Characterization of the platelet phenotype (aggregation, activation, granule quantification by electron microscopy and immunofluorescence), family segregation studies and, most notably, platelet transcriptome analysis, strongly support the pathogenicity of *RUNX1* variants p.Gln268* and p.Thr196Ala, but not that of p.Asn159Ser. Up to 70% of the genes previously described as *RUNX1* targets, (including among others *MYL9*, *MYH9*, *ALOX12*, *TREML1* and *ITGA2*), showed in our array a decreased expression in carriers of the p.Gln268* and p.Thr196Ala variants, compared to healthy controls. These data were confirmed, for some genes, by qPCR-RT. In the case of p.Asn159Ser, only 7% of the genes showed altered expression. We classified the 120 most downregulated genes into 5 groups: genes involved in the cytoskeleton (18%); genes involved in signal transduction (40%); genes related to interaction with DNA; genes involved in the cell cycle; genes associated, at least occasionally, with tumor processes. We also found a large number of overexpressed genes, the first being *CA1*, the gene that encodes carbonic anhydrase I. Among those overexpressed, there are genes that encode proteins of erythroid origin, membrane transporters, ribosomal proteins and others involved in the synthesis, modification and degradation of proteins. Also *LXN*, a gene that encodes latexin, a protein recently recognized as a tumor suppressor in hematological neoplasms. **v)** We developed a cell model with a TG phenotype in which we demonstrated the efficacy of our viral vector to reverse the pathological phenotype.

Conclusions: We present the clinical, functional and molecular diagnosis of a large number of patients with suspected IPD, characterizing 11 genetic variants in 4 different genes. We report the third case of platelet dysfunction and bleeding associated with molecular pathology of *PTGS1*. This patient reveals the importance of N-glycosylation in the function activity of COX-1. We also have characterized the fourth family with the p.E527K mutation and SRC-RT, which reveals the coexistence of platelet, immune and neurological alterations in this pathology. The apparent partial similarity with ITP could help to establish future treatment strategies. The study of the largest series described to date of *TUBB1*-RT, reveals that incomplete penetrance is a common phenomenon in this disease, highlights the importance of the allelic burden, consolidates the defect in Mks maturation and proplatelets formation caused by *TUBB1* mutations, and reflect an almost negligible effect of these mutations on platelet reactivity, consistent with the moderate or absent clinical bleeding in patients with *TUBB1*-RT. Platelet transcriptome analysis in three cases with suspected *RUNX1*-RT shows that it can be a useful tool to establish the pathogenicity of new *RUNX1* mutations, identified in patients with or without a personal or family history of neoplasia. Finally, we demonstrate the usefulness of CRISPR/Cas9 technology to design IPD models, such as Glanzmann's Thrombasthenia. We also show the efficacy of a viral vector to reverse the GT phenotype *in vitro*. These pre-clinical data represent an important step forward to the potential clinical use of gene therapy as a curative alternative in severe IPD.

Abreviaturas

AA	Acido araquidónico
AAV	Vector Adeno-Asociado
ACGM	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADA-SICD	Inmunodeficiencia Combinada Severa por déficit de adenosina desaminasa
ADP	Adenosín difosfato
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ARNgs	ARN guías
AT	Antitrombina
BSA	Suero de albúmina bovino
BTK	Tirosín quinasa de Bruton
CAI	Anhidrasa carbónica I
CAMT	Trombocitopenia amegacariocítica congénita
CAR-T cells	Células <i>Chimeric Antigen Receptor T-cell</i>
CGD	Enfermedad granulomatosa crónica
ClinGen	<i>Clinical Genoma Resource</i>
COX-1	Ciclooxigenasa I
cPLA2α	Fosfolipasa citosólica IVA
CRISPR/Cas	Sistema <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRP	Péptido similar al colágeno
DIAPH1-RT	Trombocitopenia asociada a DIAPH1
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>
DPM	Diámetro plaquetario medio
EETs	Acidos epoxieicosatrienoicos
EVW	Enfermedad de Von Willebrand
EVW-TP	Enfermedad de Von Willebrand de tipo plaquetario
F	<i>Forward</i>
FBS	Suero bovino fetal
FPD/AML	Trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia mieloide aguda
FPI	Fracción de plaquetas inmaduras
GEAPC	Grupo Español de Alteraciones Plaquetarias Heredadas
GP	Glicoproteína
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HETEs	Acidos hidroxieicosatrienoicos
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HR	Reparación por recombinación homóloga
HSCT	Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas
HTS	Técnicas de secuenciación masiva
ID	Dominio regulador negativo para heterodimerización
ISTH	Sociedad Internacional de Trombosis y hemostasia
ISTH-BAT	Herramienta de evaluación del sangrado de la ISTH
KO	<i>Knock out</i>
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LTR	Regiones <i>Long terminal repeat</i>
MAF	Frecuencias alélicas menores
MFI	Mediana de Intensidad de Fluorescencia
Min	Minutos

Mk	Megacariocito
MOI	Multiplicidad de infección
MYH9-RD	Desorden relacionado con <i>MYH9</i>
NHEJ	Reparación por unión de extremos no homólogos
NLS	Señal de localización nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMTS	Señal de focalización de matriz nuclear
PAM	Protospacer adjacent motifs
PBS	Solución salina tamponado con fosfato
PCA	Análisis de componentes principales
PFA	Paraformaldehído
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PLCγ2	Fosfolipasa C γ 2
PTI	Trombocitopenia inmune
R	<i>Reverse</i>
rFVIIa	Factor VII recombinante activo
RHD	Dominio <i>Runt Homology</i>
RNP	<i>Ribonucleoproteína</i>
ROI	Regiones de interés
RT	Temperatura ambiente
S	Segundos
SBS	Síndrome de Bernard Soulier
SCF	Factor de células madre hematopoyéticas recombinante
SCH	Síndrome de Chediak-Higashi
SCID-X1	Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SETH	Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia
SFK	Familia de quinasas Src
SG	Síndrome de Griscelli
SHP	Síndrome de Hermansky-Pudlak
SIN	<i>Self-inactivating</i>
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SPG	Síndrome de la plaqueta gris
SRC-RT	Trombocitopenia relacionada con <i>SRC</i>
STSL	Sitosterolemia
SUDEP	Muerte súbita inesperada en epilepsia
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TC	Trombocitopenia congénita
TG	Trombastenia de Glanzmann
TPC	Trastornos Plaquetarios Congénitos
TPF	Trastorno Plaquetario funcional
TPO	Trombopoyetina
TRAP	Péptido agonista del receptor activado por proteasa
TXA₂	Tromboxano A ₂
TXB₂	Tromboxano B ₂
VCF	Archivo de llamada de variantes
VCN	<i>Vector Copy number</i>
VN	Valores normales
VPM	Volumen plaquetario medio

VUS	Variante de significado incierto
VWF	Factor von Willebrand
WAS	Síndrome de Wiskott-Aldrich
WES	Secuenciación de exoma completo
WGS	Secuenciación de genoma completo
WT	<i>Wild type</i>
XLA	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X
ZFN	Zinc Finger Nucleases

Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha de 14 Julio de 2021.

Índice

<i>Introducción</i>	1
1. Trastornos Plaquetarios Congénitos.....	2
1.1. Descripción general	2
1.2. Diagnóstico de los TPC	3
1.3. Trastornos plaquetarios congénitos de especial relevancia clínica	8
1.4. Manejo clínico de TPC	12
2. Terapia génica	26
2.1. Generalidades	26
2.3. Vectores lentivirales en terapia génica	32
2.4. Edición génica: El sistema CRISPR/Cas9	35
3. Referencias	37
<i>Hipótesis y Objetivos</i>	49
<i>Capítulo I</i>	51
Identificación de una variante genética nueva en PTGS1 que afecta la N-glicosilación de la Ciclooxygenasa 1 y causa un efecto dominante negativo.	51
1. Introducción	52
2. Materiales y Métodos	55
3. Resultados	59
Descripción clínica	59
Estudios de función plaquetaria	60
Identificación de una variante nueva en <i>PTGS1</i>	62
Efecto de la nueva variante p.Asn143Ser en la expresión de COX-1 en plaquetas y leucocitos	64
La nueva variante p.Asn143Ser se asocia con un defecto en la actividad catalítica de COX-1	65
Los modelos celulares demuestran que la variante p.Asn143Ser afecta la N-glicosilación y actividad de la enzima con un efecto dominante negativo	68
4. Discusión.....	72
5. Referencias	75
<i>Capítulo II</i>	79

Trombocitopenia asociada a SRC: una delgada línea entre una disfunción de megacariocitos y una enfermedad inmune.	79
1. Introducción.	80
2. Pacientes.....	81
3. Materiales y métodos.	86
4. Resultados.	87
Recuentos y morfología plaquetaria, y evaluación del sangrado.	87
Estudio genético	87
Estudios de función plaquetaria	87
5. Discusión.....	90
6. Referencias.....	93
<i>Anexo Capítulo II</i>	97
<i>Capítulo III</i>	101
Ampliación del espectro genético de la trombocitopenia asociada al gen TUBB1.....	101
1. Introducción.	102
2. Materiales y métodos	103
3. Resultados	105
Pacientes	105
Identificación de variantes raras en la tubulina $\beta 1$ mediante HTS	105
Evaluación del efecto deletéreo de las variantes <i>missense</i> en <i>TUBB1</i> sobre el ensamblaje de los microtúbulos	110
Las variantes <i>missense</i> en la tubulina $\beta 1$ no afectan a la función plaquetaria	111
Las variantes <i>missense</i> en <i>TUBB1</i> alteran la expresión de la tubulina $\beta 1$, la organización de los microtúbulos en plaquetas, el <i>spreading</i> plaquetario, la formación de proplaquetas y la maduración de plaquetas.	112
4. Discusión.....	124
5. Referencias.....	128
<i>Anexo Capítulo III</i>	131
<i>Capítulo IV</i>	155
Ampliación del espectro genético del desorden RUNX1-RD y comprensión de su presentación clínica a través del perfil transcriptómico de pacientes con RUNX1-RD.....	155
1. Introducción	156
2. Materiales y Métodos	158
3. Resultados	161
Pacientes	161

Estudios de función plaquetaria.....	163
Identificación de variantes raras en RUNX1 mediante HTS	165
Gránulos densos en plaquetas de los pacientes.....	166
Evaluación del efecto deletéreo de las variantes a través del perfil transcriptómico de los pacientes	167
Genes diferentemente expresados en pacientes con RUNX1-RD.....	169
Validación del microarray.....	176
Análisis de rutas biológicas y estudio de enriquecimiento génico.....	176
Mks derivados de células CD34⁺ aisladas de sangre periférica.....	177
Inmunofluorescencia en frotis de sangre.....	179
4. Discusión.....	179
5. Referencias	185
<i>Anexo Capítulo IV</i>	<i>189</i>
<i>Capítulo V</i>	<i>193</i>
Nuevas aproximaciones de terapia génica a través del uso de vectores lentivirales para la Trombastenia de Glanzmann.	193
<i>Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 14 Julio 2021</i>	<i>193</i>
<i>Conclusiones</i>	<i>195</i>
<i>Conclusions.....</i>	<i>199</i>

Introducción

1. Trastornos Plaquetarios Congénitos

1.1. Descripción general

Los trastornos plaquetarios congénitos [TPC] comprenden un grupo muy heterogéneo de enfermedades raras causadas por alteraciones moleculares en genes que codifican proteínas relevantes en la formación y/o función de las plaquetas¹. La relevancia de las complicaciones clínicas es muy variable, incluso para un mismo trastorno, siendo desde casi insignificantes hasta potencialmente mortales. Por ello, es especialmente relevante conseguir en estos pacientes un diagnóstico precoz y preciso y un seguimiento clínico cercano.² Hasta el momento, se conocen alrededor de 60 tipos de TPC por patología molecular en aproximadamente 75 genes diferentes.³ La prevalencia individual de los TPC se desconoce, y aunque se estima que afectan entre 1:10⁴ y 1: 10⁶ individuos, es bastante aceptado que los trastornos moderados están infradiagnosticados ya que muchas veces los pacientes, como escasas o nulas complicaciones clínicas, pasan desapercibidos por muchos años o incluso toda su vida. Un estudio reciente ha revelado que aproximadamente 3 de cada 1000 sujetos son portadores de variantes en genes asociados a TPC, que causan una disfunción plaquetaria con repercusión clínica variable⁴.

De forma general, los TPC se agrupan en (**Figura 1**):

i) Trombocitopenias Congénitas [TC], en las que el defecto principal es el bajo número de plaquetas circulantes, cuyo tamaño puede ser normal, grande o pequeño⁵⁻⁷ (**Tabla 1**).

ii) Trastornos Plaquetarios de Función [TPF], en las que se ve afectada la funcionalidad de las plaquetas por defectos en los receptores de membrana, gránulos, proteínas de señalización u otros elementos de la maquinaria plaquetaria (**Tablas 2-4**)^{8,9}.

En numerosos desórdenes se combina la trombocitopenia con un grado variable de trombocitopatía.

El rasgo común de los TPC es una predisposición al sangrado mucocutáneo (epistaxis, sangrado de encías, púrpura, menorragia) desde la infancia, que sin bien suele ser moderado puede agravarse en situaciones de compromiso hemostático, como traumatismos, tratamientos farmacológicos, cirugías o partos. Con menor frecuencia, también pueden producirse hemorragias severas y profundas (hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia digestiva)^{2,10,11}. Además, muchos TPC forman parte de un subgrupo de trastornos multisistémicos. Son los denominados TPC sindrómicos en los que el defecto genético no altera de forma exclusiva a las plaquetas, sino que también se dan anomalías en otros órganos y tejidos (alteraciones auditivas, renales, cardíacas, etc.). En estos desórdenes, el sangrado no suele ser la complicación clínica más relevante, sino que es más trascendente el riesgo de desarrollar otros trastornos

como el fallo renal, pulmonar, neurológico o incluso neoplasias hematológicas^{2,6,8,12,13} (Tablas 1, 3-4).

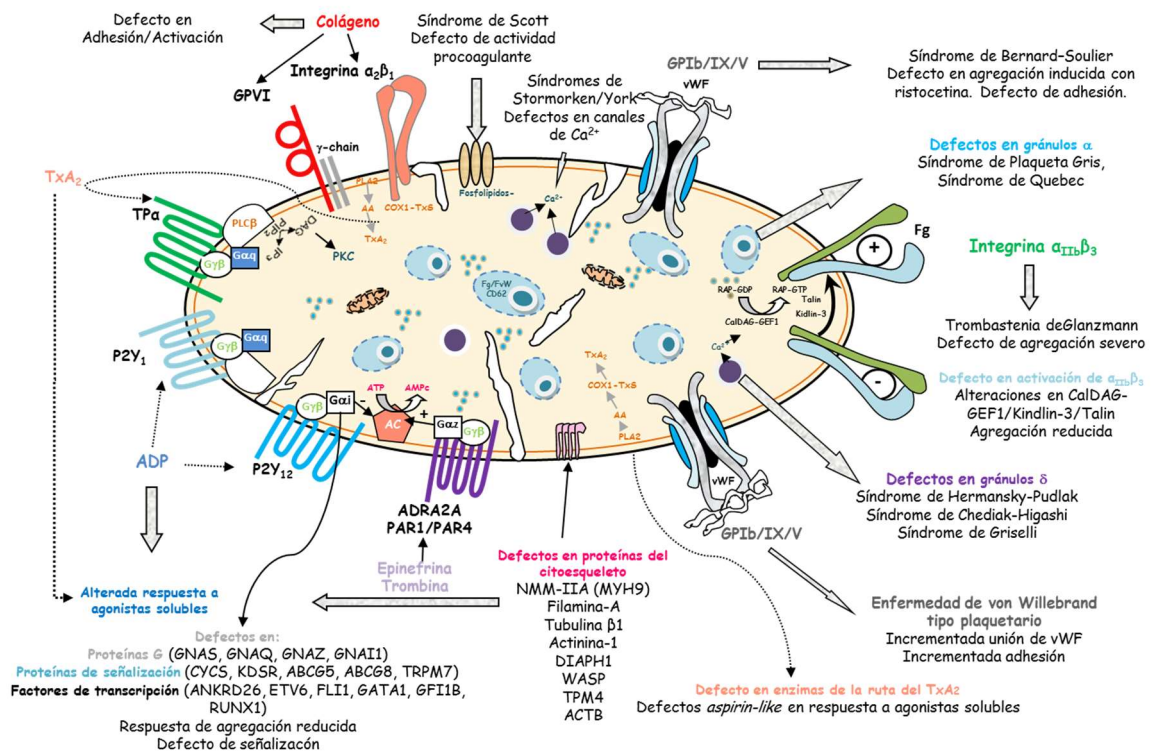


Figura 1. Trastornos plaquetarios congénitos. Se representan los distintos TPC indicando el gen, la proteína y/o función plaquetaria alterada en cada caso.

En algunos TPC se ha establecido una relación entre el genotipo (el gen y la variante) y el pronóstico y/o la gravedad clínica, lo que implica que el diagnóstico molecular precoz es muy relevante para orientar el manejo clínico de estos pacientes^{3,14}. El diagnóstico genético de los TPC, como el de otras enfermedades, se ha visto facilitado con la implementación progresiva de las técnicas de secuenciación masiva [HTS] en la primera línea de la investigación rutinaria de estas enfermedades¹⁵⁻¹⁷. Sin embargo, a pesar de las ventajas diagnósticas de la HTS, persisten dilemas éticos en el uso de cribados genéticos no dirigidos que pueden llevar a hallazgos genéticos inesperados o la identificación de variantes de significado incierto (del inglés, *variant uncertain significance VUS*) en el contexto de la enfermedad del paciente. Es por ello muy importante que los pacientes sometidos a estudios moleculares por HTS sean informados correctamente y que comprendan las posibles implicaciones que puedan tener los hallazgos genéticos.^{18,19}

1.2. Diagnóstico de los TPC

El diagnóstico de los TPC está muy limitado por su elevada heterogeneidad clínica y de laboratorio, así como por la escasa reproducibilidad y especificidad de las pruebas de función plaquetaria²⁰. Muchos pacientes llegan a adultos sin ser diagnosticados, o con un incorrecto diagnóstico, exponiéndose así al riesgo de un manejo clínico subóptimo

o incluso a un tratamiento dañino e innecesariamente invasivo. Ejemplo de esta situación, ha sido el diagnóstico de trombocitopenia inmune [PTI] en pacientes con Síndrome de Bernard-Soulier [SBS], con la consecuencia de un ineficaz e innecesario tratamiento con esteroides o incluso la esplenectomía¹⁰. De acuerdo con las recomendaciones de los expertos, para un abordaje diagnóstico inicial de los TPC se precisa de: i) una valoración clínica integral (explorando especialmente signos de sangrado, presencia de alteraciones sindrómicas extrahemorrágicas y los antecedentes familiares); ii) un análisis de laboratorio con pruebas de coagulación y bioquímica general, y iii) un hemograma y un frotis de sangre, con especial atención al número y la morfología de las plaquetas. Posteriormente, el análisis del fenotipo funcional de las plaquetas se puede iniciar con pruebas relativamente sencillas, semi-automáticas y en gran medida inespecíficas que exploren la hemostasia primaria de forma general ; en una segunda fase se emplean métodos más complejos y laboriosos que generalmente solo están disponibles en laboratorios especializados en el diagnóstico de TPC^{3,21}. Las **Figuras 2 y 3** describen el enfoque diagnóstico para las TC y los TPF, respectivamente, atendiendo a la presencia de alteraciones extrahematológicas, y al tamaño y función de las plaquetas.

En la evaluación clínica se recomienda el uso de cuestionarios estandarizados para la evaluación del sangrado, como el cuestionario y escala de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia [ISTH-BAT]²². El ISTH-BAT parece ser útil para identificar los pacientes que requieren más estudios funcionales para identificar su trastorno hemorrágico. En general, se establece un ISTH-BAT > 3 puntos en niños, >4 en hombres y >6 en mujeres, para seleccionar los casos con diátesis hemorrágica anormal en los que está indicada una evaluación más profunda de la función plaquetaria por sospecha de TPF. Sin embargo, el ISTH-BAT no permite discriminar las TC de los controles²².

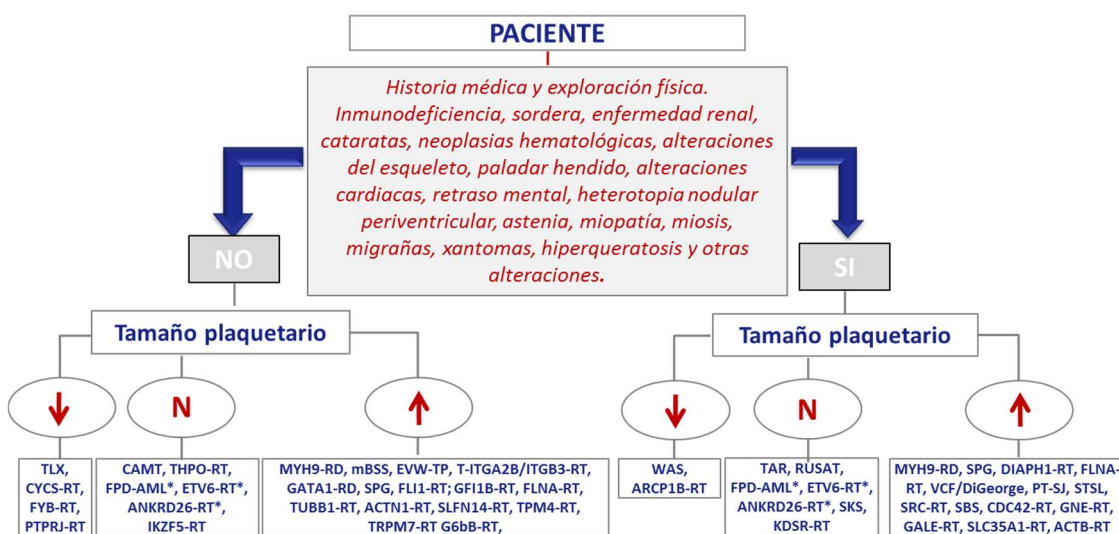


Figura 2. Algoritmo diagnóstico para las Trombocitopenias Congénitas. *N:Normal; TLX: trombocitopenia ligada a X; CYCS-RT: trombocitopenia asociada a CYCS (trombocitopenia tipo 4); FYB-RT: trombocitopenia asociada a FYB (trombocitopenia ligada a ADAP); PTPRJ-RT: trombocitopenia por variantes en la fosfatasa CD148; CAMT: trombocitopenia congénita amegacariocítica; THPO-RT:*

trombocitopenia por variantes en THPO; **FPD-AML** : Trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia mieloide aguda; **ANKRD26-RT**: trombocitopenia asociada a ANKRD26 ; **ETV6-RT**: trombocitopenia por variantes en ETV6; **IKZF5-RT**: trombocitopenia por variantes en IKZF5; **MYH9-RD**: Enfermedad relacionada con MYH9 (inclusiones en neutrófilos, sordera, enfermedad renal, cataratas); **mSBS**: Síndrome de Bernard Soulier monoalélico; **EVW-TP**: Enfermedad de VW tipo plaquetario; **ITGA2B/ITGB3-RT**: trombocitopenia asociada a ITGA2B/ITGB3; **GATA1-RD** : Enfermedad ligada a GATA1; **SPG**: Síndrome de la plaqueta gris (mielofibrosis); **FLI1-RT**: trombocitopenia asociada a FLI1; **GFI1-RT**: trombocitopenia asociada a GFI1B (expresión de CD34 en plaquetas); **FLNA-RT**: trombocitopenia con filaminopatía (sindrómico o solo trombopenia); **TUBB1-RT**: trombocitopenia asociada a la tubulina b1; **ACTN1-RT**: trombocitopenia asociada a actinina-1; **SLFN14-RT**: trombocitopenia asociada a SLFN14; **TPM4-RT**: trombocitopenia asociada a tropomiosina 4; **TRPM7-RT**: trombocitopenia asociada al canal iónico TRPM7; **G6bB-RT**: trombocitopenia asociada al inmunoreceptor G6bB (mielofibrosis); **WAS**: Síndrome de Wiskott-Aldrich; **ARCP1B-RT**: microtrombocitopenia asociada a ARCPB; **TAR**: trombocitopenia con ausencia de radio; **RUSAT**: trombocitopenia con sinostosis radiocubital; **SKS**: Síndrome de Stormorken; **KDSR-RT**: trombocitopenia con hiperqueratosis por variantes en 3-deshidrosfingalina reductasa; **DIAPH1-RT**: trombocitopenia asociada a DIAPH1 (sordera); **PT-SJ**: Paris-Trousseau/Síndrome Jacobsen; **VCF-DiGeorge síndromes**: velocardiofacial/DiGeorge; **STSL**: sistosterolemia; **SRC**: trombocitopenia asociada a tirosin quinasa SRC; **SBS**: Síndrome de Bernard-Soulier; **CDC42-RT**: trombocitopenia asociada a CDC42 (Síndrome Takenouchi-kosaki); **GNE-RT**: trombocitopenia asociada a GNE; **GALE-RT**: trombocitopenia asociada a GALE (galactosemia); **SLC35A1-RT**: trombocitopenia sindrómica por variantes en el transportador de ácido siálico CMP; **ACTB-RT**: trombocitopenia asociada a actina β; *Desórdenes con riesgo de neoplasia hematológica.

Muchas trombocitopenias hereditarias cursan con recuentos plaquetarios moderadamente bajos, disfunción plaquetaria leve y un sangrado escaso o incluso ausente. Por ello, no es infrecuente que la trombocitopenia asintomática sea un hallazgo incidental en la edad adulta. Además, su origen genético puede no sospecharse si no existen antecedentes familiares, porque se hereda de forma recesiva o porque, como se documenta en hasta el 40% de las personas con enfermedad relacionada con MYH9 [MYH9-RD], se debe a defectos moleculares con penetrancia incompleta o que aparecen “*de novo*” en el paciente. Los hallazgos que principalmente orientan el diagnóstico de las TC son la evaluación del tamaño de las plaquetas en un frotis de sangre periférica y una exploración física que pueda apuntar hacia un síndrome concreto. Aunque el tamaño de las plaquetas (pequeño, normal, grande) suele ser característico de los diferentes tipos de TC (**Figura 2**) (**Tabla 1**), conviene recordar que existen excepciones²³.

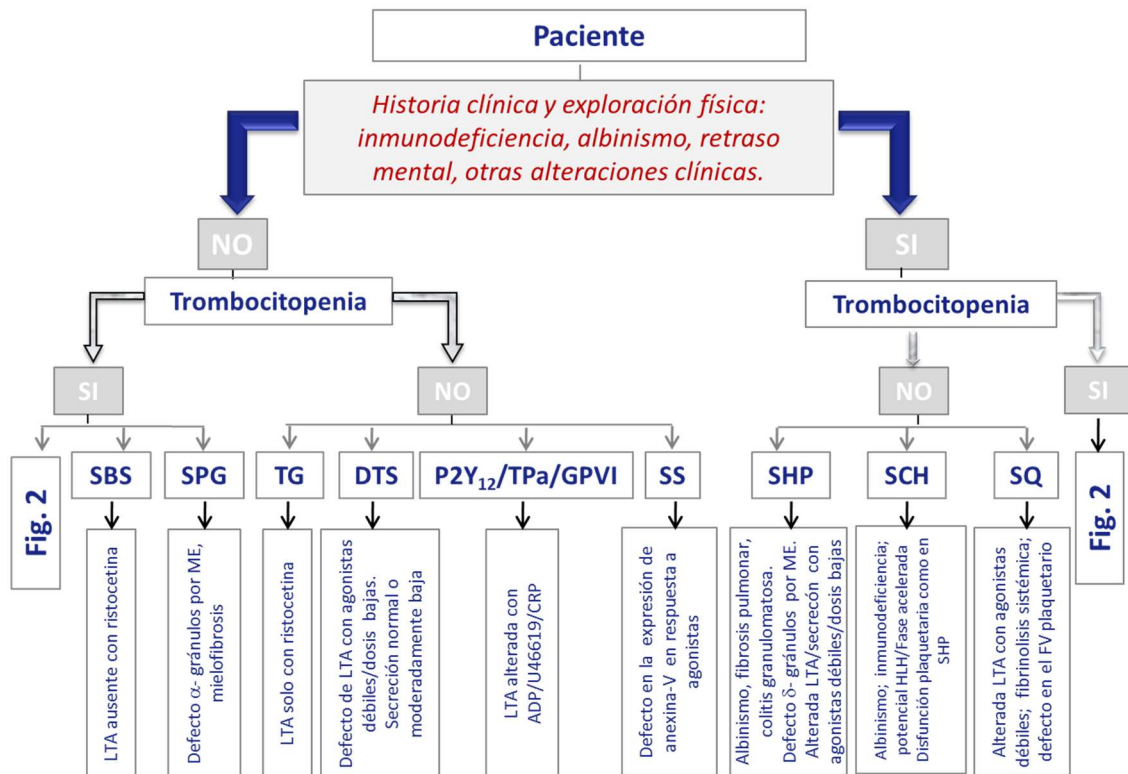


Figura 3. Algoritmo diagnóstico para los Trastornos Plaquetarios de Función. **SBS:** Síndrome de Bernard-Soulier; **SPG:** Síndrome de la plaqueta gris; **TG:** Trombastenia de Glanzmann; **DTS:** Defecto en la transmisión de la señal (deficiencia en enzimas, proteínas G, Ca/DAG-GEF1, otras proteínas de señalización); Defectos en receptores plaquetarios P2Y₁₂ (ADP), TPa (TxA₂) o glicoproteína VI (GPVI) (colágeno); **SS:** Síndrome Scott; **SHP:** Síndrome de Hermansky-Pudlak; **SCH:** Síndrome de Chediak-Higashi; **SQ:** Síndrome de Quebec. **ME:** microscopía electrónica; **LTA:** agregación plaquetaria; **U46619:** Análogo de TxA₂; **CRP:** collagen-related peptide; **Fig.2:** Figura 2

El diagnóstico definitivo de TPC se completa con la identificación de la patología molecular subyacente. Hasta hace una década, el estudio molecular se consideraba un último paso no esencial en el proceso de diagnóstico del TPC²⁴ y se realizaba casi exclusivamente mediante la secuenciación de Sanger de los genes candidatos sospechados por el fenotipo clínico y de laboratorio^{3,21}. La secuenciación por Sanger aunque es útil, es tediosa y no aplicable a casos con un fenotipo inespecífico¹⁰, por lo que ha quedado relegada únicamente a la confirmación de variantes moleculares y a estudios familiares. A partir de 2010, el estudio molecular de los TPC comenzó a realizarse mediante HTS, bien usando paneles de genes preseleccionados o incluso de forma no dirigida secuenciando el exoma (del inglés *whole exome sequencing*, WES) o genoma (del inglés *whole genome sequencing*, WGS). La incorporación de esta tecnología ha permitido ampliar sustancialmente nuestro conocimiento sobre los TPC, identificando la base molecular en casi dos tercios de los ~60 tipos de TPC conocidos^{16,17,25-27}. Además, su mayor accesibilidad y menor costo, está cambiando la secuencia tradicional del proceso de diagnóstico de los TPC y muchos expertos

proponen que el estudio molecular se realice antes, incluso después de las pruebas iniciales básicas^{3,28}.

Se sabe que un diagnóstico molecular precoz facilita el manejo clínico del paciente, especialmente en los TPC severos, y en aquellos en los que el genotipo está relacionado con el pronóstico y la gravedad de la enfermedad hematológica y/o extrahematológica, como la trombocitopenia amegacariocítica congénita [CAMT], trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia mieloide aguda [FPD/AML], MYH9-RD, Síndrome de Wiskott-Aldrich [WAS], Síndrome de Hermansky-Pudlak [SHP] o Síndrome de Chediak-Higashi [SCH]^{9,29}. Cabe mencionar que la HTS tiene sus limitaciones, entre las que destaca la gestión de una gran cantidad de datos moleculares obtenidos que requiere la ayuda de expertos bioinformáticos, y la dificultad para interpretar la patogenicidad de las variantes identificadas^{3,29}. En la interpretación de patogenicidad las variantes identificadas, es importante seguir las recomendaciones de filtrado y clasificación que ofrecen los expertos, ya que la asignación incorrecta de patogenicidad puede ser más perjudicial para el pacientes que permanecer sin diagnóstico. Actualmente, la guía más utilizada es la del *American College of Medical Genetics and Genomics*³⁰. No obstante, a pesar de la evidencia molecular, para establecer el diagnóstico definitivo es imprescindible considerar la evaluación clínica y el fenotipo de los pacientes. No hay que olvidar las importantes consideraciones éticas derivados de la HTS, y la necesidad de informar adecuadamente al paciente del objeto del estudio y de la posibilidad y trascendencia de hallazgos moleculares incidentales^{19,31}.

Dado que los TPC son enfermedades raras, la colaboración entre médicos e investigadores a nivel nacional e internacional es indispensable para facilitar el acceso a un diagnóstico temprano, mejorar la definición de fenotipos clínicos, establecer una patogenicidad acertada de nuevas variantes y comprender las relaciones genotipo-fenotipo^{26,28}. Ejemplo de ellos es el proyecto multicéntrico "*Caracterización funcional y molecular de pacientes con TPC*" del Grupo Español de Alteraciones Plaquetarias Heredadas [GEAPC] de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia [SETH]. El objetivo principal de este proyecto, que nuestro grupo coordina desde su inicio en 2008, es hacer accesible el diagnóstico funcional y molecular de los pacientes con TPC a todos los hematólogos españoles y, potencialmente, a los investigadores de otros países^{10,25}. En el marco de este proyecto, se han estudiado cerca de 300 pacientes de unas 200 familias no relacionadas y alrededor del 60% de los casos han logrado el diagnóstico molecular. Se trata de la mayor serie de casos recopilada en España y una de las más importantes del mundo. Además, en el marco de este Proyecto también se ha puesto en marcha el primer registro español de TPC (<https://retplac.imib.es/>).

1.3. Trastornos plaquetarios congénitos de especial relevancia clínica

A continuación, se describen resumidamente algunos TPC de especial importancia clínica, incluyendo ciertos desórdenes sindrómicos y algunos trastornos con alto grado de hemorragia.

1.3.1. Trastornos plaquetarios sindrómicos

Aproximadamente la mitad de todas las TC, así como algunos TFP, son síndromes en los que el defecto plaquetario se acompaña de alteraciones en otros tejidos, o con el desarrollo de una enfermedad neoplásica^{6,9,20,29}. En base a su alta relevancia clínica, destacamos los siguientes:

Trombocitopenia amegacariocítica congénita (CAMT)

Se trata de un cuadro de fallo medular raro que se presenta como trombocitopenia hipomegacariocítica al nacimiento sin otras características físicas. La mayoría de pacientes desarrollan citopenias adicionales durante los primeros años de vida, hasta que finalmente progresan a aplasia medular. Está causada por mutaciones recesivas en el gen c-MPL que causan la expresión de un receptor de trombopoyetina [TPO] disfuncional. Existe una correlación genotipo-fenotipo, en la que mutaciones *nonsense* exhiben un patrón más agresivo con una rápida progresión a una médula hipocelular durante la primera década de la vida, mientras que los pacientes con mutaciones *missense* en los que existe actividad residual de MPL, pueden mostrar un incremento temporal de las cifras de plaquetas y desarrollar más tardíamente anemia o pancitopenia.

Enfermedad relacionada con MYH9 (MYH9-RD)

Se trata de la trombocitopenia hereditaria más común en todo el mundo, con más de 300 familias identificadas. Esta categoría incluye los denominados síndromes de May-Hegglin, Fechtner, Sebastian y Epstein. Este desorden autosómico dominante está causado por mutaciones monoalélicas (~100 descritas) en el gen *MYH9*, que codifica la cadena pesada IIA de una miosina no muscular, proteína NMM-IIA, implicada en la contractilidad del citoesqueleto^{32,33}. Las mutaciones de *novo* son frecuentes en esta enfermedad y también se han descrito casos de mosaicismo germinal somático³⁴. Para su diagnóstico es relevante detectar plaquetas gigantes ($30-100 \times 10^9/L$) y cuerpos de inclusión en neutrófilos (similares a los cuerpos de Döhle). Además de macrotrombocitopenia y episodios hemorrágicos generalmente leves, el 25% de los pacientes desarrollan nefropatía con proteinuria que, en la mayoría de los casos, evoluciona a insuficiencia renal grave. También, un 50% de los pacientes presenta sordera neurosensorial y un 18% cataratas preseniles. Por tanto, el curso clínico de MYH9-RD es heterogéneo y va desde la trombocitopenia asintomática hasta un trastorno complejo que afecta gravemente la calidad de vida. El estudio de grandes

series de pacientes ha permitido establecer correlaciones genotipo-fenotipo, que ayudan a predecir cómo evolucionará la enfermedad en el 85% de los casos y, opcionalmente, adoptar estrategias para prevenir o retrasar la enfermedad renal³².

Síndrome Wiskott-Aldrich (WAS)

El WAS es una enfermedad ligada al cromosoma X que afecta casi exclusivamente a varones, con manifestaciones clínicas que incluyen sangrado, inmunodeficiencia humoral y celular, eccema, infecciones recurrentes y enfermedades autoinmunitarias o tumorales. Un rasgo característico es la microtrombocitopenia, con recuentos de $5-50 \times 10^9/L$ y plaquetas de pequeño tamaño y disfuncionales³⁵. La enfermedad está causada por variantes en el gen *WAS* que codifica la proteína WASP, que participa en la remodelación del citoesqueleto de actina. Hasta la fecha, se han descrito unas 400 mutaciones distintas y se ha observado que la severidad clínica de la enfermedad es, en parte, predecible por el genotipo. Las mutaciones *nonsense* con, en general, un efecto mayor en la expresión/funcionalidad de WASP se asocian a un fenotipo clínico más severo³⁵.

Sitosterolemia (STSL)

La sitosterolemia es un trastorno autosómico recesivo causado por variantes en los genes *ABCG5* y *ABCG8*, que se caracteriza por un aumento de los niveles de esteroides vegetales en el plasma. Las características clínicas incluyen xantomas cutáneos y tendinosos, xantelasmas, aterosclerosis coronaria prematura y complicaciones asociadas, artritis y/o artralgias. Las alteraciones hematológicas que presentan los pacientes incluyen anemia hemolítica, macrotrombocitopenia (presente en 80-90% de los casos), y/o esplenomegalia. El retraso en el diagnóstico aumenta el riesgo asociado de desarrollar una enfermedad cardiovascular aterosclerótica avanzada^{36,37}.

Trombocitopenia asociada a *DIAPH1* (*DIAPH1-RT*)

DIAPH1-RT constituye un trastorno autosómico dominante con macrotrombocitopenia y neutropenia variable, en el que destaca el desarrollo de sordera neurosensorial en la infancia (a edades más tempranas que en *MYH9-RD*). Está causada por variantes en el gen *DIAPH1* que codifica la proteína del mismo nombre, perteneciente a la familia de las forminas e implicada en la organización del citoesqueleto de megacariocitos y plaquetas y del órgano de Corti.

1.3.2. Trastornos plaquetarios congénitos con predisposición a neoplasias hematológicas

Este subgrupo incluye los trastornos autosómicos dominantes causados por variantes en los genes *ANKRD26* [*ANKRD26-RD*], *ETV6* [*ETV6-RD*] y *RUNX1* [*RUNX1-RD*] o trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia o [FPD/AML], que justifican el 18%, 3% y 5% de las TC, respectivamente. Los pacientes se caracterizan por una

trombocitopenia moderada, no sindrómica, con plaquetas de tamaño normal, y por la presencia en medula ósea de un número normal o aumentado de megacariocitos con características displásicas. En los pacientes con ANKRD26-RD y ETV6-RD el sangrado es variable pero en general leve, compatible con una función plaquetaria normal. En cambio, los pacientes con FPD/AML por variantes en *RUNX1*, suelen mostrar una disfunción plaquetaria significativa, con deficiencia de gránulos α/δ e hiporeactividad a agonistas como colágeno, y por ello suelen presentar sangrado de severidad variable. La característica clínica más relevante en estas tres condiciones es la predisposición al desarrollo de neoplasias hematológicas, generalmente entre la segunda y la quinta década de la vida. El síndrome mielodisplásico [SMD] y la leucemia mieloide aguda [LMA] se desarrollan en el 48% de los pacientes con FPD/AML y en el 7% de los casos de ANKRD26-RD; el 21% de los pacientes con ETV6-RD desarrollarán leucemia linfocítica aguda [LLA], mientras que un 7% sufrirá AML, MDS, mieloma múltiple o policitemia vera^{13,38-40}.

1.3.3. Trastornos sindrómicos por defectos en los gránulos plaquetarios

Diferentes defectos genéticos se asocian a una deficiencia cuantitativa o cualitativa de gránulos plaquetarios α , δ , o ambos (**Tabla 3**). Aunque los pacientes con estas patologías suelen presentar una tendencia al sangrado moderado, muchos desarrollan otras complicaciones de gran relevancia^{41,42}.

El síndrome de la plaqueta gris [SPG] es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por un déficit de gránulos α (número y/o contenido) por mutaciones en el gen *NBEAL2*. Los pacientes suelen presentar trombocitopenia moderada con plaquetas grandes y de aspecto grisáceo, diátesis hemorrágica mucocutánea moderada, mielofibrosis y, en algunos casos, esplenomegalia⁴³. Aparte de *NBEAL2*, otros genes, como *GATA1*, *VPS33B*, *VIPAS39*, *GFI1B*, o *PLAU*, han sido implicados en deficiencia congénita de gránulos α ²⁹.

En cuanto a la deficiencia congénita de gránulos δ , destacan tres enfermedades autosómicas recesivas conocidas como síndromes de Hermansky-Pudlack [SHP], Chediak-Higashi [SCH] y Griscelli [SG]. En estos cuadros, los recuentos plaquetarios son normales y la función plaquetaria está moderadamente alterada⁴². El SHP está causado por alteraciones en 11 genes diferentes (**Tabla 3**) implicados en el tráfico vesicular. Se caracteriza por albinismo oculocutáneo, acúmulo de material ceroides en las células del sistema mononuclear-fagocítico, fibrosis pulmonar, enfermedad inflamatoria intestinal y clínica hemorrágica⁴⁴. El SCH está causado por mutaciones en el gen *LYST*. Se manifiesta con albinismo oculocutáneo parcial, pelo plateado, gránulos lisosomales gigantes, cuerpos de inclusión en neutrófilos y otras células, infecciones piógenas frecuentes, neuropatía periférica y fase acelerada hasta en el 85% de los casos⁴⁵. Por último, el SG surge de mutaciones en genes que codifican las proteínas MYO5A, RAB27A o melanofilina, y se presenta con albinismo parcial, cabello plateado, defectos neurológicos centrales y/o linfocitosis^{41,42}.

1.3.4. Trastornos plaquetarios con alto riesgo de diátesis hemorrágica severa

En un pequeño número de TPC hay una disfunción plaquetaria severa, a veces combinada con trombocitopenia, que condiciona un alto riesgo de hemorragia grave, incluso potencialmente mortal, especialmente en situaciones de compromiso hemostático (traumatismos, cirugías, parto). Destacamos aquí los dos TPC seguramente más estudiados y clínicamente mejor caracterizados: el síndrome de Bernard-Soulier y la Trombastenia de Glanzmann [TG].

Defectos del complejo GPIb/IX/V

El SBS es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por diátesis hemorrágica y trombocitopenia moderada a grave con plaquetas disfuncionales. Está causado por mutaciones en los genes *GP1BA*, *GP1BB* y *GP9* (>100 variantes descritas) que llevan a una ausencia del complejo Ib/IX/V en las plaquetas (SBS clásico) o, en casos más raros, a la expresión de un receptor no funcional (variante del SBS)⁴⁶. El rasgo distintivo del SBS es la ausencia de aglutinación de las plaquetas en respuesta al antibiótico ristocetina, que no se corrige con adición de plasma control a diferencia de la enfermedad de von Willebrand severa [EVW]. Por el contrario, la agregación con otros agonistas plaquetarios es normal o moderadamente reducida en estos pacientes. El SBS debe diferenciarse lo antes posible de otras macrotrombocitopenias y sobre todo de la PTI, para evitar terapias inapropiadas o la esplenectomía que han sufrido muchos pacientes por un diagnóstico incorrecto¹⁰. En general, solo los pacientes homocigotos muestran hemorragias mucocutáneas espontáneas desde la infancia, mientras que los heterocigotos (SBS monoalélico) tienden a ser asintomáticos con una trombocitopenia leve^{2,46,47}.

La enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario [EVW-TP] también está causada por mutaciones raras en el gen *GP1BA*. El efecto de estas mutaciones autosómicas dominantes (5 descritas) es una afinidad extremadamente alta del receptor Ib/IX/V por el VWF, que genera una hipersensibilidad de las plaquetas a la ristocetina. Una delección heterocigótica del cromosoma 22q11.2, mayoritariamente somática, que incluye *GP1BB*, provoca los síndromes de Di-George y velocardiofacial en los que la macrotrombocitopenia se acompaña de varios defectos del desarrollo⁴⁸.

La Trombastenia de Glanzmann

En la respuesta hemostática, las plaquetas adheridas a la lesión vascular reclutan otras plaquetas circulantes para formar el trombo⁴⁹. Esta agregación plaquetaria se consigue mediante puentes de fibrinógeno entre integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ de las plaquetas cercanas. La TG, constituye juntos con el SBS un TPC severo que está causado por variantes en los genes *ITGA2B* e *ITGB3* que codifican la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Esta enfermedad se desarrolla en el **Capítulo V**.

1.4. Manejo clínico de TPC

En los últimos años no ha habido grandes avances en el manejo clínico de los pacientes con TPC ni cambios relevantes en las recomendaciones que ofrecen las escasas guías clínicas². Entre estas recomendaciones destacan las medidas educativas sobre el estilo de vida para minimizar el riesgo hemorrágico (evitar actividades con riesgo de trauma, buena higiene dental, no uso de fármacos antiplaquetarios), la inclusión de los pacientes en registros, y un seguimiento periódico por parte de un servicio de hematología especializado con soporte multidisciplinar⁵⁰. Las complicaciones hemorrágicas y la profilaxis previa a procedimientos con riesgo de sangrado se manejan, según su gravedad o nivel de riesgo, con fármacos hemostáticos (antifibrinolíticos o desmopresina) y, si fuera necesario, con transfusiones de plaquetas o factor VII recombinante activo [rFVIIa]². Si el sangrado es leve y localizado, se suelen controlar bien con medidas locales como la compresión o el uso de medicamentos tópicos hemostáticos. Generalmente, los antifibrinolíticos se indican para el control de sangrado mucocutáneo leve-moderado (como epistaxis o menorragias) o en tratamiento profiláctico frente a procedimientos de bajo riesgo^{50,51}. La desmopresina, que aumenta los niveles circulantes VWF, se suele emplear cuando los antifibrinolíticos por sí solos parecen ineficaces². El rFVIIa, que actúa aumentando la generación de trombina, está autorizado en pacientes con TG refractarios, por el desarrollo de anticuerpos, al tratamiento con concentrados de plaquetas⁵⁰⁻⁵². Aunque existe poca evidencia de su uso en el resto de TPC, el FVIIr se ha utilizado con éxito en algunos pacientes con SBS y en un paciente con trombocitopenia con ausencia de radio^{6,50,53,54}. Por el alto riesgo de aloinmunización, las transfusiones de plaquetas se restringen a aquellos pacientes con sangrado o trombocitopenia severa o que se van a someter a cirugías mayores, en los que las medidas locales y los fármacos pro-hemostáticos mencionados han fallado⁵⁰. La indicación de la transfusión de plaquetas debe ser individualizada, valorando el riesgo-beneficio y teniendo en cuenta los antecedentes personales, el recuento de plaquetas y los riesgos asociados entre los que destaca la aloinmunización contra antígenos HLA y, en el caso de la TG contra la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ^{2,50,52,55}. En la TG, una vez que se desarrollan estos anticuerpos los pacientes se vuelven refractarios frente a nuevas transfusiones presentando un peor pronóstico. Por ello, su uso debe limitarse para cirugías donde existe un sangrado potencialmente mortal. Si la transfusión de plaquetas se considera necesaria, se debe optar por concentrados de plaquetas leucodeplecionados y/o HLA-idénticos.

Un reciente estudio internacional ha mostrado que la hemorrágica post-cirugía es más frecuente en pacientes con TPF (19.7%) que en pacientes con TC (24.8%). Es paradójico que aunque la profilaxis más utilizada fue la transfusión de plaquetas, la desmopresina, sola o en combinación con antifibrinolíticos, fue el tratamiento preventivo asociado a las menores tasas de hemorragia. Además, las transfusiones de plaquetas en estos pacientes solo fueron efectivas cuando se transfundieron más de 6 unidades de

plaquetas⁵⁶. En este sentido, un estudio muy reciente en el que hemos participado, sugiere que en patologías como la TG con recuentos de plaquetas normales aunque sean disfuncionales, para que una transfusión de plaquetas sea eficaz se requiere que la proporción de plaquetas transfundidas supere a las disfuncionales endógenas del paciente en una relación 2:1⁵⁷.

En los casos donde es necesario mejorar la trombocitopenia, como antes de una cirugía mayor, el tratamiento puede incluir además de transfusión de plaquetas, el uso de TPO-RA (eltrombopag, romiplostin)^{2,8,52,55,56,58}.

En lo que respecta a las trombocitopenias sindrómicas, es fundamental un abordaje clínico multidisciplinario. Los pacientes MYH9-RD pueden beneficiarse de la realización periódica de analíticas de orina, ya que la aparición de proteinuria puede apoyar el uso de terapias como los bloqueadores de los receptores de angiotensina II y/o los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, con el objetivo de prevenir o retrasar el fallo renal. Los pacientes con MYH9-RD también se pueden beneficiar de exámenes auditivos y oculares rutinarios para evitar retrasos en el tratamiento; tanto el implante coclear como la cirugía estándar de cataratas restauran generalmente la función de ambos órganos^{12,32,59}.

En lo que respecta a las trombocitopenias asociadas con mutaciones *RUNX1*, *ANKRD26* o *ETV6*, se recomienda un examen citogenético de la médula ósea en el momento del diagnóstico, especialmente si las mutaciones son ya conocidas y su patogenicidad está establecida. En el caso de variantes cuyo efecto funcional es aún desconocido, se sugiere un seguimiento anual con hemograma y frotis, y una evaluación clínica más profunda en el caso de identificar signos de potencial transformación malignos. Llegado el caso de considerar para el paciente la opción del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas [HSCT], se precisa descartar como donantes que sean portadores de la mutación de enfermo^{12,13,38,39}.

Aunque muchos TPC pueden considerarse benignos, en algunos casos el sangrado u otras complicaciones son graves y de compromiso vital. Al igual que con otras enfermedades, una cura definitiva para de los TPC sigue siendo un gran desafío médico. Hasta la fecha, el alo-HSCT representa la única terapia curativa disponible para los casos de TPC con síntomas hemorrágicos muy graves o con riesgo de transformación a aplasia de médula ósea o neoplasias hematológicas. Teniendo en cuenta la alta morbi-mortalidad (considerando la enfermedad de injerto contra huésped), el análisis de riesgo-beneficio de realizar un alo-HSCT debe considerarse de forma individualizada. En el caso de que se contemple esta opción, es mejor que el alo-HSCT se realice en la infancia, debido al menor riesgo de complicaciones relacionadas^{2,6,8,55,60}. Los trastornos donde se ha empleado con éxito el alo-HSCT son la CAMT y el WAS^{6,61-64}. Además, también se ha realizado en casos esporádicos de pacientes con Síndrome de MECOM, con TAR, con trombocitopenia con sinostosis radiocubital, SBS, TG, SPG, SCH, y podría ser aplicado también a pacientes con FPD/AML, ANKRD26-RT o ETV6-RT^{6,38,45,51}.

Los resultados recientes de ensayos de terapia génica en algunas enfermedades hematológicas monogénicas, han elevado las expectativas de un potencial tratamiento curativo también aplicable a los TPC graves. Hasta la fecha, la corrección génica ha sido una opción clínica experimental solo para algunos casos de WAS, mientras que en otros TPC la terapia génica aún se encuentra a nivel de investigación pre-clínica. Estos avances en terapia génica se discuten más abajo.

Tabla 1. Características generales de las Trombocitopenias Congénitas.

Enfermedad (Código OMIM)	Herencia	Gen	Tipo TCP/S/N	Fenotipo clínico y laboratorio	Ref
TROMBOCITOPENIAS CONGÉNITAS CON PLAQUETAS DE TAMAÑO NORMAL					
Trombocitopenia congénita amegariocítica [CAMT] (604498)	AR	<i>MPL</i>	S	Trombocitopenia neonatal muy grave, amegacariocítica; progresión a anemia aplásica en la infancia. Tendencia a hemorragias severas.	61,65
Trombocitopenia relacionada con <i>THPO</i>	AD/AR	<i>THPO</i>	S	Las mutaciones monoalélicas se asocian con trombocitopenia leve. Las mutaciones bialélicas se parecen a CAMT. No responde a alo-HSCT pero responde a Romiplostim. Tendencia a hemorragias severas	66-68
Sinostosis radiolunar con trombocitopenia amegacariocítica 1 [RUSAT1] (605432)	AD	<i>HOXA11</i>	S	Trombocitopenia neonatal grave; megacariocitos reducidos/ausentes. Posible evolución a anemia aplásica en la infancia. Sinostosis de radio y cúbito con/sin otras alteraciones esqueléticas; probable pérdida auditiva neurosensorial. Tendencia a hemorragias severas.	6,69
Trombocitopenia asociada a <i>MECOM</i> (incluida Trombocitopenia amegacariocítica-2 con sinostosis radiolunar [RUSAT2])(616738)	AD	<i>MECOM</i>	S	Trombocitopenia neonatal grave. Megacariocitos reducidos/ausentes y/o anemia hipogenerativa. Sinostosis de radio y cúbito con / sin otras alteraciones esqueléticas; Deficiencia de células B; Posibles malformaciones renales o cardíacas y probable hipoacusia neurosensorial. Tendencia a hemorragias severas	70,71
Trombocitopenia con radios ausentes [TAR] (274000)	AR	<i>RBM8A</i> (Microdelección &rs139428292 / rs201779890)	S	Trombocitopenia neonatal central moderada-grave que mejora con la edad; ausencia bilateral de radio con o sin otras anomalías esqueléticas. Posibles anomalías renales, cardíacas o del sistema nervioso central. Tendencia a hemorragias severas.	72
Trastorno plaquetario familiar con propensión a la leucemia mielógena aguda (FPD-AML)	AD	<i>RUNX1</i>	NH	Trombocitopenia neonatal leve-moderada. Defecto de la función plaquetaria de tipo aspirina. Deficiencia de gránulos plaquetarios. Alto riesgo (>40%) de leucemia mielóide aguda o síndrome mielodisplásico; aumenta el riesgo de leucemia linfoblástica y	38,40

(601399)				tumor sólido. Tendencia al sangrado ausente-moderada.	
Trombocitopenia asociada a <i>ANKRD26</i> (Trombocitopenia tipo 2)(188000)	AD	<i>ANKRD26</i>	NH	Trombocitopenia neonatal leve-moderada. Algunos pacientes con niveles elevados de hemoglobina y/o leucocitosis. Aproximadamente un 10% de los pacientes adquieren neoplasias mieloides. Tendencia al sangrado ausente-moderada.	38,39,73
Trombocitopenia asociada a <i>ETV6</i> (Trombocitopenia Tipo-5) (616216)	AD	<i>ETV6</i>	NH	Glóbulos rojos con alto volumen corpuscular medio. Las plaquetas pueden mostrar gránulos α alargados, defecto en <i>spreading</i> y en retracción del coágulo. Alto número de plaquetas CD34 ⁺ . Predisposición (30%) a síndromes adquiridos linfoides, mieloides y mieloproliferativos. Tendencia al sangrado ausente-moderada.	38,74,75
Trombocitopenia asociada a <i>IKZF5</i>	AD	<i>IKZF5</i>	TCP	Trombocitopenia leve-moderada. Plaquetas con menos gránulos α y δ . Sin tendencia al sangrado.	76
Trombocitopenia asociada a <i>CYCS</i> (Trombocitopenia tipo 4) (612004)	AD	<i>CYCS</i>	TCP	Trombocitopenia leve-moderada. También puede presentarse con plaquetas pequeñas. Sin tendencia a sangrar	29,77
Trombocitopenia asociada a <i>KDSR</i>	AR	<i>KDSR</i>	S	Trombocitopenia grave a edad temprana (aunque al nacer el recuento plaquetario puede ser normal). Defecto de activación/secreción plaquetaria. Hiperqueratosis variable desde hiperqueratosis/ eritema palmoplantar y anogenital hasta una ictiosis arlequín. Tendencia a hemorragia moderada a grave.	78,79
Síndrome Stormorken (185070)	AD	<i>STIM1</i> <i>Orai1</i>	S	Trombocitopenia moderada. Alta unión plaquetaria sistémica de la anexina V. Formación y retracción anormales de coágulos; asplenia, anemia leve, miopatía con agregados tubulares, miosis congénita, ictiosis, estatura baja, migraña y deterioro cognitivo leve. Tendencia leve al sangrado.	29,80
Síndrome plaquetario York	AD	<i>STIM1</i>	S	Más raro que el síndrome de Stormorken. Trombocitopenia moderada a grave. Miopatía con vacuolas bordeadas; Plaquetas con menos gránulos α y δ ; cuerpos densos gigantes. Tendencia leve a sangrar.	81

TROMBOCITOPENIAS CONGÉNITAS CON PLAQUETAS GRANDES

Síndrome Bernard-Soulier [SBS](231200)	AR	<i>GP1BA, GP1BB, GP9</i>	TCP	Trombocitopenia moderada-grave con plaquetas gigantes. Agregación plaquetaria ausente con ristocetina, no se restaura con plasma normal dado el defecto del receptor de vWF, la GP Ib α /IX. Agregación normal o reducida con otros agonistas. Defecto de adherencia a VWF. Tendencia hemorrágica severa.	46
Síndrome Bernard-Soulier, forma monoalélica [mSBS] (153670)(anteriormente definida como trombocitopenia Mediterránea)	AD	<i>GP1BA, GP1BB</i>	TCP	Trombocitopenia leve-moderada. Tendencia al sangrado ausente-moderada.	47,82,83
Enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario [EVW-TP] (177820)	AD	<i>GP1BA</i>	TCP	Trombocitopenia leve-grave. El recuento plaquetario puede ser normal pero puede disminuir ante estrés hemostático. Presencia de agregados plaquetarios en frotis de sangre. Unión anormalmente alta de plaquetas a VWF e hiperagregación con dosis bajas de ristocetina debido a variantes de ganancia de función en GPIb α . Agregación de plaquetas lavadas inducible con crioprecipitado (no se da en la EVW tipo 2B). Ausencia de multímeros de alto peso molecular (como en la EVW tipo 2B). Tendencia al sangrado leve-moderada.	84
Trombocitopenia asociada <i>ITGA2B/ITGB3</i> (187800)	AD	<i>ITGA2B, ITGB3</i>	TCP	Trombocitopenia leve-moderada. Alterada expresión y activación de α IIb β 3. Tendencia al sangrado moderada. Algunas variantes monoalélicas en <i>ITGA2B/ITGB3</i> causan la activación constitutiva de α IIb β 3 generando un fenotipo similar a la forma variante de la Trombastenia de Glanzmann.	85-87
Síndrome DiGeorge/Velocardiofacial	AD	Deleción en 22q11.2 (<i>TBX1/GP1BB</i> , deleciones)	S	Trombocitopenia moderada. Anomalías cardíacas, insuficiencia de paratiroides y timo, retraso cognitivo, dismorfia facial. La mayoría presentan alteraciones en el desarrollo. Tendencia hemorrágica leve-grave. La diátesis hemorrágica puede deberse a la disfunción plaquetaria (ausente en algunos casos) pero también por alteraciones como insuficiencia velofaríngea, irritación nasal	88

				crónica, alergias nasales o multímeros anormales del VWF.	
Síndrome Jacobsen (147791), Trombocitopenia Paris-Trousseau (188025)	AD	Deleciones en 11q23	S	Trombocitopenia moderada- severa; puede mejorar con el tiempo. Malformaciones cardíacas, faciales, del tracto urinario, renales o del sistema nervioso central; retraso mental; gránulos de plaquetas gigantes. Tendencia hemorrágica leve-grave.	89
Trombocitopenia asociada a <i>FLI1</i> (61744)	AD/AR	<i>FLI1</i>	TCP	Trombocitopenia leve-moderada. Gránulos plaquetarios grandes. Tendencia al sangrado ausente o moderada (formas monoalélicas y bialélicas, respectivamente).	90,91
Trastornos asociados a <i>GATA1</i> (314050; 300367)	XL	<i>GATA1</i>	S	Trombocitopenia leve-grave. Puede asociarse a diseritropoyesis con/sin anemia, β -talasemia, neutropenia, esplenomegalia o porfiria eritropoyética congénita); megacariocitos displásicos. Deficiencia de gránulos plaquetarios y defecto funcional. Existe una forma rara asociada con el grupo sanguíneo Lu a- b- (Lu nulo). Tendencia hemorrágica leve- grave.	92,93
Trombocitopenia asociada a <i>GFI1b</i> (187900)	AD/AR	<i>GFI1B</i>	TCP	Trombocitopenia leve-grave (formas monoalélicas y bialélicas). Glóbulos rojos con anisopoiquilocitosis, megacariocitos displásicos, emperipolesis. Defecto de gránulos plaquetarios α/δ y de agregación. Expresión anormal de CD34 ⁺ en plaquetas. Tendencia al sangrado grave en formas bialélicas, pero no en monoalélicas.	94,95
Síndrome de la plaqueta gris [SPG] (139090)	AR	<i>NBEAL2</i>	S	Trombocitopenia moderada-grave, con plaquetas grisáceas, que podría agravarse con el tiempo. Defecto de α -gránulos y de proteínas α -granulares (β -TG, PDGF, vWF, etc.). Disfunción plaquetaria con agonistas débiles. En algunos pacientes, defectos selectivos de GPVI y de activación con colágeno. Elevados niveles séricos de vitamina B12. Mielofibrosis temprana; esplenomegalia ocasional; predisposición a enfermedades autoinmunes. Tendencia hemorrágica moderada-grave.	41,43
Trombocitopenia asociada a G6b-B (617441)	AR	<i>MPIG6B</i>	S	Trombocitopenia leve-grave; megacariocitos atípicos. Anemia microcítica, leucocitosis, mielofibrosis. Tendencia hemorrágica leve-moderada.	96
Enfermedad asociada a <i>MYH9</i> -	AD	<i>MYH9</i>	S	Trombocitopenia leve-moderada; menos frecuentemente severa.	32,33

related, [MYH9-RD] (155100)				En muchos casos, inclusiones neutrofílicas (cuerpos de Döhle), pérdida de audición, enfermedad renal, enfermedad hepática, cataratas; relación genotipo-fenotipo. Tendencia al sangrado ausente-leve.	
Trombocitopenia asociada a sitosterolemia	AR	<i>ABCG5, ABCG8</i>	S	Trombocitopenia leve-moderada. Elevados niveles plasmáticos de esteroides vegetales. Xantomas en tendones y xantelasmas. Aterosclerosis prematura; anemia hemolítica con estomatocitosis. También puede ser trombocitopenia no sindrómica. Tendencia hemorrágica leve-moderada.	36,37
Trombocitopenia asociada a <i>FLNA</i>	XL	<i>FLNA</i>	S	Trombocitopenia moderada. Heterotopía periventricular nodular; malformaciones esqueléticas, retraso mental, distrofia de las válvulas cardíacas, obstrucción intestinal, displasia ósea. Puede asociarse con el síndrome de Ehlers-Danlos. También puede ser trombocitopenia no sindrómica. Tendencia hemorrágica leve.	97,98
Trombocitopenia asociada a <i>TUBB1</i> (613112)	AD	<i>TUBB1</i>	TCP	Trombocitopenia leve-moderada. Algunos pacientes presentan un recuento plaquetario normal con plaquetas grandes. Clínica de sangrado leve y ausente en muchos casos.	29,99
Trombocitopenia asociada a <i>ACTN1</i> (615193)	AD	<i>ACTN1</i>	TCP	Trombocitopenia y disfunción plaquetaria moderada. Se pueden ver algunas plaquetas gigantes. Tendencia hemorrágica leve o ausente.	29,100
Trombocitopenia asociada a <i>DIAPH1</i>	AD	<i>DIAPH1</i>	S	Trombocitopenia leve (en ocasiones recuento normal), neutropenia moderada con bajo-moderado riesgo de infecciones; sordera neurosensorial temprana. Sangrado ausente o leve.	101
Trombocitopenia asociada a <i>SLFN14</i> (616913)	AD	<i>SLFN14</i>	TCP	Trombocitopenia leve- moderada. Defecto en la secreción de gránulos δ . Mayor número de plaquetas inmaduras. Tendencia hemorrágica leve-moderada.	102
Trombocitopenia asociada a <i>SRC</i> [<i>SRC-RT</i>] (trombocitopenia tipo- 6) (616937)	AD	<i>SRC</i>	S	Trombocitopenia leve-grave Defecto de los gránulos plaquetarios, mielofibrosis y edentulismo temprano, dismorfia facial. Alteraciones neurológicas. Gran número de megacariocitos, con características inmaduras como núcleos hipolobulados. Tendencia a hemorragia leve a grave.	103,104

Trombocitopenia asociada a <i>TPM4</i>	AD	<i>TPM4</i>	TCP	Trombocitopenia leve. Clínica hemorrágica leve o ausente-.	105
Trombocitopenia asociada a <i>TRPM7</i> [<i>TRPM7-RT</i>]	AD	<i>TRPM7</i>	TCP	Trombocitopenia moderada. Tendencia hemorrágica leve.	106
Trombocitopenia asociada a <i>PRKACG</i> [<i>PRKACG-RT</i>](616176)	AR	<i>PRKACG</i>	TCP	Macrotrombocitopenia grave. Defecto de fosforilación de proteínas dependiente de PKA (filamina A, GPIIb β). Tendencia a hemorrágica severa.	107
Síndrome Takenouchi-Kosaki con macrotrombocitopenia (616737)	AD	<i>CDC42</i>	S	Trombocitopenia moderada. Alteración intelectual y del crecimiento y desarrollo psicomotor. Posibles anomalías cerebrales, faciales/musculares/esqueléticas. Además, inmunodeficiencia, eccema, discapacidad auditiva/visual, linfedema y malformaciones cardíacas o genitourinarias. Sin tendencia al sangrado	108
Trombocitopenia asociada a <i>GNE</i>	AR	<i>GNE</i>	S	Trombocitopenia severa. Miopatía con vacuolas bordeadas desde la edad adulta temprana. Trombocitopenia aislada en algunos pacientes. Aumento de plaquetas reticuladas, sugiriendo un aclaramiento plaquetario acelerado. Tendencia hemorrágica leve-grave.	109
Trombocitopenia asociada a <i>GALE</i>	AR	<i>GALE</i>	S	Trombocitopenia severa. Galactosemia, anemia y neutropenia febril. Tendencia a hemorrágica severa.	110
Trombocitopenia asociada a <i>SLC35A1</i>	AR	<i>SLC35A1</i>	S	Trombocitopenia moderada. Deterioro del desarrollo psicomotor, epilepsia, ataxia, microcefalia y movimientos coreiformes. Clínica hemorrágica leve.	111
Trombocitopenia asociada a <i>ACTB</i>	AD	<i>ACTB</i>	S	Trombocitopenia leve-moderada. Leucocitosis con eosinofilia o leucopenia. Otras posibles características son microcefalia, anomalías faciales menores, retraso en el desarrollo y discapacidad intelectual leve. Sin tendencia al sangrado	112
TROMBOCITOPENIAS CONGÉNITAS CON PLAQUETAS PEQUEÑAS					
Síndrome Wiskott-Aldrich [<i>WAS</i>](301000)	XL	<i>WAS</i>	S	Trombocitopenia severa. Inmunodeficiencia, eccema, trastornos linfoproliferativos y autoinmunes. Tendencia hemorrágica severa.	35

Trombocitopenia asociada al cromosoma X [XLT] (trombocitopenia tipo 1) (313900)	XL	WAS	S	Trombocitopenia moderada-grave. Forma leve de Wiskott-Aldrich. Posible inmunodeficiencia y eccema leve. Mayor riesgo de malignidad y trastornos autoinmunes. Tendencia hemorrágica moderada o ausente,	35
Trombocitopenia asociada a <i>FYB</i> (Trombocitopenia asociada a ADAP) (Trombocitopenia tipo 3)(273900)	AR	<i>FYB</i>	TCP	Trombocitopenia moderada-grave. Hiperactivación plaquetaria basal. Activación alterada de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Tendencia hemorrágica leve-moderada.	113
Trombocitopenia asociada a <i>ARCP1B</i> (617718)	AR	<i>ARCP1B</i>	S	Trombocitopenia moderada-grave. En algunos casos, recuentos plaquetarios normales. Eosinofilia, enfermedad inflamatoria inmunomediada, eccema, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia. Alteraciones en el crecimiento. Tendencia hemorrágica moderada.	114
Trombocitopenia asociada a <i>PTPRJ</i> (Trombocitopenia asociada a CD148) [PTPRJ-RT]	AR	<i>PTPRJ</i>	TCP	Trombocitopenia moderada-grave. Hasta ahora, se ha identificado un solo pedigrí con PTPRJ-RT. Reactividad plaquetaria alterada con agonistas de GPVI (colágeno, PCR, convulxina). Defecto de activación de quinasa de tipo SRC. Defecto de maduración de megacariocitos. Tendencia hemorrágica leve- moderada.	115

Her: herencia; **AD:** autosómica dominante; **AR:** autosómico recesivo; **XL:** ligado al cromosoma X; **TCP:** trombocitopenia aislada; **S:** asociada a síndromes o enfermedades adicionales; **NH:** predisponente a neoplasias hematológicas y/o sólidas. EVW: Enfermedad de von Willebrand.

Tabla 2. Trastornos Plaquetarios Congénitos por alteración en receptores plaquetarios.

Receptor	Enfermedad (Código OMIM)	Her.	Gen	Fenotipo clínico y de laboratorio reportado en la mayoría de casos	Ref
Ib/IX/V	Síndrome de Bernard-Soulier [SBS] (231200)	AR	<i>GP1BA</i> , <i>GP1BB</i> , <i>GP9</i>	Ver Tabla 1	-
	Enfermedad de von Willebrand de tipo	AD	<i>GP1BA</i>	Ver Tabla 1	-

plaquetario [EVW-TP] (177820)					
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Glanzmann Trombastenia de Glanzmann [TG] (273800)	AR	<i>ITGA2B</i> , <i>ITGB3</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. LTA muy reducida con todos los agonistas (ADP, TxA2, colágeno, trombina). LTA con ristocetina normal o 2ª onda reducida. Retracción del coágulo ausente-reducida. Defecto en la expresión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ por citometría de flujo: tipo I <5%; tipo II 10-20%; variante de TG con incluso > 50% $\alpha_{IIb}\beta_3$ no funcional. Tendencia hemorrágica severa.	29,116,117
P2Y12	Deficiencia del receptor de ADP (609821)	AD/AR	<i>P2RY12</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. LTA disminuida con ADP. Con otros agonistas LTA normal o 2ª onda reducida. Ausencia del efecto inhibidor del ADP sobre la síntesis de AMPc inducida por PGE1. Alterada desfosforilación de VASP por estimulación con ADP. Tendencia hemorrágica leve-moderada. Sangrado asociado con la ingesta de antiagregantes plaquetarios, intervenciones dentales u otros compromisos hemostáticos.	29,118,119
TxA ₂ -R (TP α)	Deficiencia del receptor de TxA ₂ (614009)	AD/AR	<i>TBXA2R</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. LTA ausente o muy reducido con ácido araquidónico o análogos de TxA2 (U46619 o STA2). Con otros agonistas LTA normal o 2ª onda reducida. Tendencia hemorrágica leve-moderada. Sangrado asociado con la ingesta de antiagregantes plaquetarios, intervenciones dentales u otros desafíos hemostáticos. Sangrado postoperatorio	9,120
GPVI	Deficiencia del receptor de colágeno GPVI (614201)	AR	<i>GP6</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. LTA ausente o muy reducido con colágeno y agonistas de GPVI como péptido relacionado con colágeno [CRP] o convulxina. Secreción de gránulos y fosforilación de tirosinas en respuesta a agonistas de GPVI reducida. Tendencia hemorrágica leve-moderada. Sangrado asociado con la ingesta de antiagregantes plaquetarios, intervenciones dentales u otros compromisos hemostáticos.	9,121
EPHB2	Defecto en el receptor 2 de efrina tipo-B (618262)	AR	<i>EPHB2</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. Alterada LTA y secreción de gránulos con múltiples agonistas. Defecto en la señalización del receptor GPVI y en la señalización <i>inside out</i> de la $\alpha_{IIb}\beta_3$. Tendencia hemorrágica moderada-grave.	122

Her: herencia; **AD:** autosómica dominante; **AR:** autosómico recesivo; **LTA:** agregometría de transmisión de luz; **VWF:** factor von Willebrand; **ADP:** adenosin difosfato.

Tabla 3. Trastornos Plaquetarios Congénitos por alteración de gránulos.

Gránulos	Enfermedad (Código OMIM)	Her.	Gen	Fenotipo clínico y de laboratorio reportado en la mayoría de casos	Ref
α y δ	Deficiencia idiopática	AD/AR	Nc	Recuento de plaquetas normal-ligeramente disminuido y morfología plaquetaria normal. Defecto de gránulos α y δ por microscopía electrónica. LTA reducida y/o ausencia de 2ª onda de agregación con agonistas débiles/dosis bajas (ADP, epinefrina, colágeno). Defecto de la liberación de proteínas granulares por citometría de flujo. Síntomas hemorrágicos ausentes o muy moderados, asociados a situaciones de alto riesgo hemorrágico.	41,42
α	Síndrome de la plaqueta gris [SPG] (139090)	AR AD	<i>NBEAL2</i> <i>GFI1B</i>	<i>Ver Tabla 1</i>	-
	Síndrome Quebec [SQ] (601709)	AD	<i>PLAU</i>	Trombocitopenia moderada y morfología normal. LTA ausente-reducida con epinefrina, normal con otros agonistas. Defecto de la actividad plaquetaria procoagulante, y aumento de la actividad fibrinolítica. Defecto de la proteína de gránulos α por citometría de flujo (P-selectina, factor V). Sangrado mucocutáneo, visceral y/o posquirúrgico. Respuesta a los antifibrinolíticos pero falta de respuesta a las transfusiones de plaquetas.	123
δ	Síndrome Hermansky-Pudlak [SHP] (203300, 608233, 614072, 614073, 614074, 614075, 614076, 614077, 614171, 617050, 619172)	AR	<i>HPS1</i> , <i>HPS2-[AP3B1]</i> , <i>HPS3</i> , <i>HPS4</i> , <i>HPS5</i> , <i>HPS6</i> , <i>HPS7-[DTNBP1]</i> <i>HPS8-[BLOC1S3]</i> <i>HPS9-[BLOC1S]</i> <i>HPS10-[AP3D1]</i> , <i>HPS11</i> <i>[BLOC1S5]</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. Defecto de gránulos δ por microscopía electrónica. LTA reducida y/o ausencia de 2ª onda con agonistas débiles/dosis bajas (ADP, epinefrina, colágeno). Defectos en la captación de serotonina radiomarcada, captación de mepacrina y liberación de CD63 mediante citometría de flujo. Albinismo oculocutáneo; acumulación de material ceroides similar a la lipofuscina en células del sistema mononuclear fagocítico; neutropenia; inmunodeficiencia; fibrosis pulmonar; colitis granulomatosa según subtipo. Relación genotipo-fenotipo. Tendencia a hemorragia leve-moderada.	41,42,44, 124,125
	Síndrome Chediak-Higashi [SCH]	AR	<i>LYST</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. Defecto de gránulos δ por microscopía electrónica. LTA reducida y/o ausencia de 2ª onda de agregación con agonistas	41,42,45

(214500)				débiles/dosis bajas (ADP, epinefrina, colágeno). Defectos en la captación de serotonina radiomarcada, captación de mepacrina y liberación de CD63 mediante citometría de flujo. Albinismo oculocutáneo; Inmunodeficiencia con predisposición a infecciones recurrentes. En el 85% de los casos evoluciona a linfocitosis hemofagocítica con fase acelerada. Una forma juvenil más leve puede ser causada por variantes <i>missense</i> que mantienen la expresión/función de Lyst. Relación genotipo-fenotipo. Tendencia hemorrágica leve-moderada.	
Síndrome Griscelli [SG] (214450, 607624, 609227)	AR	<i>RAB27 MYO5A MLPH</i>		Recuento y morfología plaquetaria normal. Defecto de gránulos δ como en SHP y SCH. Neutropenia variable. Albinismo, cabello plateado, defectos neurológicos, linfocitosis, disminución de la función citotóxica de células NK y linfocitos T, según subtipo.	41,42,12 6
Deficiencia del pool de depósito δ	AD/AR	-		Recuento normal de plaquetas. Reducción de la 2ª onda de agregación con agonistas débiles/dosis bajas (ADP, epinefrina, colágeno). Ausencia de gránulos δ en microscopía electrónica. Tendencia hemorrágica ausente-leve.	41,42

Her: herencia; **AD:** autosómica dominante; **AR:** autosómico recesivo; **Nc:** no conocido; **LTA:** agregometría de transmisión de luz; **ADP:** adenosín difosfato.

Tabla 4. Otros Trastornos Plaquetarios Congénitos.

Elemento afectado	Enfermedad (Código OMIM)	Her.	Gen	Fenotipo clínico y de laboratorio de los casos más reportados	Ref
Actividad enzimática/ rutas de señalización	Defecto en rutas de TxA2 (176805, 231095, 600522)	AR/AD	<i>PTGS1</i> <i>TBXAS1</i> <i>PLA2G4A</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. Ocasionalmente, trombocitopenia ocasionalmente moderada. LTA selectivamente reducida con ácido araquidónico y normal con análogos de TxA2 como U46619; reducida con agonistas débiles/dosis bajas (ADP, epinefrina, colágeno). Defecto de generación de TxA2 sérico. La variante heterocigota en <i>PTGS1</i> que afecta a la N-glicosilación puede tener un efecto dominante negativo. La osteoporosis es una característica del síndrome de Ghosal (defecto <i>TBXAS1</i>); la ulceración gastrointestinal recurrente puede asociarse a un defecto de <i>PLA2G4A</i> . Síntomas hemorrágicos ausentes o moderados y generalmente asociado con situaciones de compromiso hemostático.	9,127-129
	Defecto en proteínas G	-	<i>GNAS</i> <i>GNAQ</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. La hiperfunción Gs puede estar asociada con macrotrombocitopenia y trastornos neurológicos. Reducción de LTA y	9,130,131

	(Gi, Gq, Gs, Gz,)		<i>GNAZ</i> <i>GNAI1</i>	secreción en respuesta a múltiples agonistas solubles. Síntomas hemorrágicos moderados, principalmente asociados a situaciones de compromiso hemostático.	
	Defecto en CalDAG-GEF1 (615888)	AR	<i>RASGRP2</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. Defecto de LTA, secreción de gránulos y activación de la integrina $\alpha II\beta 3$ con agonistas débiles. Respuesta normal o moderadamente reducida a PMA	132-135
	Síndrome LAD-III (Deficiencia de Kindlin-3) (612840)	AR	<i>FERMT3</i>	Síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria tipo 3 (LADIII): infecciones, mala cicatrización, osteopetrosis. Tendencia hemorrágica grave, incluso más grave que la Trombastenia de Glanzmann	136
Actividad procoagulante	Síndrome Scott (262890)	AR	<i>ANO6</i> <i>[TREM16F]</i>	Recuento y morfología plaquetaria normal. Disminución de la generación de micropartículas y de la unión a plaquetas de anexina V, en respuesta a agonistas por citometría de flujo. Formación/retracción anormal del coágulo. Sangrado moderado- severo; principalmente en situaciones de riesgo hemorrágico.	9,137
	Síndrome Stormorken (185070)	AD	<i>STIM1</i> <i>ORAI1</i>	<i>Ver Tabla 1</i>	-

Her: herencia; **AD:** autosómica dominante; **AR:** autosómico recesivo; **LTA:** agregometría de transmisión de luz; **TxA2:** Tromboxano A2; **LAD:** Deficiencia de adhesión leucocitaria.

2. Terapia génica

2.1. Generalidades

En los últimos años, la terapia génica se ha postulado como una de las ramas de la medicina más prometedoras, ya que ofrece nuevas opciones de tratamiento curativo para patologías de gran severidad. Básicamente, la terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (ADN o ARN) exógenos en la célula diana con la intención de prevenir o curar una enfermedad congénita o adquirida¹³⁸. Dependiendo de la patología a tratar, la terapia génica se sirve esencialmente de dos estrategias:

- La adición génica (“*gene adition*”): se basa en introducir una copia correcta del gen defectuoso en la célula diana. En este enfoque terapéutico, no se pretende modificar el gen defectuoso, sino complementar la célula con una copia sana. Atendiendo al vector de transferencia empleado, el gen terapéutico puede permanecer estable en estado episomal o integrarse de forma randomizada en cualquier locus del genoma de la célula¹³⁹.
- La edición génica (“*gene editing*”): consiste en realizar de forma dirigida una modificación *in situ* en la secuencia “errónea” del ADN de la célula diana. Se puede emplear con varios fines como son la corrección de mutaciones patogénicas, o la eliminación de secuencias o genes con el fin de inactivar la expresión de genes deletéreos^{140,141}

Las moléculas de ácidos nucleicos por sí solas no son capaces de penetrar en la célula de manera eficiente debido a su gran tamaño y naturaleza hidrofílica (presentan carga negativa por el grupo fosfato)¹⁴². Por ello, para la adición génica se han desarrollado una amplia variedad de vectores o técnicas de transferencia génica (o “*gene delivery*”) entre las que se incluyen los vectores virales, los métodos físicos (como la electroporación o inyección génica) y los químicos (como liposomas o polímeros catiónicos o nanopartículas)^{143–145}. A pesar de que los métodos físicos y químicos pueden ser un sistema más seguro (menor toxicidad e inmunogenicidad), los vectores virales son el sistema de transferencia génica más eficiente y por ello el más utilizado en la clínica¹⁴⁶. De hecho, en los últimos años se han incrementado el número de ensayos clínicos que usan de vectores virales para el tratamiento de enfermedades genéticas, de cáncer o incluso para el desarrollo de vacunas¹⁴². Los virus *per sé* son vectores naturales, son organismos altamente evolucionados capaces de introducir información genética exógena en la célula que infectan. La terapia génica se sirve de esta capacidad de infección y ha transformado estos patógenos en un medio de transporte para proporcionar el gen terapéutico a la célula diana¹⁴⁷. Actualmente existen una gran variedad de vectores virales, sin embargo, los tres vectores que dominan el campo de la clínica son los diseñados a partir de Adenovirus, virus Adeno-Asociados y lentivirus (**Tabla 5**)^{142,148}.

Tabla 5. Características de los principales vectores virales empleados en preclínica y en ensayos clínicos.

	Adenovirales	Adeno-asociados	Lentivirus
Envuelta	No	No	Sí
Material genético	ADN Doble cadena	ADN Cadena simple	ARN Cadena simple
Capacidad	~7,5 kb	~4,5 kb	~8.5 kb
Integración de genoma en huésped	No	No	Sí, (ningún efecto genotóxico descrito hasta el momento en pacientes)
Expresión del transgén	Transitoria	Transitoria	Estable a largo plazo
Tejidos	Mayoría de ellos	-Con baja tasa de división (músculo, hígado). -Hay distintos serotipos.	Con alta tasa de división
Eficiencia de transducción	Alta	Media	Alta
Inmunogenicidad	-Alta -Administración parenteral puede originar inflamación sistémica grave/letal. -Indicada la administración a nivel local.	Muy baja	Baja
Inactivación en sangre por unión a componentes sanguíneos	Sí	No	-
Aplicación	Desarrollo de vacunas y en cáncer, donde es posible una respuesta inmune, una administración local y una expresión temporal del gen.	Dado su perfil seguro, destacan en terapia génica <i>in vivo</i> para enfermedades congénitas	Terapia génica <i>ex vivo</i> para: 1) enfermedades congénitas, en especial las hematológicas; 2) para diseñar células CART para inmunoterapia en cáncer

Del mismo modo, para la alternativa de “*gene editing*” también se han desarrollado varias herramientas con las que manipulan de forma permanente e *in situ* el genoma de la célula afectada. Los sistemas de edición génica se basan en la ingeniería de nucleasas capaces de inducir cortes específicos en la doble cadena de ADN. Tras la rotura del ADN, estos sistemas se aprovechan de los mecanismos de reparación de ADN endógenos de la propia célula para realizar cambios específicos en el genoma^{140,149,150}. Actualmente, entre los sistemas de edición génica destacan las “*Zinc Finger Nucleases*” [ZFN], las “*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*” [TALEN] y el más reciente, el sistema “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*” [CRISPR/Cas]¹⁵¹. Las ZFN y TALENs son nucleasas que presentan una región catalítica encargada de generar los cortes en el ADN y una región de reconocimiento de la secuencia diana que se quiera editar. La aplicación de estas dos herramientas es cada vez más limitada por varias razones: la complejidad de su diseño requiere de personal

altamente especializado en biología molecular¹⁵²; suponen un coste elevado, ya que es necesario generar una proteína diferente para cada región del genoma que se quiera editar^{139,153,154}; y en el caso de las TALEN, su tamaño limita el empaquetamiento en vectores de transferencia^{154,155}. Sin embargo, como se detalla más abajo, la llegada del sistema CRISPR/Cas9 ha revolucionado el campo de la edición génica ya que a diferencia de las herramientas anteriores, este sistema es capaz de editar el genoma de forma mucho más sencilla y menos costosa¹⁴⁹. Por último, el abanico de posibilidades en la terapia génica es aún más complejo ya que tanto la estrategia de adición como la de edición génica pueden ser *in vivo* o *ex vivo*^{156,157} (**Figura 4**) La terapia génica *in vivo* consiste en administrarle al paciente el gen corregido o el sistema de edición a través de un vector que es capaz de localizar de manera específica la célula diana y transferirle su contenido. Para transportar *in vivo* el gen terapéutico, destaca el uso de vectores adenoasociados [AAV] dado su perfil de seguridad (baja inmunogenicidad y genotoxicidad) y por el tropismo que los distintos serotipos muestran por determinados órganos¹⁴⁷. De hecho, el primer fármaco de terapia génica aprobado en Europa fue Glybera® que es un AAV de inyección intramuscular para el tratamiento de deficiencia de lipoproteína lipasa¹⁵⁸. Dirigirse al órgano afectado directamente es un enfoque atractivo ya que nos permite evitar los obstáculos de la terapia génica-celular *ex vivo* donde se requiere la obtención de las células afectadas, su cultivo, manipulación y su trasplante. Sin embargo, la aplicación de la terapia *in vivo* está muy limitada por varias razones entre las que se incluye la elevada especificidad que debe de haber entre la célula diana y el vector; la accesibilidad al tejido dañado; la potencial modificación involuntaria de la línea germinal, y la respuesta inmune que se desata con la entrada del vector. A pesar de las dificultades, numerosos ensayos clínicos han sorteado algunos de estos obstáculos mostrando resultados muy alentadores en la corrección de patologías asociadas al hígado, la retina, el musculo o el cerebro^{138,139}. En el contexto de la hematología, su potencial curativo ya se ha demostrado en la hemofilia A y B, a través de la inyección intravenosa de un adenoasociado con los factores VIII o IX¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Por último, en lugar de introducir el gen directamente en el cuerpo del paciente una alternativa es la terapia génica *ex vivo* que consiste en aislar las células diana del paciente, manipularlas *in vitro*, y una vez se han editado genéticamente se infunden de nuevo en el paciente. Con esta aproximación, todo el cuerpo del paciente no está directamente expuesto a los vectores lo que aumenta la seguridad y especificidad del tratamiento, y además permite la expansión y/o selección de las células que han incorporado la modificación deseada. Como se menciona más abajo, la terapia génica *ex vivo* se está desarrollando principalmente en el contexto de las enfermedades hematológicas monogénicas a través del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos modificados, y en inmunoterapia en cáncer para el desarrollo de células “Chimeric Antigen Receptor T-Cell” [“CAR-T cells”]^{143,162,163}.

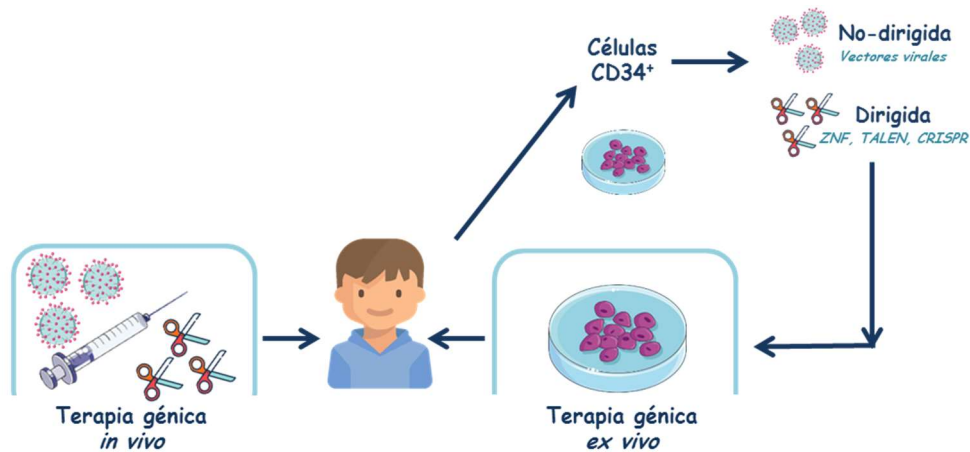


Figura 4. Terapia génica in vivo y ex vivo.

2.2 Terapia génica ex vivo: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos modificados genéticamente

El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas [HSCT] constituye el único tratamiento curativo disponible para pacientes con trastornos hematológicos graves y alto riesgo de mortalidad. Aunque su eficacia está demostrada, su uso está muy limitado por la dificultad de encontrar donantes HLA compatibles y por la morbilidad del proceso del trasplante como complicaciones muy relevantes como la enfermedad de injerto contra huésped o la baja tasa de injerto que conllevan una tasa de mortalidad a veces superior a la de la propia enfermedad¹⁶⁴. Una alternativa prometedora para limitar esta respuesta hiperinmune, es el trasplante de células madre autólogas modificadas genéticamente. Esta estrategia de terapia génica *ex vivo* consiste en movilizar a sangre periférica las células madre hematopoyéticas del paciente, aislarlas y transducirlas *in vitro* con un vector viral que transporta una copia correcta del gen defectuoso. Una vez corregidas se re-infunden en el paciente siguiendo un régimen de acondicionamiento determinado (**Figura 4**). Las células corregidas son capaces de repoblar la médula ósea del paciente y reconstituir todos los linajes hematopoyéticos^{138,141}. La relativa facilidad de aislar y trasplantar las células madre hematopoyéticas, junto con su capacidad de auto-renovación y diferenciación en todas las células del sistema hematopoyético ha hecho que sean una diana ideal para la terapia génica *ex vivo*^{162,164}. Por ello, los trastornos hematológicos han sido de los primeros en beneficiarse de los avances de la terapia génica, siendo el primer ensayo el diseñado para el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada severa por déficit de adenosina desaminasa [ADA-SICD]¹⁶⁵.

Los primeros ensayos clínicos demostraron la eficacia terapéutica de transducir con vectores gamma-retrovirales las células madre hematopoyéticas de pacientes con inmunodeficiencias primarias como la inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X [SCID-X1]¹⁶⁶⁻¹⁶⁸, la ADA-SICD^{169,170}, la enfermedad granulomatosa crónica [CGD]¹⁷¹ y el síndrome de Wiscott Aldrich [WAS]¹⁷². Sin embargo, a pesar de

que en todos los ensayos se consiguió la reconstitución inmunológica, años más tarde un limitado número de los pacientes tratados desarrolló leucemias mieloides y linfoides por la activación de proto-oncogenes debido a la integración de los vectores gamma-retrovirales en el genoma de la célula madre hematopoyética¹⁷¹⁻¹⁷⁷. Aunque se desconocen las causas de la excepción, los ensayos para la ADA-SCID han sido los únicos con vectores gamma-retrovirales en los que no se han detectado hasta el momento eventos oncológicos por mutagénesis insercional¹⁷⁸.

La predisposición a sufrir leucemias por el uso de los vectores gamma-retrovirales se debe a que estos vectores presentan un patrón de integración poco seguro ya que tienden a integrarse en elementos regulares del genoma como son promotores y “*enhancers*”¹⁷⁹. Además, en estos primeros ensayos clínicos se observó que los “*hotspots*” donde se integran estos vectores residen cerca de proto-oncogenes, siendo los más frecuentes *MDS1-EVI1*, *PRDM16*, *LMO2*, y *CCND2*^{163,173,176-178}.

En vista de los riesgos que presentaban estos vectores, los esfuerzos se centraron en el desarrollo de nuevos vectores modificados con un perfil de integración más seguro denominados “*self-inactivating*” [SIN] en los que se ha eliminado elementos “*enhancers*” en la regiones *long terminal repeat* [LTR] y en los que la expresión del gen terapéutico está dirigida por promotores internos no virales. La generación de nuevos vectores gammaretrovirales-SIN y lentivirales-SIN ha tenido un enorme impacto en el desarrollo clínico de la terapia génica actual y hasta ahora más de 200 pacientes se han tratado con éxito con estos vectores (**Tabla 6**) sin que se hayan observado ningún efectos adversos graves¹⁷⁸. En los últimos años los vectores lentivirales han dejado en segundo plano a los gamma-retrovirales ya que presentan un perfil más seguro al integrarse preferentemente en unidades génicas y no en regiones reguladoras¹⁸⁰.

A pesar de que cualquier enfermedad monogénica hematológica puede ser potencialmente tratada con un trasplante autólogo de progenitores modificados genéticamente, hasta el momento no se ha desarrollado ningún ensayo clínico de terapia génica para el tratamiento de un trastorno plaquetario congénito severo como la Trombastenia de Glanzmann o el Síndrome de Bernard Soulier. Únicamente se ha explorado esta opción terapéutica con lentivirus a nivel clínico en el caso del Síndrome de Wiskot Aldrich, con unos resultados muy satisfactorios.

Tabla 6. Ensayos clínicos de terapia génica *ex vivo* en los que se emplean vectores gammaretrovirales-SIN y lentivirales-SIN. Modificado de Cavazzana et al¹⁷⁸.

Enfermedad	Ensayo clínico (Fase)	Año inicio/País	Vector	C	N	
Inmunodeficiencias primarias						
SCID-X1	NCT01410019, NCT01129544 (I/II)	2010; Francia, EEUU	SIN gRV EF1aSprom-IL-2Rγ	No	9	
SCID-X1	NCT01306019 (I/II)	2011; USA	SIN LV EF1aSprom-IL-2Rγ	Si	8	
WAS	NCT01515462 (I/II)	2010; Italia	SIN LV WASprom-WAS	Si	7	

WAS	NCT01347346, NCT01347242 (I/II)	2011; Francia, Inglaterra	SIN LV WASprom-WAS	Si	1 1	
WAS	NCT01410825	2011; EEUU	SIN LV WASprom-WAS	Si	4	
ADA-SCID	NCT01380990, NCT01852071, NCT02999984 (I/II)	2012, Inglaterra, EEUU	SIN LV EF1 α Sprom-ADA	Si	6 1	
CGD	NCT02757911 (I/II)	2016; Francia	SIN LV Chimericprom-CYBB	Si	2	
CGD	NCT01855685 (I/II)	2013; Inglaterra, Alemania, Suiza	SIN LV Chimericprom-CYBB	Si	4	
CGD	NCT02234934 (I/II)	2015; EEUU	SIN LV Chimericprom-CYBB	Si	3	
ART-SCID	NCT03538899	2018; EEUU	SIN LV Artprom-DCLRE1C	Si	-	
Hemoglobinopatías						
β talasemia	LG001 (I/II)	2007; Francia	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	2	
β talasemia	NCT02151526 (I/II)	2013; Francia	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	4	
β talasemia	NCT01745120(I/II)	2013; EEUU, Australia, Tailandia	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	1 8	
β talasemia	NCT02453477 (I/II)	2015; Italia	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	9	
β talasemia	NCT01639690 (I)	2012; EEUU	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	4	
SCD	NCT02151526 (I/II)	2013; Francia	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	3	
SCD	NCT02140554 (I)	2014; EEUU	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	9	
SCD	NCT02247843 (I)	2014; EEUU	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	1	
SCD	NCT03282656 (I)	2018; EEUU	SIN LV LCR- β prom-BCL11A shRNA	Si	1	
SCD	NCT02186418 (I/II)	2014; EEUU, Jamaica	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Si	2	
Desórdenes metabólicos						
X-ALD	-	2006; Francia	SIN LV MNDprom-ABCD1	Si	4	
X-ALD	NCT01896102 (II/III)	2013; Inglaterra, EEUU, Francia	SIN LV MNDprom-ABCD1	Si	1 7	
MLD	NCT01560182 (I/II)	2010; Italia	SIN LV PGKprom-ARSA	Si	2 0	
MPS-I	NCT03488394	2018; Italia	SIN LV PGKprom-IDUA	Si	1	
Citopenia congénita						
Anemia Fanconi	NCT03157804 (I/II)	2016; España	SIN LV PGKprom-FANCA	No	4	
Anemia Fanconi	NCT01331018 (I)	2012; EEUU	SIN LV PGKprom-FANCA	Si	2	

C: Acondicionamiento; **N:** número de pacientes; **SCID-X1:** inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X; **WAS:** Síndrome de Wiskott–Aldrich; **ADA-SCID:** SCID por déficit de adenosina desaminasa; **CGD:** enfermedad granulomatosa crónica; **ART-SCID,** SCID por

deficiencia de Artemis; **SCD**: anemia falciforme; **X-ALD**: adrenoleucodistrofia asociada a X; **MLD**: leucodistrofia metacromática; **MPS-I**: mucopolisacaridosis tipo I; **LV**: lentivirus; **SIN**: auto-inactivante.

2.3. Vectores lentivirales en terapia génica

2.3.1 Estructura y replicación de los lentivirus

Los lentivirus pertenecen a la familia *Retroviridae*, cuya singularidad reside en la capacidad de integrarse de forma estable en el genoma de la célula huésped a través de la formación de una molécula intermediaria de ADN. El genoma de estos virus (8-12kb) está formado por dos moléculas de ARN monocatenario, de polaridad positiva, que constan de una caperuza en el extremo 5' y una cola de poliA en el 3'¹⁸¹.

La función y replicación de los lentivirus está mediada por tres genes clave: *gag* que codifica las proteínas estructurales que forman la matriz y la nucleocápside del virus; *pol* que codifica las enzimas necesarias para su replicación (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa) y *env* que codifica las proteínas de la envuelta (periféricas o transmembrana) relevantes para el reconocimiento de las células diana. Además de estos tres genes, el genoma de los lentivirus codifica proteínas reguladoras Tat y Rev que participan en la síntesis y transporte fuera del núcleo del ARN viral¹⁸². También presentan otros genes accesorios *vpr*, *vpu*, *nef* y *vif* relevantes para la propagación y virulencia del virus¹⁸³ (**Figura 5A-B**).

El ADN lentiviral está flanqueado por dos repeticiones largas terminales [LTR] necesarias para la transcripción, retro-transcripción e integración del virus¹⁸³. Una vez el ADN viral se ha integrado, el LTR del extremo 5' actúa como promotor de la transcripción por la ARN polimerasa de la célula huésped, mientras que el LTR 3' se encarga de la estabilización de los transcritos mediante su poliadenilación^{181,183}.

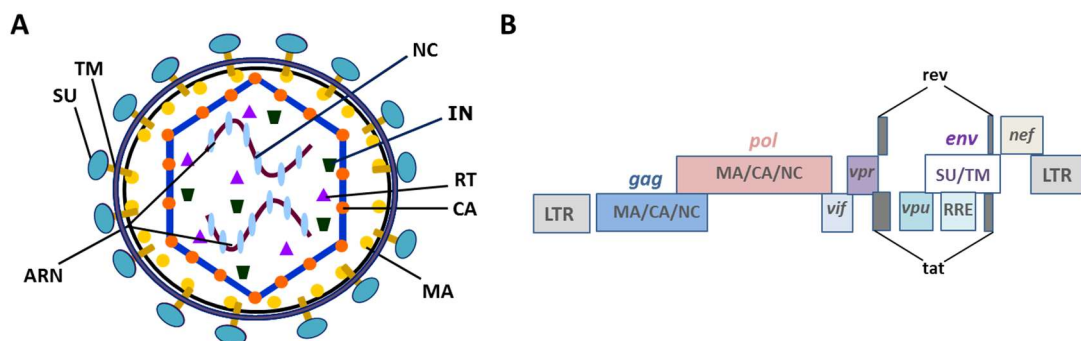


Figura 5. Esquema general de un lentivirus con las proteínas y genes que están presentes en la partícula viral. Se muestran las proteínas que forman la cápsida [CA], la matriz [MA] y la nucleocápsida [NC] que protege el genoma del virus y están codificadas por *gag*; la transcriptasa reversa [RT] e integrasa [IN] fundamentales para la integración del virus que están codificadas por *pol*; y las proteínas de la envuelta codificadas por *env*, la glicoproteína de superficie [SU] y la proteína transmembrana [TM]. Figura modificada de Sakuma et al.¹⁸³

El ciclo de replicación de los lentivirus (**Figura 6**) presenta varias etapas comunes a todos los retrovirus. En la primera etapa el virus reconoce receptores específicos de la célula diana a través de las glicoproteínas de su envuelta. Esta unión desencadena la fusión de las membranas vírica y celular, permitiendo la entrada del virión en el citoplasma de la célula, donde se liberan las proteínas y cadenas de ARN viral. Posteriormente, por la acción de la enzima retrotranscriptasa el ARN viral se convierte en ADN de doble cadena, el cual es transportado al núcleo e integrado en el genoma de la célula diana con ayuda de la enzima integrasa. La integración del virus puede ocurrir en cualquier lugar del genoma, aunque en el caso de los lentivirus se ha descrito su preferencia por unidades de transcripción. El genoma proviral emplea la maquinaria celular para sintetizar el ARN y las proteínas virales. Finalmente, se produce el ensamblaje de las proteínas y ARN viral para sintetizar las nuevas partículas virales que serán liberadas al espacio extracelular¹⁸⁴.

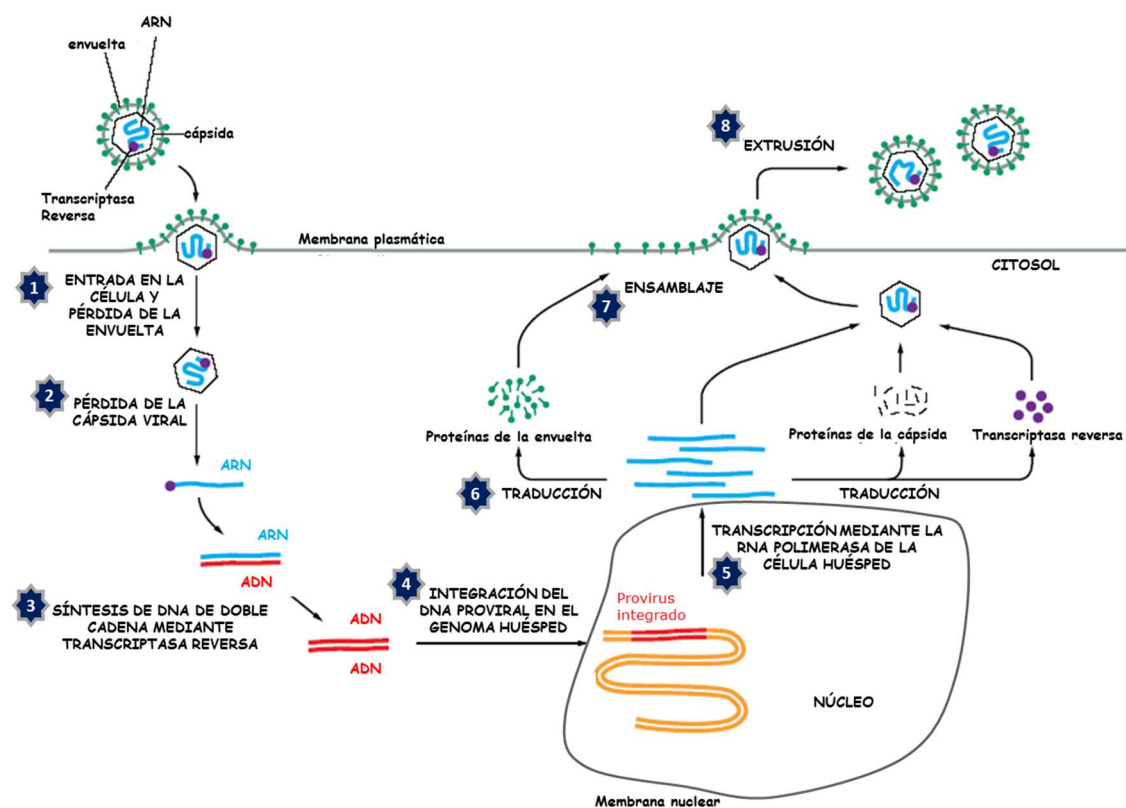


Figura 6. Ciclo vital de un lentivirus.

2.3.2 Diseño de vectores lentivirales

Los vectores lentivirales son lentivirus cuyo genoma ha sido modificado para que pierdan la capacidad de replicación, es decir, una vez se han integrado en el genoma de una célula diana, no pueden propagarse a otras células¹⁴⁷. En terapia génica los vectores lentivirales que se utilizan derivan del virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 [VIH-1].

Los vectores lentivirales son muy utilizados en la clínica por varias razones^{142,148,183}: 1) ofrecen una integración estable y segura del transgén en el genoma de la célula diana

ya que preferentemente se integran dentro de unidades génicas¹⁸⁰; 2) presentan una capacidad de empaquetamiento media (de hasta 8.5kb); 3) pueden infectar células en división o quiescentes ya que se traslocan al núcleo a través de los poros nucleares¹⁸⁵; 4) presentan una alta eficiencia de transducción, sobre todo en células madre hematopoyéticas; 5) su manipulación y producción no supone una gran dificultad¹⁸³.

La estrategia universal para la producción de vectores viral consiste en dividir el genoma de los virus en varias moléculas de ADN distintas que serán co-transfectadas en una línea celular productora del virus¹⁴⁷. Así, en el caso de los lentivirus, su producción se lleva a cabo con la co-transfección de la línea celular 293 T con el vector de transferencia que contiene el esqueleto del lentivirus modificado; junto con otros dos plásmidos, el vector de la envuelta y el de empaquetamiento que aportan los genes que se han eliminado del esqueleto del virus pero que son necesarios para la síntesis del vector¹⁸³ (**Figura 7**).

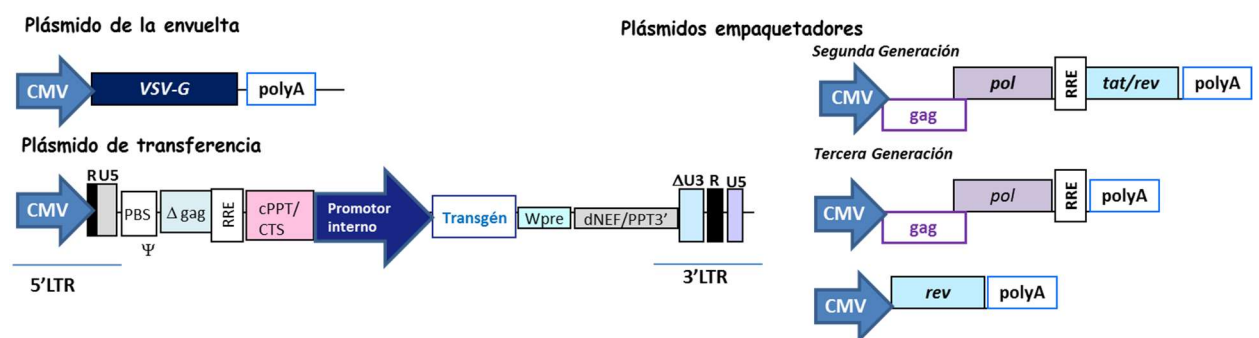


Figura 7. Plásmido de empaquetamiento, de la envuelta y de transferencia de segunda y tercera generación.

El **plásmido de empaquetamiento** contiene en *trans* los genes necesarios para el ensamblaje y replicación del virus. Los vectores se clasifican en distintas generaciones dependiendo del vector de empaquetamiento que se emplee¹⁸⁶. En los vectores de 1ª generación el plásmido contiene los genes virales (*gag*, *pol*, *tat*, *rev*, y los accesorios *vif*, *vpr*, *vpu*, y *nef*) excepto los de la envuelta. En los vectores de segunda generación, para desarrollar un vector más seguro se eliminan del vector de empaquetamiento los genes indispensables para la replicación del virus *vif*, *vpr*, *vpu*, y *nef*¹⁸⁷. Más tarde, en los vectores de 3ª generación se eliminan las secuencias *tat*, y el vector de empaquetamiento se subdivide en un vector con los genes *gag-pol* y en otro con el gen *rev*¹⁸⁸.

El **plásmido de la envuelta** contiene los genes que codifican las proteínas de la envuelta. En la optimización de los vectores se pueden sustituir las proteínas wild-type de la envuelta por otras en un proceso denominado "*pseudotyping*". De todas las envueltas empleadas en vectores lentivirales la más utilizada es la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Esta envuelta es más estable, permitiendo la producción de títulos virales altos¹⁸⁹ y una transducción eficiente de células hematopoyéticas CD34⁺¹⁸³

Por último, el **vector de transferencia** que contiene el gen terapéutico junto con secuencias virales reguladoras en *cis* (LTRs, PBS, Δ gag, la señal de empaquetamiento Ψ y las secuencias *att*) necesarias para el empaquetamiento del genoma viral, la transcripción inversa y la integración, pero no proteínas virales¹⁸³. Además, en el esqueleto del lentivirus se han introducido elementos para optimizar la producción y transducción del vector. Se han incluido las secuencias cPPT/CTS [central polipurine tract/central terminal sequence] y el elemento RRE [*Rev response element*] que aumentan la eficiencia de la transducción porque facilitan el transporte al núcleo del ARN viral^{183,190}. Otro elemento *cis* que se ha usado para mejorar la expresión del transgén en la célula diana es la secuencia WPRE [elemento post-transcripcional del virus de la Hepatitis B de la marmota de América]. Esta secuencia codifica una forma truncada de la proteína X implicada en hepatocarcinomas, por lo que se introduce en el vector una versión mutada WPRE*¹⁸³.

Por último, además de mejorar la eficiencia de los vectores, los esfuerzos investigadores se han centrado también en reducir la genotoxicidad asociada. Dado que los LTRs tienen secuencias *enhancers* y regiones promotoras, su integración en el genoma puede activar genes adyacentes causando oncogénesis insercional. Por ello, se han desarrollado vectores autoinactivantes o *self-inactivating* [SIN]. Los SIN-lentivirus presentan una delección en la región U3 del LTR 3' que comprende una secuencia TATA. Durante la duplicación de los LTRs en el proceso de retro-transcripción, la región truncada U3 del LTR 3' se copia en el LTR 5' resultando en la inactivación transcripcional del genoma viral. Para mantener la expresión del transgén en los vectores SIN, es necesario incluir un promotor interno que determina el propio investigador. Así, dependiendo de la especificidad y nivel de expresión del transgén que se necesite, se incorporará en el vector un promotor fuerte o moderado, o un promotor específico de la célula diana o inducible.

2.4. Edición génica: El sistema CRISPR/Cas9

En los últimos años, la tecnología CRISPR /Cas (del inglés *Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats and Cas nucleases*) se ha convertido en la herramienta de edición génica más extendida debido a su simplicidad, bajo coste y versatilidad para modificar de forma dirigida el genoma de varios tipos celulares y organismos¹⁹¹. A diferencia de otras herramientas de edición génica utilizadas hasta la fecha, como las ZNF y TALEN), en el sistema CRISPR la especificidad de la nucleasa se basa en la complementariedad entre un ARN guía y la secuencia de ADN diana¹⁹².

Originalmente, el sistema CRISPR/Cas se identificó como un sistema inmune adaptativo desarrollado en bacterias y arqueas para protegerse de la invasión de plásmidos de conjugación y bacteriófagos¹⁹³⁻¹⁹⁵. El sistema CRISPR está compuesto por dos elementos: las secuencias CRISPR, que son secuencias cortas de ADN repetidas e interespaciadas por el genoma de la bacteria, y las proteínas Cas.

De todos los sistemas CRISPR/Cas que se han identificado, el sistema tipo II es el más usado como herramienta de edición génica por su simplicidad, ya que solo emplea una proteína Cas, la Cas9, y dos moléculas de ARN denominadas ARNcr y ARNtracr¹⁹⁶. En el sistema CRISPR/Cas9 bacteriano, las moléculas de distintos ADN invasores, denominado protoespaciadores, se incorporan entre las secuencias CRISPR del genoma de la bacteria. Cuando se transcriben los loci CRISPR se generan distintos ARNcr, cada uno con repeticiones CRISPR y una secuencia protoespaciadora determinada. Cada uno de estos ARNcr hibrida con una molécula de ARNtracr, la cual presenta secuencias complementarias a las repeticiones CRISPR¹⁹⁷. Finalmente, el dúplex formado entre el ARNcr:ARNtracr se une a la nucleasa Cas9 formando una ribonucleoproteína. Cuando se produce una segunda invasión en la bacteria, el dúplex ARNcr:ARNtracr guía a la Cas9 para que haga un corte de doble cadena en la secuencia del ADN invasor que sea complementaria al protoespaciador del ARNcr, evitando con ello una nueva infección^{191,196}. Este corte solo se produce si en el ADN exógeno hay una secuencia corta adyacente al protoespaciador denominada PAM (del inglés *protospacer adjacent motifs*) que es específica de la Cas9¹⁹⁸. La secuencia de la PAM constituye el lugar de anclaje de la Cas9 a la secuencia de ADN diana, y es distinta para cada proteína Cas9.

Posteriormente a su identificación, el sistema original CRISPR tipo II de *S.pyogenes* se adaptó como una herramienta de edición génica para células eucariotas^{199,200} (**Figura 8A-B**). Para inducir un corte en una secuencia concreta del genoma se introduce y/o expresa en la célula u organismo diana dos elementos: la nucleasa Cas9 y una molécula sintética denominada ARN guía [ARNg], que cubre la función del ARNcr y el ARNtracr¹⁹¹. El ARNg está compuesta por una secuencia de ARN estructural para mediar la unión a la Cas9 (similar al ARNtracr) y una secuencia de 20 nucleótidos complementaria a la secuencia diana que se pretende cortar. Este ARNg conducirá a la Cas9 hasta la secuencia diana complementaria del ADN y se formará un heterodúplex entre el ARNg y el ADN. El corte en el ADN diana solo se produce si próximo a la diana está la PAM 5'-NGG-3' donde se ancla la Cas9^{191,196}.

Del mismo modo que con las nucleasas ZNF y TALEN, el corte en la doble cadena de ADN es solo un paso inicial para la edición génica. El corte se realiza con el fin de activar los mecanismos de reparación de ADN de la célula diana (**Figura 8C**) que pueden ser: reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non-Homologous End Joining*) y reparación por recombinación homóloga (HR, del inglés *Homologous Recombination*). El NHEJ liga directamente los extremos romos lo que puede originar pequeñas inserciones y/o deleciones (*indels*) que alteran el marco de lectura de la secuencia cortada. Por esta razón, esta estrategia se emplea para generar modelos *knock out*. En cambio, el mecanismo de HR se puede emplear para hacer cambios precisos en el genoma introduciendo una molécula de ADN molde que tenga extremos de homología con la región donde se introduce el corte. Con esta

aproximación es posible corregir variantes puntuales que causen una patología o incluso integrar una secuencia codificante en el sitio deseado¹⁴⁰.

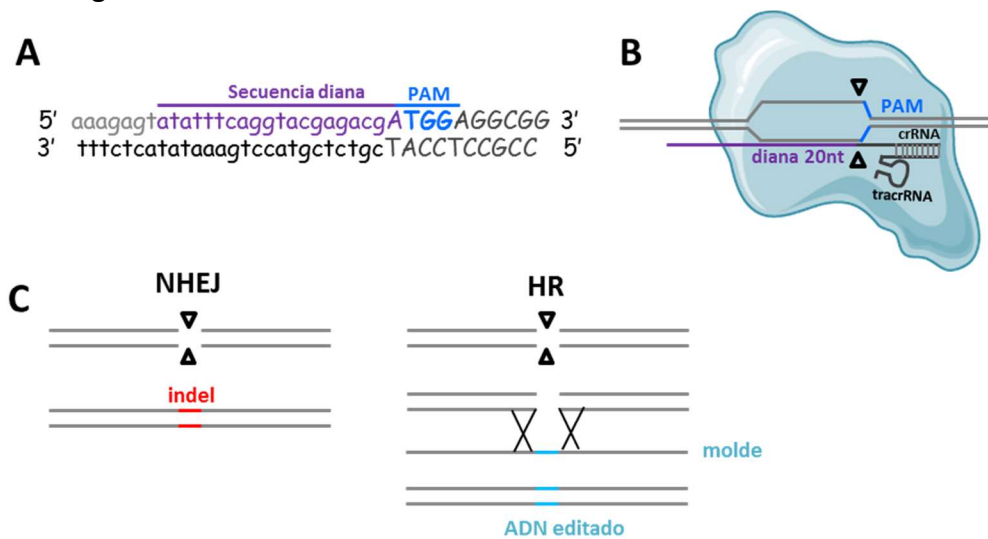


Figura 8. Herramienta CRISPR/Mecanismos de reparación de ADN la célula.

Existen varios métodos para introducir el sistema CRISPR en la célula diana: un plásmido de ADN que codifique la nucleasa y el ARNg; en forma de ARN o mediante un complejo proteína/ARN^{140,196,201,202}. La electroporación de la ribonucleoproteína formada por el complejo entre la Cas9 y un ARNg modificado se han convertido en el método de elección para la terapia génica *ex vivo* de células primarias como las células T y las células madre hematopoyéticas; ya que mejora la eficiencia de edición y reduce la citotoxicidad^{202–204}. Por último, en muchas aplicaciones destaca el uso de vectores virales como un vehículo para llevar el sistema CRISPR hasta la diana aumentando la eficacia de la transferencia y minimizando citotoxicidad¹⁴⁰.

En los últimos años, el sistema CRISPR/Cas9 se ha constituido como una herramienta clave en investigación básica para la generación de modelos celulares y animales de determinadas enfermedades. Además, los resultados derivados de la pre-clínica le ha permitido dar el salto a su uso en ensayos clínicos *in vivo* y *ex vivo*¹⁹².

3. Referencias

1. Palma-Barqueros V, Revilla N, Sánchez A, et al. Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):.
2. Bolton-Maggs PHB, Chalmers EA, Collins PW, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br. J. Haematol.* 2006;135(5):603–633.
3. Bastida JM, Benito R, Lozano ML, et al. Molecular Diagnosis of Inherited Coagulation and Bleeding Disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019;45(7):695–707.
4. Oved JH, Lambert MP, Kowalska MA, Poncz M, Karczewski KJ. Population based frequency of naturally occurring loss-of-function variants in genes associated with platelet disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2021;19(1):248–254.

5. Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: A growing list of disorders. *Hematology*. 2017;2017(1):385–399.
6. Pecci A, Balduini CL. Inherited thrombocytopenias: an updated guide for clinicians. *Blood Rev*. 2020;100784.
7. Bury L, Falcinelli E, Gresele P. Learning the Ropes of Platelet Count Regulation: Inherited Thrombocytopenias. *J. Clin. Med*. 2021;10(3):.
8. Al-Huniti A, Kahr WH. Inherited Platelet Disorders: Diagnosis and Management. *Transfus. Med. Rev*. 2020;34(4):277–285.
9. Nurden P, Stritt S, Favier R, Nurden AT. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. *Haematologica*. 2021;106(2):337–350.
10. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J. Rare Dis*. 2014;9:213.
11. Gresele P, Orsini S, Noris P, et al. Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J. Thromb. Haemost*. 2020;18(3):732–739.
12. Melazzini F, Zaninetti C, Balduini CL. Bleeding is not the main clinical issue in many patients with inherited thrombocytopaenias. *Haemophilia*. 2017;23(5):673–681.
13. Di Paola J, Fisher MH. ETV6-related thrombocytopenia and platelet dysfunction. *Platelets*. 2021;32(1):141–143.
14. Nava T, Rivard G-E, Bonnefoy A. Challenges on the diagnostic approach of inherited platelet function disorders: Is a paradigm change necessary? *Platelets*. 2018;29(2):148–155.
15. Palma-Barqueros V, Chan M, Crescente M, et al. A New Molecular Variant in the PTGS1 Gene That Abrogates Generation of Thromboxane A2 Synthesis and Associates with Platelet Dysfunction and Bleeding. *Blood_Personal Comun*. 2019;134(Supplement_1):2375.
16. Downes K, Megy K, Duarte D, et al. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood*. 2019;134(23):2082–2091.
17. Johnson B, Lowe GC, Futterer J, et al. Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica*. 2016;101(10):1170–1179.
18. Downes K, Borry P, Ericson K, et al. Clinical management, ethics and informed consent related to multi-gene panel-based high throughput sequencing testing for platelet disorders: Communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost*. 2020;18(10):2751–2758.
19. Greinacher A, Eekels JJM. Simplifying the diagnosis of inherited platelet disorders? The new tools do not make it any easier. *Blood*. 2019;133(23):2478–2483.
20. Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br. J. Haematol*. 2015;170(2):150–161.
21. Gresele P, Bury L, Falcinelli E. Inherited Platelet Function Disorders: Algorithms for Phenotypic and Genetic Investigation. *Semin. Thromb. Hemost*. 2016;42(3):292–305.
22. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J. Thromb. Haemost*. 2010;8(9):2063–2065.
23. Bastida JM, Del Rey M, Revilla N, et al. Wiskott-Aldrich syndrome in a child presenting with macrothrombocytopenia. *Platelets*. 2017;28(4):417–420.
24. Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost*. 2015;13(2):314–322.
25. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into

- mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica*. 2018;103(1):148–162.
26. Heremans J, Freson K. High-throughput sequencing for diagnosing platelet disorders: lessons learned from exploring the causes of bleeding disorders. *Int. J. Lab. Hematol*. 2018;40 Suppl 1:89–96.
 27. Sivapalaratnam S, Collins J, Gomez K. Diagnosis of inherited bleeding disorders in the genomic era. *Br. J. Haematol*. 2017;179(3):363–376.
 28. Ver Donck F, Downes K, Freson K. Strengths and limitations of high-throughput sequencing for the diagnosis of inherited bleeding and platelet disorders. *J. Thromb. Haemost*. 2020;18(8):1839–1845.
 29. Nurden AT, Nurden P. Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica*. 2020;105(8):2004–2019.
 30. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med*. 2015;17(5):405–424.
 31. Greinacher A, Eekels JJM. Diagnosis of hereditary platelet disorders in the era of next-generation sequencing: “primum non nocere.” *J. Thromb. Haemost*. 2019;
 32. Pecci A, Klersy C, Gresele P, et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum. Mutat*. 2014;35(2):236–247.
 33. Bury L, Megy K, Stephens JC, et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of MYH9-RD: Predicting pathogenic variants. *Hum. Mutat*. 2020;41(1):277–290.
 34. Kunishima S, Kitamura K, Matsumoto T, Sekine T, Saito H. Somatic mosaicism in MYH9 disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents. *Br. J. Haematol*. 2014;165(6):885–887.
 35. Candotti F. Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott-Aldrich Syndrome. *J. Clin. Immunol*. 2018;38(1):13–27.
 36. Bastida JM, Benito R, Janusz K, et al. Two novel variants of the ABCG5 gene cause xanthelasmas and macrothrombocytopenia: a brief review of hematologic abnormalities of sitosterolemia. *J. Thromb. Haemost*. 2017;15(9):1859–1866.
 37. Bastida JM, Benito R, González-Porras JR, Rivera J. ABCG5 and ABCG8 gene variations associated with sitosterolemia and platelet dysfunction. *Platelets*. 2020;1–5.
 38. Galera P, Dulau A, Katherine F. Inherited thrombocytopenia and platelet disorders with germline predisposition to myeloid neoplasia. 2019;(January):131–141.
 39. Ferrari S, Lombardi AM, Putti MC, et al. Spectrum of 5'UTR mutations in ANKRD26 gene in patients with inherited thrombocytopenia: c.-140C>G mutation is more frequent than expected. *Platelets*. 2017;28(6):621–624.
 40. Schlegelberger B, Heller PG. RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin. Hematol*. 2017;
 41. Bariana TK, Ouwehand WH, Guerrero JA, Gomez K. Dawning of the age of genomics for platelet granule disorders: improving insight, diagnosis and management. *Br. J. Haematol*. 2017;176(5):705–720.
 42. Dupuis A, Bordet J-C, Eckly A, Gachet C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *J. Clin. Med*. 2020;9(8):.
 43. Pluthero FG, Di Paola J, Carcao MD, Kahr WHA. NBEAL2 mutations and bleeding in patients with gray platelet syndrome. *Platelets*. 2018;29(6):632–635.
 44. Sánchez-Guiu I, Torregrosa JM, Velasco F, et al. Hermansky-Pudlak syndrome. Overview of clinical and molecular features and case report of a new HPS-1 variant. *Hamostaseologie*. 2014;34(4):301–309.
 45. Lozano ML, Rivera J, Sánchez-Guiu I, Vicente V. Towards the targeted management of Chediak-Higashi syndrome. *Orphanet J. Rare Dis*. 2014;9:132.

46. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, et al. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum. Mutat.* 2014;35(9):1033–1045.
47. Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, et al. Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. *Blood.* 2017;129(4):520–524.
48. Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 2018;176(10):2070–2081.
49. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica.* 2009;94(5):700–711.
50. Grainger JD, Thachil J, Will AM. How we treat the platelet glycoprotein defects; Glanzmann thrombasthenia and Bernard Soulier syndrome in children and adults. *Br. J. Haematol.* 2018;182(5):621–632.
51. Poon M-C, Di Minno G, d’Oiron R, Zotz R. New Insights Into the Treatment of Glanzmann Thrombasthenia. *Transfus. Med. Rev.* 2016;30(2):92–99.
52. Alamelu J, Liesner R. Modern management of severe platelet function disorders. *Br. J. Haematol.* 2010;149(6):813–823.
53. Tefre KL, Ingerslev J, Sørensen B. Clinical benefit of recombinant factor VIIa in management of bleeds and surgery in two brothers suffering from the Bernard-Soulier syndrome. *Haemophilia.* 2009;15(1):281–284.
54. Coppola A, Simone C De, Palmieri NM, et al. Recombinant activated factor VII for hemostatic cover of orthopedic interventions in a girl with thrombocytopenia with absent radii syndrome. *Blood Coagul. fibrinolysis an Int. J. Haemost. Thromb.* 2007;18(2):199–201.
55. Lee A, Poon M-C. Inherited platelet functional disorders: General principles and practical aspects of management. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis.* 2018;57(4):494–501.
56. Orsini S, Noris P, Bury L, et al. Bleeding risk of surgery and its prevention in patients with inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2017;102(7):1192–1203.
57. Lee RH, Piatt R, Dhenge A, et al. Impaired hemostatic activity of healthy transfused platelets in inherited and acquired platelet disorders: Mechanisms and implications. *Sci. Transl. Med.* 2019;11(522):.
58. Zaninetti C, Gresele P, Bertomoro A, et al. Eltrombopag for the treatment of inherited thrombocytopenias: a phase II clinical trial. *Haematologica.* 2020;105(3):820–828.
59. Pecci A, Verver EJJ, Schlegel N, et al. Cochlear implantation is safe and effective in patients with MYH9-related disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:100.
60. Cid AR, Montesinos P, Sánchez-Guiu I, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in an adult patient with Glanzmann thrombasthenia. *Clin. case reports.* 2017;5(11):1887–1890.
61. Ballmaier M, Germeshausen M. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011;37(6):673–681.
62. Burroughs LM, Petrovic A, Brazauskas R, et al. Excellent outcomes following hematopoietic cell transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: a PIDTC report. *Blood.* 2020;135(23):2094–2105.
63. Moratto D, Giliani S, Bonfim C, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: an international collaborative study. *Blood.* 2011;118(6):1675–1684.
64. Woods G, Bajwa RPS, Rose MJ. Reduced intensity transplantation for congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: report of a case and review of the literature. *Pediatr. Transplant.* 2014;18(1):E31-4.
65. Germeshausen M, Ballmaier M. CAMT-MPL: Congenital Amegakaryocytic

- Thrombocytopenia caused by MPL mutations - Heterogeneity of a monogenic disorder - Comprehensive analysis of 56 patients. *Haematologica*. 2020;
66. Pecci A, Ragab I, Bozzi V, et al. Thrombopoietin mutation in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia treatable with romiplostim. *EMBO Mol. Med.* 2018;10(1):63–75.
 67. Cornish N, Aungraheeta MR, FitzGibbon L, et al. Monoallelic loss-of-function THPO variants cause heritable thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2020;4(5):920–924.
 68. Noris P, Marconi C, De Rocco D, et al. A new form of inherited thrombocytopenia due to monoallelic loss of function mutation in the thrombopoietin gene. *Br. J. Haematol.* 2018;181(5):698–701.
 69. Thompson AA, Woodruff K, Feig SA, Nguyen LT, Schanen NC. Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: a new familial syndrome. *Br. J. Haematol.* 2001;113(4):866–870.
 70. Germeshausen M, Ancliff P, Estrada J, et al. MECOM-associated syndrome: a heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2018;2(6):586–596.
 71. Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, et al. Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Am. J. Hum. Genet.* 2015;97(6):848–854.
 72. Albers CA, Paul DS, Schulze H, et al. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat. Genet.* 2012;44(4):435–9, S1-2.
 73. Noris P, Perrotta S, Seri M, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood.* 2011;117(24):6673–6680.
 74. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 2015;47(5):535–538.
 75. Di Paola J, Porter CC. ETV6-related thrombocytopenia and leukemia predisposition. *Blood.* 2019;134(8):663–667.
 76. Lentaigne C, Greene D, Sivapalaratnam S, et al. Germline mutations in the transcription factor IKZF5 cause thrombocytopenia. *Blood.* 2019;134(23):2070–2081.
 77. Morison IM, Cramer Bordé EM, Cheesman EJ, et al. A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nat. Genet.* 2008;40(4):387–389.
 78. Bariana TK, Labarque V, Heremans J, et al. Sphingolipid dysregulation due to lack of functional KDSR impairs proplatelet formation causing thrombocytopenia. *Haematologica.* 2019;104(5):1036–1045.
 79. Takeichi T, Torrelo A, Lee JYW, et al. Biallelic Mutations in KDSR Disrupt Ceramide Synthesis and Result in a Spectrum of Keratinization Disorders Associated with Thrombocytopenia. *J. Invest. Dermatol.* 2017;137(11):2344–2353.
 80. Lacruz RS, Feske S. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015;1356(1):45–79.
 81. Markello T, Chen D, Kwan JY, et al. York platelet syndrome is a CRAC channelopathy due to gain-of-function mutations in STIM1. *Mol. Genet. Metab.* 2015;114(3):474–482.
 82. Noris P, Perrotta S, Bottega R, et al. Clinical and laboratory features of 103 patients from 42 Italian families with inherited thrombocytopenia derived from the monoallelic Ala156Val mutation of GPIIb α (Bolzano mutation). *Haematologica.* 2012;97(1):82–88.
 83. Ferrari S, Lombardi AM, Cortella I, et al. New heterozygous variant in GP1BB gene is responsible for an inherited form of macrothrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 2019;184(5):855–858.
 84. Othman M, Gresele P. Guidance on the diagnosis and management of platelet-type von Willebrand disease: A communication from the Platelet Physiology Subcommittee of

- the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(8):1855–1858.
85. Morais S, Oliveira J, Lau C, et al. α IIb β 3 variants in ten families with autosomal dominant macrothrombocytopenia: Expanding the mutational and clinical spectrum. *PLoS One.* 2020;15(12):e0235136.
 86. Favier M, Bordet J-C, Favier R, et al. Mutations of the integrin α IIb/ β 3 intracytoplasmic salt bridge cause macrothrombocytopenia and enlarged platelet α -granules. *Am. J. Hematol.* 2018;93(2):195–204.
 87. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, et al. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood.* 2011;117(20):5479–5484.
 88. Lambert MP, Arulsevan A, Schott A, et al. The 22q11.2 deletion syndrome: Cancer predisposition, platelet abnormalities and cytopenias. *Am. J. Med. Genet. A.* 2018;176(10):2121–2127.
 89. Favier R, Akshoomoff N, Mattson S, Grossfeld P. Jacobsen syndrome: Advances in our knowledge of phenotype and genotype. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 2015;169(3):239–250.
 90. Saultier P, Vidal L, Canault M, et al. Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: Ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica.* 2017;
 91. Stevenson WS, Rabbolini DJ, Beutler L, et al. Paris-Trousseau thrombocytopenia is phenocopied by the autosomal recessive inheritance of a DNA-binding domain mutation in FLI1. *Blood.* 2015;126(17):2027–2030.
 92. Millikan PD, Balamohan SM, Raskind WH, Kacena MA. Inherited thrombocytopenia due to GATA-1 mutations. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011;37(6):682–689.
 93. Crispino JD, Horwitz MS. GATA factor mutations in hematologic disease. *Blood.* 2017;129(15):2103–2110.
 94. Marneth AE, Van Heerde WL, Hebeda KM, et al. Platelet CD34 expression and α /d-granule abnormalities in GFI1B- and RUNX1-related familial bleeding disorders. *Blood.* 2017;
 95. Rabbolini DJ, Morel-Kopp MC, Ward CM, Stevenson WS. GFI1B variants associated with thrombocytopenia. *Platelets.* 2017;28(5):525–527.
 96. Hofmann I, Geer MJ, Vögtle T, et al. Congenital macrothrombocytopenia with focal myelofibrosis due to mutations in human G6b-B is rescued in humanized mice. *Blood.* 2018;132(13):1399–1412.
 97. Nurden P, Debili N, Coupry I, et al. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood.* 2011;118(22):5928–5937.
 98. Vassallo P, Westbury SK, Mumford AD. FLNA variants associated with disorders of platelet number or function. *Platelets.* 2020;31(8):1097–1100.
 99. Burley K, Westbury SK, Mumford AD. TUBB1 variants and human platelet traits. *Platelets.* 2018;29(2):209–211.
 100. Westbury SK, Shoemark DK, Mumford AD. ACTN1 variants associated with thrombocytopenia. *Platelets.* 2017;28(6):625–627.
 101. Westbury SK, Downes K, Burney C, et al. Phenotype description and response to thrombopoietin receptor agonist in DIAPH1-related disorder. *Blood Adv.* 2018;2(18):2341–2346.
 102. Stapley RJ, Pisareva VP, Pisarev A V, Morgan N V. SLFN14 gene mutations associated with bleeding. *Platelets.* 2020;31(3):407–410.
 103. Turro E, Greene D, Wijgaerts A, et al. A dominant gain-of-function mutation in universal tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia, myelofibrosis, bleeding, and bone pathologies. *Sci. Transl. Med.* 2016;8(328):328ra30.
 104. Barozzi S, Di Buduo CA, Marconi C, et al. Pathogenetic and clinical study of a patient with thrombocytopenia due to the p.E527K gain-of-function variant of SRC.

- Haematologica*. 2021;106(3):918–922.
105. Pleines I, Woods J, Chappaz S, et al. Mutations in tropomyosin 4 underlie a rare form of human macrothrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* 2017;
 106. Stritt S, Nurden P, Favier R, et al. Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg(2+) homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nat. Commun.* 2016;7:11097.
 107. Manchev VT, Hilpert M, Berrou E, et al. A new form of macrothrombocytopenia induced by a germ-line mutation in the PRKACG gene. *Blood*. 2014;124(16):2554–2563.
 108. Takenouchi T, Okamoto N, Ida S, Uehara T, Kosaki K. Further evidence of a mutation in CDC42 as a cause of a recognizable syndromic form of thrombocytopenia. *Am. J. Med. Genet. A*. 2016;170A(4):852–855.
 109. Fütterer J, Dalby A, Lowe GC, et al. Mutation in GNE is associated with severe congenital thrombocytopenia. *Blood*. 2018;132(17):1855–1858.
 110. Seo A, Gulsuner S, Pierce S, et al. Inherited thrombocytopenia associated with mutation of UDP-galactose-4-epimerase (GALE). *Hum. Mol. Genet.* 2019;28(1):133–142.
 111. Kauskot A, Pascreau T, Adam F, et al. A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica*. 2018;103(12):e613–e617.
 112. Latham SL, Ehmke N, Reinke PYA, et al. Variants in exons 5 and 6 of ACTB cause syndromic thrombocytopenia. *Nat. Commun.* 2018;
 113. Levin C, Koren A, Pretorius E, et al. Deleterious mutation in the FYB gene is associated with congenital autosomal recessive small-platelet thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(7):1285–1292.
 114. Kahr WHA, Pluthero FG, Elkadri A, et al. Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nat. Commun.* 2017;8:14816.
 115. Marconi C, DI Buduo CA, LeVine K, et al. Loss-of-function mutations in PTPRJ cause a new form of inherited thrombocytopenia. *Blood*. 2019;
 116. Nurden AT, Pillois X. ITGA2B and ITGB3 gene mutations associated with Glanzmann thrombasthenia. *Platelets*. 2018;29(1):98–101.
 117. Nurden AT, Pillois X, Fiore M, et al. Expanding the Mutation Spectrum Affecting α IIb β 3 Integrin in Glanzmann Thrombasthenia: Screening of the ITGA2B and ITGB3 Genes in a Large International Cohort. *Hum. Mutat.* 2015;36(5):548–561.
 118. Cattaneo M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*. 2011;117(7):2102–2112.
 119. Scavone M, Femia EA, Cattaneo M. P2Y₁₂ receptor gene mutations associated with bleeding. *Platelets*. 2017;28(4):421–423.
 120. Mundell SJ, Mumford A. TBXA2R gene variants associated with bleeding. *Platelets*. 2018;29(7):739–742.
 121. Jandrot-Perrus M, Hermans C, Mezzano D. Platelet glycoprotein VI genetic quantitative and qualitative defects. *Platelets*. 2019;30(6):708–713.
 122. Berrou E, Soukaseum C, Favier R, et al. A mutation of the human EPHB2 gene leads to a major platelet functional defect. *Blood*. 2018;132(19):2067–2077.
 123. Hayward CPM, Rivard GE. Quebec platelet disorder. *Expert Rev. Hematol.* 2011;4(2):137–141.
 124. Bastida JM, Morais S, Palma-Barqueros V, et al. Identification of novel variants in ten patients with Hermansky-Pudlak syndrome by high-throughput sequencing. *Ann. Med.* 2019;51(2):141–148.
 125. Huizing M, Malicdan MC V, Wang JA, et al. Hermansky-Pudlak syndrome: Mutation update. *Hum. Mutat.* 2020;41(3):543–580.
 126. Castaño-Jaramillo L-M, Lugo-Reyes SO, Cruz Muñoz ME, et al. Diagnostic and therapeutic caveats in Griscelli syndrome. *Scand. J. Immunol.* 2021;93(6):e13034.

127. Chan M V, Hayman MA, Sivapalaratnam S, et al. Identification of a homozygous recessive variant in PTGS1 resulting in a congenital aspirin-like defect in platelet function. 2020;
128. Palma-Barqueros V, Bohdan N, Revilla N, et al. PTGS1 gene variations associated with bleeding and platelet dysfunction. *Platelets*. 2021;32(5):710–716.
129. Palma-Barqueros V, Crescente M, de la Morena ME, et al. A novel genetic variant in PTGS1 affects N-glycosylation of cyclooxygenase-1 causing a dominant-negative effect on platelet function and bleeding diathesis. *Am. J. Hematol.* 2021;96(3):E83–E88.
130. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br. J. Haematol.* 2014;165(2):165–178.
131. Rao AK. Inherited platelet function disorders. Overview and disorders of granules, secretion, and signal transduction. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2013;27(3):585–611.
132. Canault M, Alessi M-C. RasGRP2 Structure, Function and Genetic Variants in Platelet Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(3):.
133. Lozano ML, Cook A, Bastida JM, et al. Novel mutations in RASGRP2, which encodes CalDAG-GEFI, abrogate Rap1 activation, causing platelet dysfunction. *Blood*. 2016;128(9):1282–1289.
134. Sevivas T, Bastida JM, Paul DS, et al. Identification of two novel mutations in RASGRP2 affecting platelet CalDAG-GEFI expression and function in patients with bleeding diathesis. *Platelets*. 2018;29(2):192–195.
135. Palma-Barqueros V, Ruiz-Pividal J, Bohdan N, et al. RASGRP2 gene variations associated with platelet dysfunction and bleeding. *Platelets*. 2019;30(4):535–539.
136. Rognoni E, Ruppert R, Fässler R. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *J. Cell Sci.* 2016;129(1):17–27.
137. Millington-Burgess SL, Harper MT. Gene of the issue: ANO6 and Scott Syndrome. *Platelets*. 2020;31(7):964–967.
138. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol. Med.* 2013;5(11):1642–1661.
139. Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age. *Science (80-)*. 2018;359(6372):.
140. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol. Ther.* 2016;24(3):430–446.
141. Bueren JA, Quintana-Bustamante O, Almarza E, et al. Advances in the gene therapy of monogenic blood cell diseases. *Clin. Genet.* 2020;97(1):89–102.
142. Lukashev AN, Zamyatnin AA. Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochem.* 2016;81(7):700–708.
143. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part I. Gene delivery technologies. *Discov. Med.* 2014;18(97):67–77.
144. Gruntman AM, Flotte TR. The rapidly evolving state of gene therapy. *FASEB J.* 2018;32(4):1733–1740.
145. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent Progress. *AAPS J.* 2009;11(4):671–681.
146. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J. Gene Med.* 2018;20(5):1–16.
147. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 2001;7(1):33–40.
148. Sharon D, Kamen A. Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 2018;115(1):25–40.
149. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262–1278.
150. Mahfouz MM, Piatek A, Stewart CN. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9

- systems: Challenges and perspectives. *Plant Biotechnol. J.* 2014;12(8):1006–1014.
151. Vanhee S, Vandekerckhove B. Pluripotent stem cell based gene therapy for hematological diseases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016;97:238–246.
 152. Bak RO, Gomez-Ospina N, Porteus MH. Gene Editing on Center Stage. *Trends Genet.* 2018;34(8):600–611.
 153. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 2010;11(9):636–646.
 154. Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol. Bioeng.* 2013;110(7):1811–1821.
 155. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(5):321–334.
 156. Kohn DB. Historical Perspective on the Current Renaissance for Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2017;31(5):721–735.
 157. Richter M, Stone D, Miao C, et al. In Vivo Hematopoietic Stem Cell Transduction. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2017;31(5):771–785.
 158. Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, et al. Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2013;24(2):55–64.
 159. Perrin GQ, Herzog RW, Markusic DM. Update on clinical gene therapy for hemophilia. *Blood.* 2019;133(5):407–414.
 160. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia a. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(26):2519–2530.
 161. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(23):2215–2227.
 162. Al-Saif AM. Gene therapy of hematological disorders: current challenges. *Gene Ther.* 2019;26(7–8):296–307.
 163. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature.* 2015;526(7573):351–360.
 164. Kohn DB, Pai SY, Sadelain M. Gene Therapy Through Autologous Transplantation of Gene-Modified Hematopoietic Stem Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1 SUPPL.):S64–S69.
 165. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science (80-).* 1995;270(5235):475–480.
 166. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 2002;346(16):1185–1193.
 167. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet.* 2004;364(9452):2181–2187.
 168. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, et al. Immunodeficiency: Long-term persistence of a polyclonal t cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci. Transl. Med.* 2011;3(97):1–8.
 169. Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science.* 2002;296(5577):2410–2413.
 170. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(5):447–458.
 171. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* 2006;12(4):401–409.
 172. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, et al. Stem-Cell Gene Therapy for the Wiskott-Aldrich Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2010;363:1918–1927.
 173. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with

- monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* 2010;16(2):198–204.
174. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3132–3142.
 175. Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome-long - Term efficacy and genotoxicity (Science Translational Medicine). *Sci. Transl. Med.* 2014;6(254):1–15.
 176. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003;302(5644):415–419.
 177. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.* 2008;118(9):3143–3150.
 178. Cavazzana M, Bushman FD, Miccio A, André-Schmutz I, Six E. Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019;18(6):447–462.
 179. Romano O, Peano C, Tagliazucchi GM, et al. Transcriptional, epigenetic and retroviral signatures identify regulatory regions involved in hematopoietic lineage commitment. *Sci. Rep.* 2016;6(November 2015):1–15.
 180. Poletti V, Mavilio F. Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 2018;8(March):31–41.
 181. Fan H, Johnson C. Insertional oncogenesis by non-acute retroviruses: Implications for gene therapy. *Viruses.* 2011;3(4):398–422.
 182. Briggs JAG, Wilk T, Welker R, Kräusslich HG, Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 2003;22(7):1707–1715.
 183. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: Basic to translational. *Biochem. J.* 2012;443(3):603–618.
 184. Milone MC, O’Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia.* 2018;32(7):1529–1541.
 185. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature.* 1993;365(6447):666–669.
 186. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: Their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 2010;58(2):107–119.
 187. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 1997;15(9):871–875.
 188. Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 1998;72(11):8463–8471.
 189. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90(17):8033–8037.
 190. Zennou V, Petit C, Guetard D, et al. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell.* 2000;101(2):173–185.
 191. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(4):347–350.
 192. Wu S-S, Li Q-C, Yin C-Q, Xue W, Song C-Q. Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. *Theranostics.* 2020;10(10):4374–4382.
 193. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR Interference Limits Horizontal Targeting DNA. *Science (80-).* 2008;322(5909):1843–1845.
 194. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of

- regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 2005;60(2):174–182.
195. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709–1712.
 196. Thurtle-Schmidt DM, Lo T-W. Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochem. Mol. Biol. Educ. a Bimon. Publ. Int. Union Biochem. Mol. Biol.* 2018;46(2):195–205.
 197. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011;471(7340):602–607.
 198. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010;468(7320):67–71.
 199. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A Programmable Dual-RNA – Guided. 2012;337(August):816–822.
 200. Mojica FJM, Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* 2016;24(10):811–820.
 201. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(3):230–232.
 202. Hendel A, Bak RO, Clark JT, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(9):985–989.
 203. Bak RO, Dever DP, Porteus MH. CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nat. Protoc.* 2018;13(2):358–376.
 204. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 2014;24(6):1012–1019.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Este trabajo no evalúa una hipótesis concreta, más allá de la idea general de que las alteraciones plaquetarias y la diátesis hemorrágica asociada, en enfermos reclutados dentro del proyecto multicéntrico de “*Caracterización Funcional y Molecular de Pacientes con un Trastorno Plaquetario Congénito*”, son debidas a variantes moleculares en genes implicados en la generación y/o función de las plaquetas.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis ha sido caracterizar el fenotipo clínico y plaquetario de pacientes con sospecha de padecer un Trastorno Plaquetario Congénito, identificar las alteraciones genéticas subyacentes y demostrar la patogenicidad de las variantes, para alcanzar un diagnóstico clínico-molecular inequívoco.

Los objetivos específicos de cada capítulo son:

Capítulo I: Estudiar en detalle el fenotipo clínico y de laboratorio de una niña con diátesis hemorrágica desde el nacimiento asociada a una mutación en el gen *PTGS1*, y demostrar con estudios *in vitro* la patogenicidad de la variante candidata.

Capítulo II: Caracterizar la presentación clínica y el fenotipo plaquetario en un pedigrí de tres generaciones con SRC-RT, portador de la variante de ganancia de función p.E527K en *SRC* descrita en una sola familia en el momento de comenzar esta Tesis.

Capítulo III: Estudiar el fenotipo clínico y de laboratorio de una serie amplia de familias con trombocitopenia congénita asintomática desde el nacimiento, que se asocia a diversas variantes en el gen de la tubulina $\beta 1$, y evaluar el impacto de esas mutaciones sobre la organización de los microtúbulos y sobre la formación de plaquetas.

Capítulo IV: Demostrar el efecto deletéreo de tres variantes nuevas en *RUNX1*, identificadas en tres pedigrís con trombocitopenia y clínica hemorrágica variable desde el nacimiento, a través del análisis del transcriptoma plaquetario; secundariamente, identificar nuevas dianas transcripcionales de *RUNX1*.

Capítulo V: Diseñar un vector viral con futura aplicabilidad clínica para el tratamiento mediante terapia génica de la Trombastenia de Glanzmann. Demostrar la eficacia de este vector en un modelo de células CD34⁺ con fenotipo de la enfermedad generadas con la tecnología CRISPR/Cas9.

Capítulo I

**Identificación de una variante genética nueva en PTGS1
que afecta la N-glicosilación de la Ciclooxygenasa 1 y
causa un efecto dominante negativo.**

Capítulo I: Identificación de una variante genética nueva en *PTGS1* que afecta la N-glicosilación de la Ciclooxygenasa 1 y causa un efecto dominante negativo.

1. Introducción

Las plaquetas constituyen la primera línea de defensa que mantiene la integridad vascular y detiene el sangrado en los sitios de lesión vascular. En este proceso, un elemento clave es la liberación local de agonistas solubles como la trombina, el ADP, y el tromboxano A₂ [TXA₂] en el microambiente del tapón hemostático. Estos agonistas, de manera coordinada se encargan de amplificar la activación plaquetaria y de reclutar nuevas plaquetas circulantes para consolidar la formación del trombo¹. Una de las rutas de señalización más relevantes en la activación plaquetaria y en la extensión del trombo es la mediada por el tromboxano A₂ [TXA₂]¹. Durante la activación plaquetaria, el incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺ activa la fosfolipasa citosólica IVA [cPLA₂α], que se encarga de liberar ácido araquidónico [AA] anclado a los fosfolípidos de membrana². Sabemos que los lípidos de la membrana plasmática constituyen una importante fuente de moléculas de señalización entre las que se incluye la familia de los eicosanoides de los que forma parte el AA. El AA libre es metabolizado por múltiples rutas enzimáticas, siendo la más estudiada la que media su conversión a TXA₂ por la acción secuencial de las enzimas ciclooxygenasa 1 [COX-1] y TXA₂ sintetasa (**Figura 1A**)³. El TXA₂ desarrolla su papel protrombótico tras unirse a su receptor en la superficie plaquetaria, lo que desencadena una cascada de señalización que promueve el cambio de forma, la movilización de Ca²⁺ intracelular, la fosforilación de proteínas y la secreción y agregación plaquetaria¹. La importancia de esta vía de señalización se refleja muy bien en el hecho de que el bloqueo farmacológico de la síntesis de TXA₂ a través de la inhibición irreversible de COX-1 con aspirina constituye, junto con los antagonistas del receptor de P₂Y₁₂, la terapia antiplaquetaria más beneficiosa y ampliamente utilizada en las enfermedades cardiovasculares^{4,5}. En la ruta de síntesis del TXA₂ destaca la enzima COX-1 codificada por el gen *PTGS1*⁶. COX-1 cataliza el metabolismo del AA que es el primer paso en la formación de los prostanoides que son relevantes también en otros procesos fisiológicos más allá de la agregación plaquetaria como la citoprotección gástrica, la función renal o la reactividad vascular⁷.

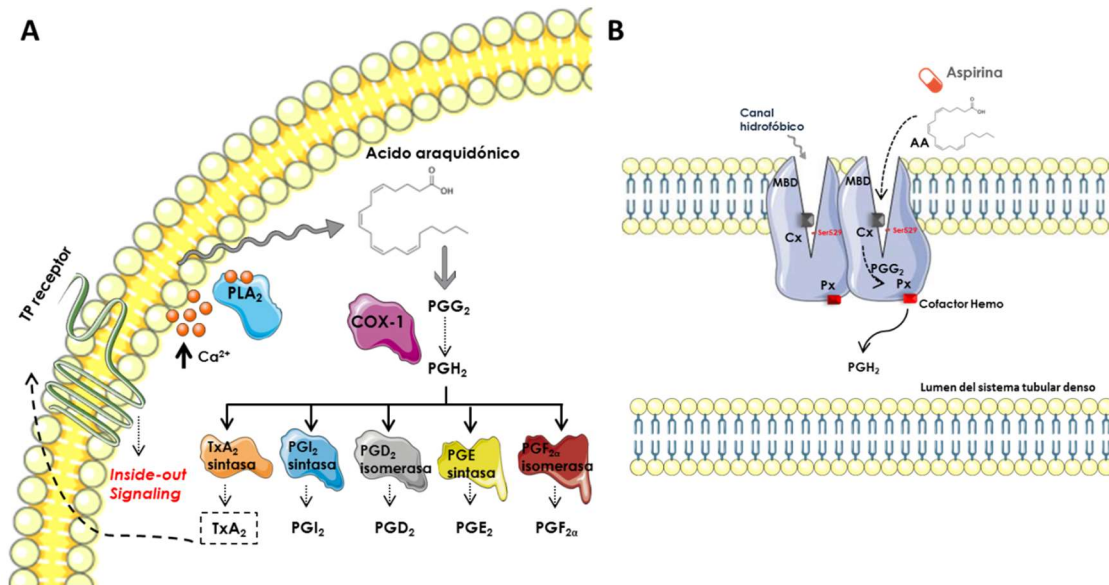


Figura 1. Señalización y representación esquemática de COX-1. **A)** Esquema de las rutas metabólicas de síntesis de prostanoides en las que interviene COX-1. **B)** Representación esquemática del homodímero de COX-1 en el que se muestran los dos dominios catalíticos: Px sitio peroxidasa y Cx sitio ciclooxigenasa; el dominio de unión a la membrana MBD, el sustrato AA y el metabolito PGG₂. La figura se ha realizado con <https://smart.servier.com/terms-of-use/> (Servier Medical Art by Servier (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License)).

COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células y los tejidos humanos con un nivel de expresión constante. En las plaquetas, COX-1 se encuentra preferencialmente en el sistema tubular denso, que es el lugar donde se sintetizan la mayoría de prostanoides⁸. COX-1 es una enzima bifuncional que realiza dos reacciones secuenciales que ocurren en dos sitios distintos del dominio catalítico. En primer lugar, la actividad ciclooxigenasa de COX-1 convierte el AA libre en prostaglandina G₂ [PGG₂]; seguidamente su actividad peroxidasa reduce la PGG₂ a prostaglandina H₂ [PGH₂] que es el precursor para la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y el ya mencionado TXA₂^{4,7}. En cuanto a su estructura, COX-1 es funcionalmente activa como un homodímero, en el que cada monómero está formado por 4 dominios altamente conservados: un dominio N-terminal con el péptido señal que desaparece en la enzima madura; un dominio de dimerización que presenta los enlaces disulfuro para la dimerización; un dominio de unión a la membrana [MBD] con residuos hidrófobos; y un dominio catalítico C-terminal (**Figura 1B**)^{9,10}. El dominio catalítico presenta i) un canal hidrofóbico con actividad ciclooxigenasa donde se unen el AA, otros ácidos grasos y sus inhibidores como la aspirina o los fármacos antiinflamatorios no esteroideos [AINEs], y ii) un sitio en la superficie con actividad peroxidasa que contiene un cofactor hemo. Por último, la proteína tiene una secuencia de tipo STEL (Ser-Thr-Glu-Leu) que constituye la señal para la unión al retículo.

En los seres humanos, la variabilidad genética de *PTGS1* puede modular la expresión y/o la actividad de COX-1, pudiendo llegar a ser un factor de riesgo patológico o determinar la respuesta a fármacos. Se han identificado múltiples polimorfismos a lo

largo de la secuencia codificante y no codificante de *PTGS1*. En el caso de ciertos polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (SNP del inglés, “*single nucleotide polymorphisms*”) tales como Arg53His, Arg78Trp, Lys185Thr, Gly230Ser y Leu237 Met, estudios en modelos recombinantes *in vitro* han mostrado que estos SNP se asocian a una reducida actividad catalítica de COX-1⁶.

La deficiencia congénita de COX-1 (OMIM: 605735, Bleeding disorder platelet type 12) es un subtipo de desorden hematológico asociado a un sangrado leve a moderado debido a la alteración de la funcionalidad plaquetaria. A pesar de la alta relevancia clínica y fisiológica de la enzima COX-1 plaquetaria, hasta la fecha se han caracterizado y descrito pocos pacientes con un defecto congénito en COX-1. En la década de 1970, varios estudios reportaron algunos pacientes que presentaban diátesis hemorrágica leve, perfiles de agregación alterados y nula capacidad de síntesis de TXA₂¹¹⁻¹⁹. Sin embargo, el fenotipo plaquetario de estos pacientes no se caracterizó de forma exhaustiva y en la mayoría de casos no se alcanzó un diagnóstico molecular.

Hasta la fecha, solo se han descrito muy pocos casos con variantes genéticas raras en el gen *PTGS1*. Entre ellos, destaca un paciente con hemorragia severa y disfunción plaquetaria que es portador heterocigoto de los SNPs p.Arg8Trp and p.Pro17Leu²⁰. Aunque se había publicado anteriormente que estos SNPs no alteran la actividad de COX-1²¹, este paciente mostró una reducción en la expresión de COX-1. En consonancia, *Nance et. al.*²² reportó la coexistencia de variantes moleculares en los genes *F8* y *PTGS1* en un pedigrí de tres generaciones con clínica hemorrágica relevante. Los familiares hemofílicos que eran también portadores heterocigotos del del SNP Pro17Leu en *PTGS1*, mostraron una disfunción plaquetaria y una clínica hemorrágica más severa. Además, dos miembros de la familia sin hemofilia A, pero que eran portadores de Pro17Leu, también mostraron sangrado espontáneo severo y defecto funcional plaquetario, sugiriendo un efecto patogénico per sé de este SNP.

Muy recientemente, la aplicación de HTS en el diagnóstico molecular de paciente con TPC, ha llevado a identificar algunas variantes raras en *PTGS1*. En un estudio danés²³ se identificó un paciente con diátesis hemorrágica asociada a niveles reducidos de tromboxano B₂ [TXB₂], el metabolito estable del TXA₂²⁴. Este paciente era portador doble heterocigoto de la variante rara c.337C>T [p.Arg113Cys] y de la variante común c.1003G>A [p.Val481Ile] en *PTGS1*. Sin embargo, el efecto deletéreo de estas variantes de *PTGS1* en la reactividad plaquetaria no ha sido caracterizado. Asimismo, el Consorcio BRIDGE ha identificado recientemente una familia portadora de la variante autosómica recesiva c.965G>C [p.Trp322Ser], que anula la expresión de COX-1 en plaquetas. Los sujetos afectados presentan un defecto plaquetario funcional “*aspirin-like*” caracterizado por alteración severa de la síntesis de eicosanoides, de la agregación plaquetaria y del *spreading* plaquetario²⁵.

En el presente estudio describimos una paciente con historia de sangrado moderado desde el nacimiento y con una disfunción plaquetaria de tipo *aspirin-like*, asociada a una variante nueva en *PTGS1*, identificada en heterocigosis y que afecta a la secuencia

de N-glicosilación ubicada en el dominio catalítico de COX-1. Los estudios que hemos realizado en las plaquetas de la paciente y también en modelos celulares, demuestran que esta variante genera una forma hipo-glicosilada de la proteína COX-1 con un aparente efecto dominante negativo.

2. Materiales y Métodos

Información del paciente, extracción de muestras y purificación de ADN

El probando se reclutó en el proyecto multicéntrico español de “*Caracterización funcional y molecular de pacientes con trastornos plaquetarios congénitos*”^{26,27}. Se revisó y valoró su historial clínico y los síntomas hemorrágicos se puntuaron utilizando la escala ISTH-BAT^{28,29}.

Para el estudio de laboratorio, se extrajo del paciente, y de controles sanos, sangre venosa en tubos K3 EDTA al 7,5% (para hemograma y purificación de ADN) y en citrato de sodio 0,105 M tamponado (para estudios funcionales). Los hemogramas se realizaron con un contador hematológico Sysmex® XS1000i (Sysmex España, España). El ADN se aisló usando un kit DNeasy, (Qiagen, Alemania) y se cuantificó usando un fluorómetro Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific, CA, EE. UU.). En esta investigación se observaron los principios éticos de la Declaración de Helsinki y se contó con la aprobación de los Comités Éticos del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) y del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia. Tanto el paciente como los controles firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Estudio molecular mediante HTS

El ADN del paciente se analizó mediante HTS de un panel de 71 genes preestablecido, usando una plataforma MiSeq Illumina (Illumina, CA, USA)²⁶. Brevemente, en este panel genes se emplean sondas dirigidas a todos los exones, regiones 3'UTR (del inglés, *untranslated*) y regiones flanqueantes de cada uno de los genes incluidos en el panel. Se secuenciaron 50 ng de ADN siguiendo el protocolo estandarizado de Illumina en un equipo MiSeq. Los datos de secuencia generados se alinearon al genoma humano de referencia hg19. Se aplicó un filtro de calidad de secuenciación basado en una puntuación Phred > 20, calidad > 20 y cobertura de lectura > 30 en cada posición. Las variantes candidatas seleccionadas se inspeccionaron con la herramienta web *varsome* (<https://varsome.com/>)³⁰ que ofrece información sobre sus frecuencias en población, la predicción *in silico* del efecto de variante y la patogenicidad de acuerdo con los estándares del ACMG³¹. En la estrategia general de filtrado, solo se consideraron variantes con frecuencias alélicas menores [MAF], de <0,05. Por último, la variante candidata de *PTGS1* seleccionada se confirmó en el paciente mediante secuenciación de Sanger. La alineación de la secuencia COX-1 en 12 especies se realizó utilizando Uniprot y se visualizó con el software Jalview³². La nueva estructura

cristalina de COX-1 humana (<https://www.rcsb.org/structure/6Y3C>) se visualizó en el software Chimera (UCSF, CA, USA).

Secuenciación de Sanger

La variante en *PTGS1* identificada en el caso índice mediante HTS- panel de genes de HTS²⁶ se confirmó mediante secuenciación de Sanger en un secuenciador automático ABI 3130. Se diseñaron primers específicos directos (*foward [F]*) e inversos (*reverse [R]*) utilizando el software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>):

PTGS1 5'F: CTTGTCACCGTTATTTTTGCTCTCT

PTGS1 5'R: ATCTGTAAAGACCCAAACACAGAGA

El ADN genómico se amplificó con el kit *Fast Start High Fidelity PCR System* (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo algunas variaciones en la temperatura de hibridación. Las secuencias de ADN se evaluaron utilizando el software Chromas Lite v2.1.1 (Technelysium, South Brisbane, Australia) y DS Gene v1.5 (Accerlys, San Diego, CA). Los datos se analizaron utilizando anotaciones de la versión del genoma hg19 / GRCh37.

Agregación plaquetaria

A parti de sangre citratada del paciente y de los controles, se preparó plasma rico en plaquetas [PRP] y plasma pobre en plaquetas [PPP] mediante centrifugación (140 × g, 15 minutos [min]; 1000 × g, 10 min, respectivamente). Realizamos agregometría de transmisión de luz [LTA] en PRP (2×10^{11} platelets/L) utilizando un equipo Aggrecorder II (Menarini Diagnostics, Florencia, Italia) y siguiendo un procedimiento estándar previamente descrito²⁷. Esencialmente, se registraron durante 300 segundos los cambios en la transmisión de luz en el PRP en agitación y a 37°C, tras la adición de los diferentes agonistas plaquetarios. Se consideró la densidad óptica del PPP como el 100%. Usamos los siguientes agonistas plaquetarios: ácido araquidónico 1,6 mM (AA; Sigma-Aldrich, Reino Unido), ADP 10 μM (Chronolog, Reino Unido), 10 μg/ml de colágeno (Nycomed, Austria), péptido agonista del receptor de trombina activado por proteasa (PAR1p) 25 μM (TRAP-6; Sigma-Aldrich, Química, Madrid, 10 μM U46619 (Cayman Chemical, Reino Unido) y 1,25 mg/ml de ristocetina (Sigma-Aldrich).

Análisis de plaquetas mediante citometría de flujo

La expresión de las glicoproteínas de membrana plaquetarias [GP] GPIa (integrina α2, CD49b), GPIbα (CD42B), GPIX (CD42Aa), GPIIb (integrina αIIb, CD41a), GPIIIa (integrina β3, CD61) y GPVI, se evaluó mediante citometría de flujo en sangre total anticoagulada en citrato diluida 1:10 con solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*), utilizando anticuerpos específicos (todos de BD Biosciences, Madrid, España). Para analizar la secreción de gránulos plaquetarios y la activación de αIIbβ3, PRP diluido ($\sim 20 \times 10^9$ /L plaquetas) con tampón de Tyrode

(NaCl 134mM, Na₂HPO₄ 0.34mM, KCl 2.9mM, NaHCO₃ 12mM, HEPES 20mM, glucosa 5mM, MgCl₂ 1mM, pH 7.4), se incubó en condiciones estáticas durante 30 min a temperatura ambiente con tampón (control) o con agonistas y en presencia de anticuerpo anti-CD41*APC (marcador de plaquetas), fibrinógeno-Alexa488 (Thermo Fisher, Madrid, España) (marcador de activación de la integrina α IIb β 3) y anticuerpos anti-CD62*PE (secreción de gránulos α) o anti-CD63*PE (secreción de gránulos densos) (BD Biosciences). Las reacciones se detuvieron con paraformaldehído [PFA] al 4% (v/v) (15 min, RT), las muestras se diluyeron con PBS y se procesaron en un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Ann Arbor, MI, USA). La mediana de intensidad de fluorescencia [MFI] de las plaquetas (región de eventos positivos para CD41a) se analizó utilizando el software BD Accuri™ C6³³.

Perfil de eicosanoides en sangre total estimulada

Usando un agregómetro, incubamos muestras de sangre total citratada con PBS, colágeno (30 μ g/mL) o PAR1p-6 (25 μ M), a37°C, durante 30 min y en agitación continua. La estimulación se detuvo añadiendo diclofenaco sódico 100 μ mol/L (Sigma-Aldrich, UK) y heparina 100 U/mL (Leo Laboratories, UK). Tras centrifugar (2000 x g, 5 min), recogimos los sobrenadantes de plasma) y se almacenaron congelados hasta la medida de su contenido en eicosanoides mediante cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas [LC-MS]^{34,35}. Brevemente, tras la extracción con acetato de etilo, las muestras se pasaron por gravedad por columnas MaestroA (Tecan, Suiza), las columnas se lavaron con acetonitrilo, las muestras se secaron mediante centrifugación al vacío a 37°C y por último se reconstituyeron en etanol al 30%. Los eicosanoides plaquetarios se separaron mediante HPLC de fase inversa en una columna Luna C18(2) de 1x150 mm, 5 μ m (Phenomenex, CA, EE. UU.) y se cuantificaron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo MDS Sciex API 3000 (Applied Biosystems-ThermoFisher Scientific).

Inmunofluorescencia en plaquetas y leucocitos

Siguiendo un procedimiento estándar ya descrito,³⁶ Muestras plaquetas y leucocitos del paciente, y de controles, se incubaron con anticuerpos anti-COX-1 (Cell Signalling Technology, UK; 4841S; 1:100), anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich, T5168; 1:200) y anti-CD45 (Abcam, UK, ab8216; 1:200) durante una noche. Los cristales se lavaron y se incubaron (60 min, RT) con los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa647 (Life Technologies; A-31573; 1:500); Alexa488 (Life Technologies; A-21202; 1:500) para detectar COX-1, α -tubulina y CD45, respectivamente. Las muestras se incubaron con DAPI (25 μ g/mL; Life Technologies) durante 10 min para teñir los núcleos de leucocitos. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio y se visualizaron con objetivos de inmersión en aceite (CFI Plan Apochromat 40X, NA1.4, 63x para plaquetas y 40x para leucocitos) en un microscopio de barrido láser confocal (LSM 880 con Airyscan, Zeiss, Reino Unido). La adquisición y el procesamiento de las imágenes se realizó

utilizando los softwares ZEN (versión 2.35spi, Zeiss) e ImageJ (versión 1.51a, National Institutes of Health, USA).

Modelos celulares

Para evaluar *in vitro* el efecto deletéreo de la variante p.Asn143Ser en COX-1 identificada en el paciente, establecimos modelos celulares con las líneas HEK 293T y HEK 293. Estas líneas celulares se seleccionaron por presentar niveles de expresión de COX-1 muy bajos³⁷. Para los experimentos de transfección, se emplearon vectores pcDNA3.1+/C-(K)-DYK conteniendo el cDNA nativo (WT, del inglés *wild-type*) o mutante (c.428A> G [p.Asn143Ser]) de *PTGS1*, que estaban disponibles comercialmente (OHu14933D, Genscript). Adicionalmente, se preparó a partir del vector pcDNA3.1+/C-(K)-DYK *wild-type* una construcción mutante Ser145Ala mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit *Stratagene QuikChange Site-Directed Mutagenesis* con los *primers* adecuados (F5' GGAGTCTTCTCCAACGTGGCCTATTACACTCGTATTCTG3'; R5' CAGAATACGAGTGTAATAGGCCACGTTGGAGAAAGACTCC3') y siguiendo un procedimiento previamente descrito³⁸.

Las células HEK 293 T y HEK 293 (ATCC, LGC Standards S.L.U. España) se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] suplementado al 10% con suero bovino fetal (FBS, del inglés, *fetal bovine serum*).

Las células HEK 293 T (2×10^5 /pocillo) se transfectaron de forma transitoria con los vectores que expresan la COX-1 *wild-type* o mutante (p.Arg143Ser o p.Ser145Ala) usando el kit *Lipofectamine 3000* (ThermoFisher Scientific). Se aseguró que la eficiencia de transfección era comparable en las distintas condiciones, midiendo por citometría de flujo los niveles intracelulares de la COX-1 recombinante con el kit *BD IntraSure* (BD Biosciences) y el anticuerpo α -DYKDDDDK*PE (BioLegend, CA, USA, Cat#637309).

Las células 293 HEK (2×10^5 /pocillo) se transfectaron con los vectores que expresan la COX-1 *wild-type* o mutante Ser143 mencionados arriba, que también contienen un gen de resistencia a neomicina. Para la selección de las células que expresen de forma estable el vector con el que se transfectaron, las células se seleccionaron durante 20 días en un medio suplementado con gentamicina (G418, ThermoFisher Scientific). Los clones de células resistentes y transfectadas de modo estable se aislaron y se cultivaron separadamente. Por último, las células que expresan de forma estable la COX-1 *wild-type* o la mutante Ser143 se transfectaron de forma transitoria con diferentes cantidades del vector (0.25-3 μ g) que expresa la COX-1 alternativa.

En ambos modelos celulares, estable y transitorio, 48h después de la transfección se lavaron las células con PBS y se usaron en el experimento de estimulación y para la preparación de lisados proteicos para western blot. Así, en los experimentos de estimulación, las células (25×10^4 por cada condición de transfección) se incubaron con PBS o con AA 500 μ M (37 °C, 30 min), se centrifugaron y los sobrenadantes se

recuperaron y congelaron a -80°C hasta la determinación de TXA_2 mediante ELISA (Cayman Chemical).

Inmunoblotting

Las plaquetas lavadas (1×10^9 plaquetas/mL) se resuspendieron en tampón de Tyrode modificado conteniendo inhibidores de proteasa (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Reino Unido), y se lisaron con Triton X-100 (0,5% v/v). Las proteínas de los lisados se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 8% durante 90 min y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Merck KGaA, Alemania). Siguiendo los procedimientos estándar de Western Blot³³ las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-COX-1 (Cell Signaling Technology, 4841S ,1:1000) o anti- β -actina (Sigma-Aldrich, cat# A3854, 1:10000), seguido de los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-cabra correspondientes conjugados con la enzima peroxidasa (Sigma-Aldrich, UK; 12-348; 1:10000). Finalmente, las proteínas reconocidas se detectaron incubando la membrana con un reactivo quimioluminiscente sensible a peroxidasa (GE HealthcareR ECL) y midiendo la señal de quimioluminiscencia generada en un equipo ImageQuant LAS4000mini (Exon Biotec, GE HealthcareR).

3. Resultados

Descripción clínica

El probando era una adolescente de 13 años de origen asiático adoptada por una familia española. La paciente presentó diátesis hemorrágica moderada desde la infancia, caracterizada por hematomas y petequias, siendo más frecuentes después de traumatismos leves, así como epistaxis recurrentes y prolongadas en ocasiones asociadas a la ingesta de AINEs. La paciente también sufría de menorragia, que alguna vez requirió tratamiento con ácido tranexámico y desmopresina, y sangrado excesivo después de procedimientos quirúrgicos como amigdalectomía. Además, mostró, en pruebas repetidas, hemograma normal, incluido el número y el volumen de plaquetas (**Tabla 1**). No se observaron anomalías en los frotis de sangre. Los parámetros bioquímicos y de coagulación de la sangre estaban dentro de los rangos normales. No se presentaron signos clínicos de disfunción orgánica/tisular relevante, inmunitaria o cognitiva.

Tabla 1. Parámetros sanguíneos y síntomas de sangrado en el portador heterocigoto de la variante nueva p.Asn143Ser en COX-1.

Edad	13 años
Parámetros sanguíneos	
WBC, $\times 10^9/L$	5.73
RBC, $\times 10^{12}/L$	3.89
Hb, g/dL	12.2
Hct (%)	33.3
Plaquetas, $\times 10^9/L$	206
MPV, fL	11.4
PFA-100 CT (s)	
Colágeno/Epinefrina	>300
Colágeno/ADP	120s
ISTH-BAT	6
Síntomas de sangrado	-Epistaxis -Hematomas y petequias -Menorragia -Sangrado post-cirugía

WBC=glóbulos blancos; RBC=glóbulos rojos; Hb=hemoglobina; Hct=hematocrito; MPV=volumen plaquetario medio; PFA-100= analizador de función plaquetaria; CT=tiempos de oclusión.

Estudios de función plaquetaria

La paciente presentó una historia de diátesis hemorrágica desde el nacimiento. En el ensayo en sangre total con el equipo semiautomático PFA-100, se obtuvieron tiempos de oclusión en el rango alto de la normalidad para el cartucho de colágeno/ADP y muy prolongado con el cartucho colágeno/epinefrina, sugiriendo una alteración plaquetaria “*aspirina-like*” (Tabla 1). Los ensayos de citometría de flujo mostraron que la expresión de los principales receptores adhesivos en la superficie de las plaquetas era similar en el probando y en dos controles sanos analizados en paralelo el mismo día (Figura 2A). En cambio, se observó la paciente, vs. los controles, una reducción del 50% en la unión de fibrinógeno a las plaquetas estimuladas con diferentes agonistas, excepto PAR4 (Figura 2B). En comparación con los controles, las plaquetas del probando también mostraron un defecto en la secreción, inducida con agonistas, de los gránulos α - (10-30%) y δ - (25-50%) evaluada mediante la expresión de P-selectina y CD63, respectivamente (Figura 2C).

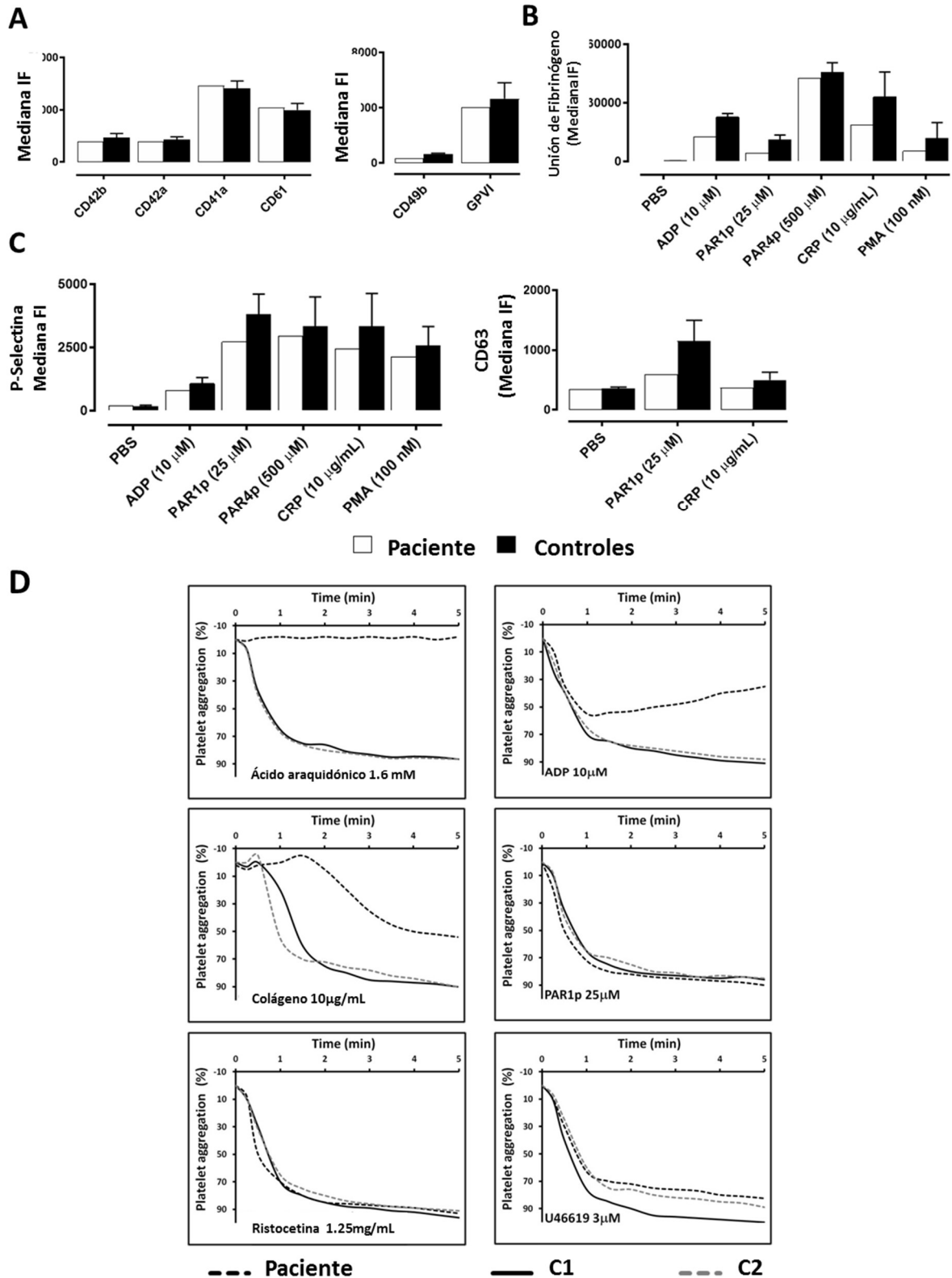


Figura 2. El fenotipo de la función plaquetaria del paciente es compatible con un defecto *aspirina-like*. **A)** Se analizó mediante citometría de flujo en sangre total diluida, la expresión de GPs plaquetarias en la paciente y en los controles sanos ($n=2$). Los anticuerpos fluorescentes usados se detallan en Materiales y Métodos. Las plaquetas se incubaron en condiciones estáticas con PBS o con agonistas plaquetarios y en presencia de fibrinógeno-Alexa 488 **B)** anticuerpos anti-CD62P o anticuerpos anti-CD63 **C)** para evaluar la unión de fibrinógeno y la liberación α -y δ -gránulos, respectivamente. En

los gráficos A-C se muestra la mediana de intensidad de fluorescencia (Mediana IF); media \pm desviación estándar en los controles. **D)** Se evaluó la agregación plaquetaria en respuesta a los agonistas señalados en PRP del caso índice y de los dos controles sanos (C1 y C2).

Por último, la respuesta de agregación plaquetaria confirmó en la paciente una disfunción plaquetaria compatible con un defecto funcional “*aspirina-like*” (**Figura 2D**). El patrón de agregación se caracterizó por una respuesta de agregación ausente con AA, reducida con ADP y colágeno, y normal con PAR1p y ristocetina. Las plaquetas del probando también mostraron una respuesta de agregación normal con U46619, un análogo estable de TXA₂, indicando que la señalización aguas abajo del receptor del TXA₂ no está alterada.

Identificación de una variante nueva en *PTGS1*

Como describimos en un estudio previo²⁶, el análisis genético del ADN de la paciente mediante HTS de un panel de genes identificó la variante heterocigota c.428A>G (p.Asn143Ser) en el exón 5 del gen *PTGS1* (ENST00000362012) que codifica la COX-1. La secuenciación de Sanger confirmó la presencia de esta mutación en la paciente. Desafortunadamente, no pudimos estudiar el patrón de herencia de la variante, ya que los padres biológicos del probando no estaban disponibles. Como se destaca en la **Figura 3A**, la variante nueva p.Asn143Ser se encuentra en el dominio catalítico N-terminal de COX-1 y afecta un residuo altamente conservado (Genomic Evolutionary Rate Profiling conservation score=5.59; <https://varsome.com/>)³⁰. Esta variante no está reportada en gnomAD o en las bases de datos del proyecto de 1000 genomas, pero si se describe el cambio de c.429C> G [p.Asn143Lys] en la colección de gnomAD con una frecuencia de alelos muy baja de 3.98×10^{-6} . Siguiendo los estándares de la ACMG, y sin considerar los datos de este estudio, el veredicto general para esta variante *missense* p.Asn143Ser es de “*significado incierto*”, a pesar de que la mayoría de los análisis computacionales *in silico* predicen un efecto deletéreo (<https://varsome.com/>) (**Tabla 2**).

Sorprendentemente, el residuo Asn143 es uno de los tres sitios de N-glicosilación predichos en la COX-1 humana (**Figura 3A**). El cristal de COX-1 humano recientemente resuelto por *Scilimati A et al.* (<https://www.rcsb.org/structure/6Y3C>)³⁹ (**Figura 3B**) confirmó que el residuo Asn143 tiene unido un N-glicano. Así, la variante *missense* que cambia Asn por Ser aboliría teóricamente esta secuencia de N-glicosilación dando como resultado una proteína hipoglicosilada con consecuencias desconocidas en el plegamiento, secreción, estabilidad y actividad enzimática.

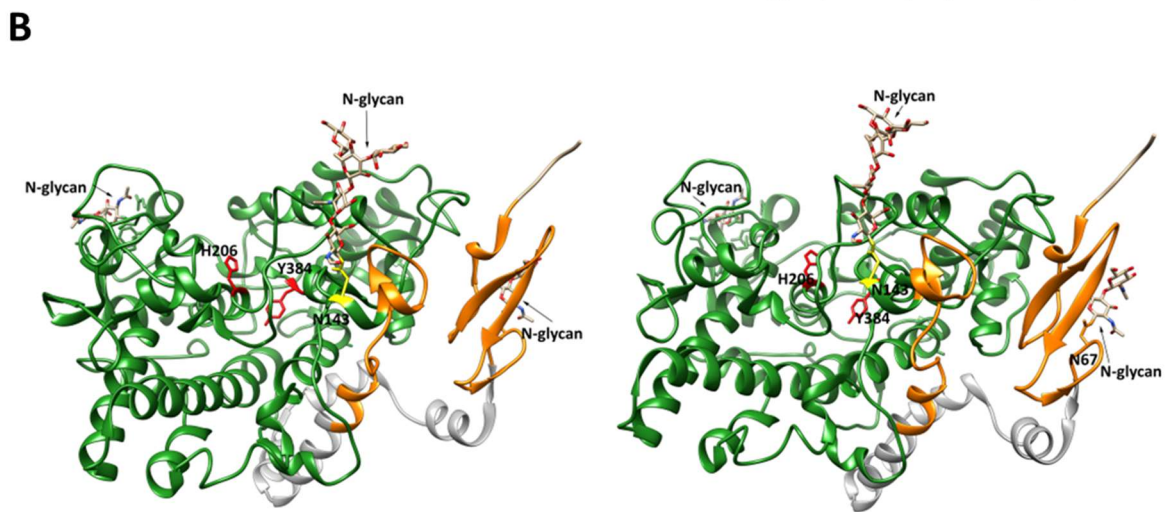
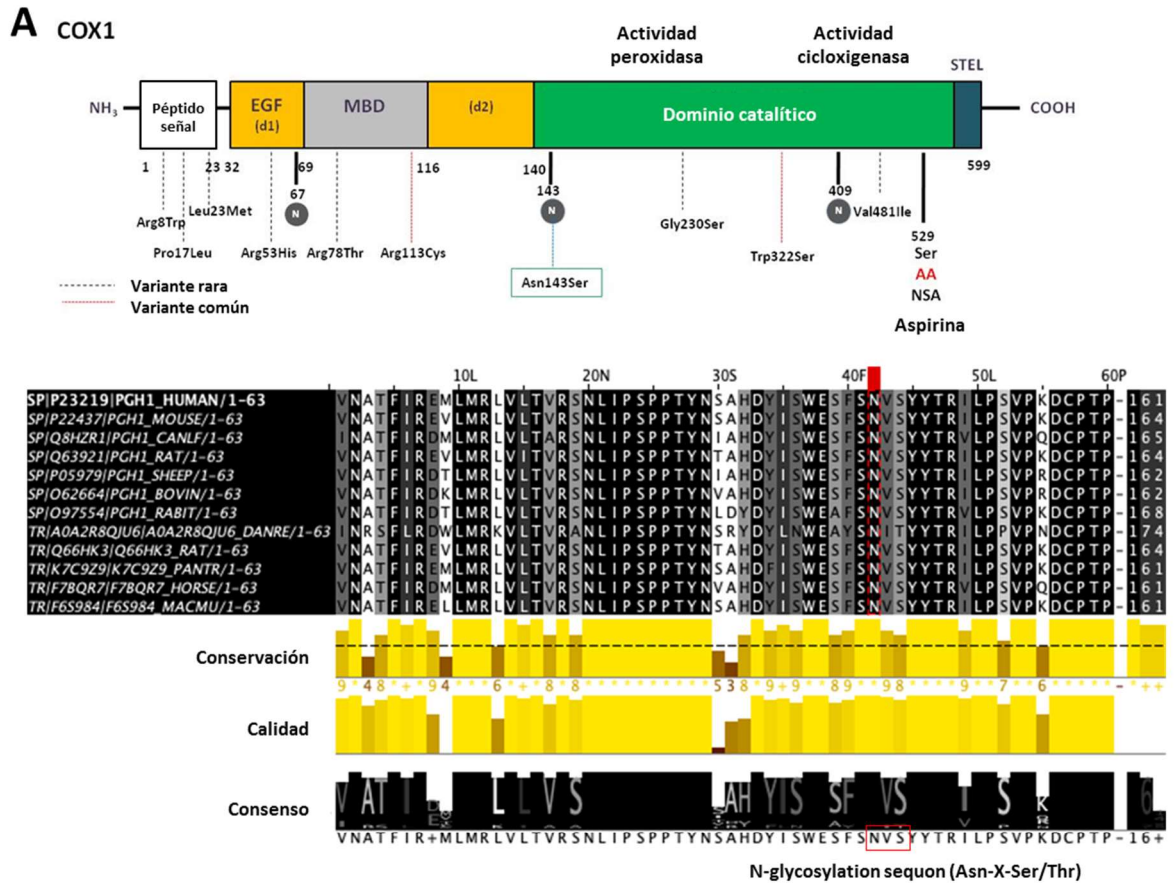


Figura 3. Representación esquemática de COX-1 en la que se muestran diferentes dominios y la localización de las variantes genéticas conocidas en COX-1, conservación de la secuencia de la N-glicosilación del residuo Asn143 y su localización en la estructura tridimensional de COX-1. A) Representación esquemática de la proteína COX-1 con todas las variantes genéticas descritas en PTGS1. Se muestran las variantes comunes (línea de puntos azul) y las variantes raras (línea de puntos roja). Se destacan los residuos N-glicosilados con círculos grises. Se representa el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de COX-1 de diferentes especies indicando que el residuo mutado (marcado con un cuadrado rojo) se encuentra conservado entre las especies. También se marca el residuo afectado. **B)** Se visualiza la estructura tridimensional de la proteína COX-1 humana nativa usando el cristal de Scilimati A et al (PDB:6y3c) en el software Quimera. Se muestra la N-glicosilación del residuo 143 en color amarillo; los residuos catalíticos se muestran en color rojo; los glicanos están marcados con

flechas; los diferentes dominios de la proteína COX-1 están coloreados con el mismo patrón usado en el panel A.

Tabla 2. (A) Clasificación del ACMG y (B) scores de patogenicidad de la variante p.Asn143Ser con varios predictores.

A: Veredicto: “Significado incierto”

X PVS1	X PS1	X PS2	X PS3	<input type="checkbox"/> PS4	X PM1	✓ PM2 Moderate	<input type="checkbox"/> PM3
X PM4	X PM5	X PM6	X PP1	X PP2	✓ PP3 Supporting	<input type="checkbox"/> PP4	X PP5
X BA1	X BS1	X BS2	X BS3	X BS4			
✓ BP1 Supporting	<input type="checkbox"/> BP2	X BP3	X BP4	<input type="checkbox"/> BP5	X BP6	X BP7	

B

Computational predictor	Califfication	Score
MutationTaster	Disease causing	1
Mutation assessor	Medium	3.46
FATHMM	Tolerated	2.31
FATHMM-MKL	Damaging	0.9959
FATHMM-XF	Damaging	0.9037
LRT	Deleterious	0
DEOGEN2	Tolerated	0.4877
EIGEN	Pathogenic	0.9345
EIGEN PC	Pathogenic	0.8692
SIFT	Damaging	0.002
SIFT4G	Damaging	0.004
PROVEAN	Damaging	-4.22
MVP	Benign	0.8289
REVEL	Benign	0.546
PrimateAI	Damaging	0.4489
MetaSVM	Tolerated	-0.6806
MetaLR	Tolerated	0.1654
Polyphen	Probably damaging	0.997
Frecuencia alélica	No reportada previamente	

ACMG=American College of Medical Genetics; Frecuencia alélica con gnomAD browser database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>); Toda la información está disponible en (<https://varsome.com/>).

Efecto de la nueva variante p.Asn143Ser en la expresión de COX-1 en plaquetas y leucocitos.

Como se ilustra en la **Figura 4A**, el análisis de inmunofluorescencia en plaquetas y leucocitos no mostró diferencias en la expresión de COX-1 entre la paciente portadora de la variante p.Asn143Ser y un sujeto sano analizado en paralelo. En dos ensayo de *immunoblotting* independientes, se observó en la paciente una banda adicional de COX-1 con mayor movilidad electroforética (peso molecular más bajo) que la COX-1 normal, compatible con una forma hipoglicosilada de COX-1(**Figura 4B**).

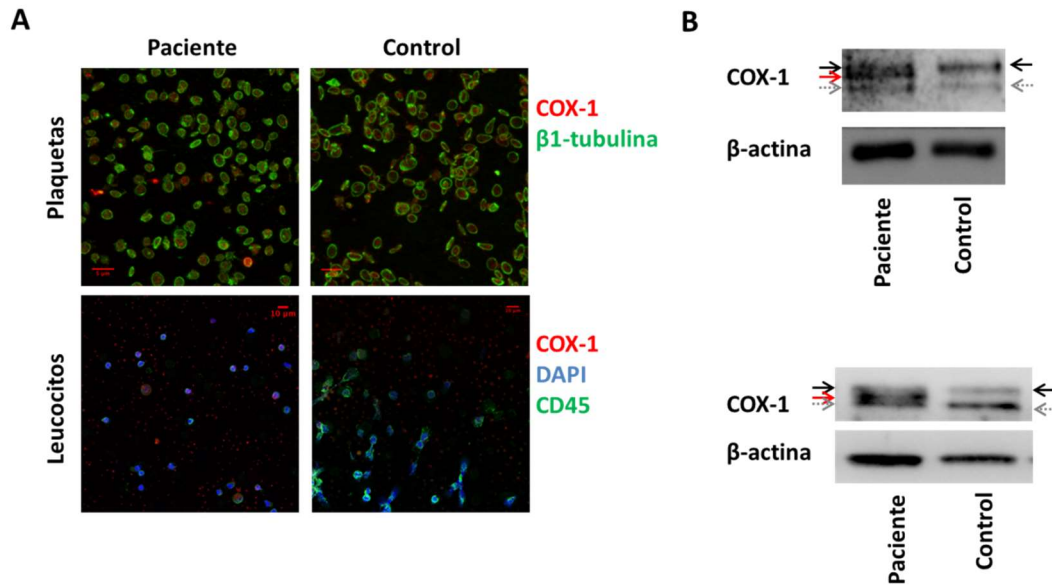


Figura 4. Efecto de la variante nueva p.Asn143Ser en *PTGS1* sobre la expresión de COX-1 en plaquetas y leucocitos. A) Análisis de inmunofluorescencia de plaquetas y leucocitos de la paciente y el control. En las plaquetas, la tubulina se representa en color verde y la COX-1 en color rojo. Se identificaron los leucocitos utilizando CD45 (color verde) como marcador de superficie, y DAPI (color azul) como marcador nuclear, mientras que COX-1 se representa en color rojo. Las imágenes se obtuvieron con el equipo “Airyscan laser scanning confocal microscope”. Las barras representan 5 μ m para plaquetas y 10 μ m para leucocitos. **B)** Dos western blots independientes muestran COX-1 en las plaquetas de la paciente y del control analizado en paralelo. Los lisados plaquetarios se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 8% durante 90 minutos. Además de la COX-1 nativa (flecha negra), se detectó en la paciente una forma de COX-1 hipoglicosilada de bajo peso molecular (flecha de color rojo). La flecha de color gris corresponde a una banda no específica. Se empleó β -actina como control interno.

La nueva variante p.Asn143Ser se asocia con un defecto en la actividad catalítica de COX-1

Para evaluar si la sustitución de p.Asn143Ser, incluso en heterocigosis, afecta la actividad de COX-1 en las plaquetas del paciente, determinamos los niveles de TxB_2 (el producto estable de TXA_2^{24}) en los sobrenadantes de las reacciones de agregación plaquetaria previamente mencionados. Como se muestra en la **Figura 5A**, para todos los agonistas testados, el PRP del paciente mostró una marcada reducción en la síntesis de TxB_2 (<10% de los niveles de control). En otra serie de experimentos, se evaluó, mediante LC-MS, el perfil de eicosanoides en sangre total estimulada con PBS (nivel basal), colágeno o PAR1p. Como era de esperar², la estimulación de la sangre del control con agonistas aumentó considerablemente la síntesis de TxB_2 y 12-HETE, siendo los niveles más altos al estimular con colágeno. Además, la síntesis de PGE_2 , PGD_2 , 15-HETE, 11-HETE y 5-HETE también aumentó pero en menor medida (**Figura 5B; Tabla 3**). En cambio, en la paciente, se obtuvo una reducida síntesis de todos los eicosanoides dependientes de COX-1, entre los que se incluye TXA_2 , PGE_2 , y PGD_2 , 15-HETE, 11-HETE; y de 12-HETE y 5-HETE que son metabolitos de 12- y 5-LOX, respectivamente (**Figura 5B; Tabla 3**). Llamativamente, en muestras de sangre no

estimuladas, los niveles de TXB₂, a diferencia de los de 12-HETE and 5-HETE, estaban marcadamente menores en la paciente respecto a los controles.

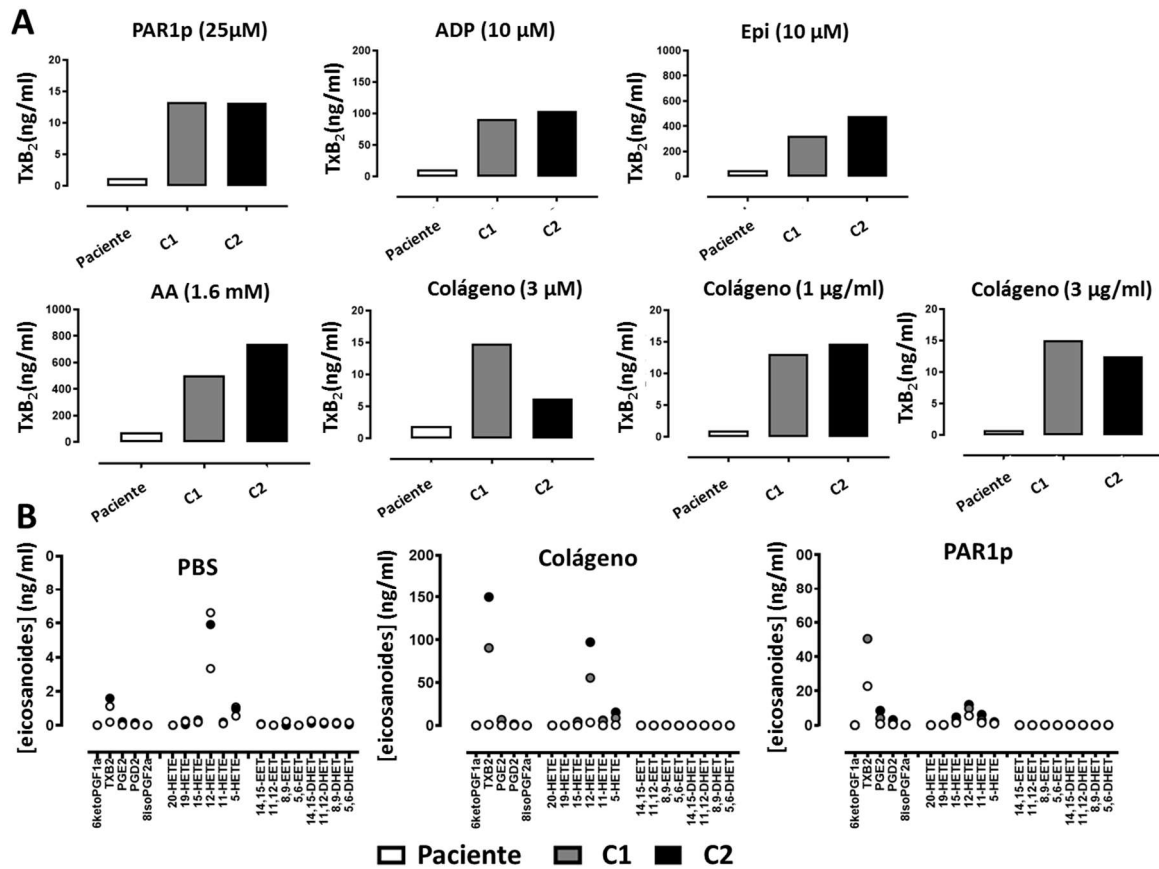


Figura 5. Liberación de TXA₂ en plasma rico en plaquetas y producción de eicosanoides en sangre total del paciente y control paralelo. A) Niveles de TXB₂ (ng/mL) en sobrenadantes de las reacciones de agregación plaquetaria de la paciente y de los controles (C1 y C2) medidos mediante ELISA. B) Niveles de eicosanoides determinados mediante LC-MS (comatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas) en sangre total del paciente y de los controles (C1 y C2), a nivel basal (PBS) y después de estimular con colágeno (30 mg/mL) o con TRAP-6 amida (30 μmol/L).

Tabla 3. Síntesis de eicosanoides en sangre total estimulada con agonistas determinados con LCMS. Niveles totales de eicosanoides en sangre total de sujetos sanos y del paciente tras incubar con PBS, colágeno (30 µg/mL) o PAR1p (TRAP-6 amida) (25 µM).

Metabolito (ng/mL)	Paciente			C1			C2		
	PBS	Colágeno (30 µg/mL)	PAR1p (25µM)	PBS	Colágeno (30 µg/mL)	PAR1p (25µM)	PBS	Colágeno (30 µg/mL)	PAR1p (25µM)
6ketoPGF1a	0,00100	0,00367	0,00267	0,00500	0,01533	0,00200	0,00100	0,00867	0,02033
TXB2	0,19000	0,98600	22,79667	1,11633	90,45033	50,41900	1,58400	149,89300	113,25867
PGE2	0,01433	0,03200	0,76033	0,07967	6,74867	4,09833	0,20433	5,82600	8,49033
PGD2	0,02833	0,04367	0,43700	0,09233	1,48867	0,94333	0,14533	1,38967	3,12333
8isoPGF2a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-HETE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19-HETE	0,20600	0,23233	0,19600	0,26467	0,12200	0,16300	0,04067	0,10967	0,10767
15-HETE	0,19500	0,16033	1,40067	0,30800	3,98867	2,41967	0,17133	4,51300	4,63833
12-HETE	3,33033	3,48100	5,57833	6,61000	55,63067	9,77867	5,91767	97,24267	11,97133
11-HETE	0,09600	0,11467	1,45267	0,18567	5,41400	2,99200	0,10700	6,09967	6,19967
5-HETE	0,54433	0,57367	0,88733	1,07233	8,84433	1,53967	0,95200	15,41467	1,88433
14,15-EET	0,05000	0,06333	0,06267	0,04800	0,03600	0,04667	0,09200	0,05167	0,00000
11,12-EET	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8,9-EET	0,22833	0,28867	0,13033	0,00000	0,41633	0,22267	0,00000	0,34500	0,08933
5,6-EET	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14,15-DHET	0,26433	0,24933	0,25900	0,24867	0,20900	0,20033	0,11800	0,12733	0,13867
11,12-DHET	0,17167	0,13200	0,15500	0,18000	0,14700	0,15667	0,08467	0,09167	0,10200
8,9-DHET	0,12233	0,14967	0,15133	0,16567	0,12000	0,10433	0,07133	0,04400	0,06967
5,6-DHET	0,15633	0,15467	0,19933	0,13933	0,11067	0,12000	0,03800	0,04167	0,06200

Los modelos celulares demuestran que la variante p.Asn143Ser afecta la N-glicosilación y actividad de la enzima con un efecto dominante negativo

Las eficiencias de transfección de las células HEK 293 T alcanzadas con los vectores *wild-type* (Asn143) o mutantes (Ser143 o Ala145) de COX-1 fue comparable en todas las condiciones, tal y como muestran los niveles similares de COX-1 intracelular medidos por citometría de flujo (**Tabla 4**). Como se muestra en la Figura **6A**, las células que expresan la COX-1 nativa (Asn143) respondieron a la estimulación con AA 500 μ M con una producción notable de TXB₂. En cambio, las células transfectadas con el mutante Ser143 COX-1 casi no mostraron síntesis de TXB₂ en respuesta a la estimulación con AA (194.0 \pm 48.2 pg/mL), alcanzando unos niveles similares a los observados en las células no transfectadas (UNT) (169,0 \pm 24,8 pg/ml). Curiosamente, las células cotransfectadas con cantidades iguales de COX-1 *wild-type* (Asn143) y COX-1 mutante Ser143 (1,5 μ g de cada vector) mostraron una síntesis de TxB₂ reducida en un 70% en comparación con las células transfectadas solo con COX-1 *wild-type* (Asn143+Ser143= 907,5 \pm 888,9 frente a Asn143=2906,9 \pm 3736,1 pg/ml). La reducción del 70%, y no del 50% como correspondería si la forma nativa aportase el 50% de actividad, sugirió un efecto dominante negativo de la variante (**Figure 6A**). Estos resultados se confirmaron en otra serie de experimentos de transfección en los que se valoró la producción de TXB₂ en una curva dosis-respuesta de AA. Como se esperaba, la síntesis de TXB₂ aumentó de forma dosis-dependiente cuando las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de AA (0.5-10 mM) o cuando fueron transfectadas con niveles crecientes de vector Asn143 COX-1 (1,5-3 μ g). En cambio, en las células transfectadas con el mutante Ser143 la síntesis del TXB₂ estaba anulada con todas las dosis de AA. Sorprendentemente, a dosis bajas de AA, las células cotransfectadas (Asn143 + Ser143) mostraron una reducción superior al 50% en la síntesis de TXB₂ en comparación con las células transfectadas únicamente con una dosis equivalente de Asn143 COX-1 (**Figura 6B**).

Tabla 4. Niveles de COX-1 en células 293T HEK transfectadas con los vectores wild-type [WT], mutante Ser143 [MUT], mutante Ala145 o cotransfectada con los vectores with wild-type y mutante Ser143 [HET].

% + α -DYKDDDDK cells		
	MEAN	SD
WT	48,04	13,06
MUT	50,89	8,18
HET	45,76	14,07
145Ala	49,5	5,93

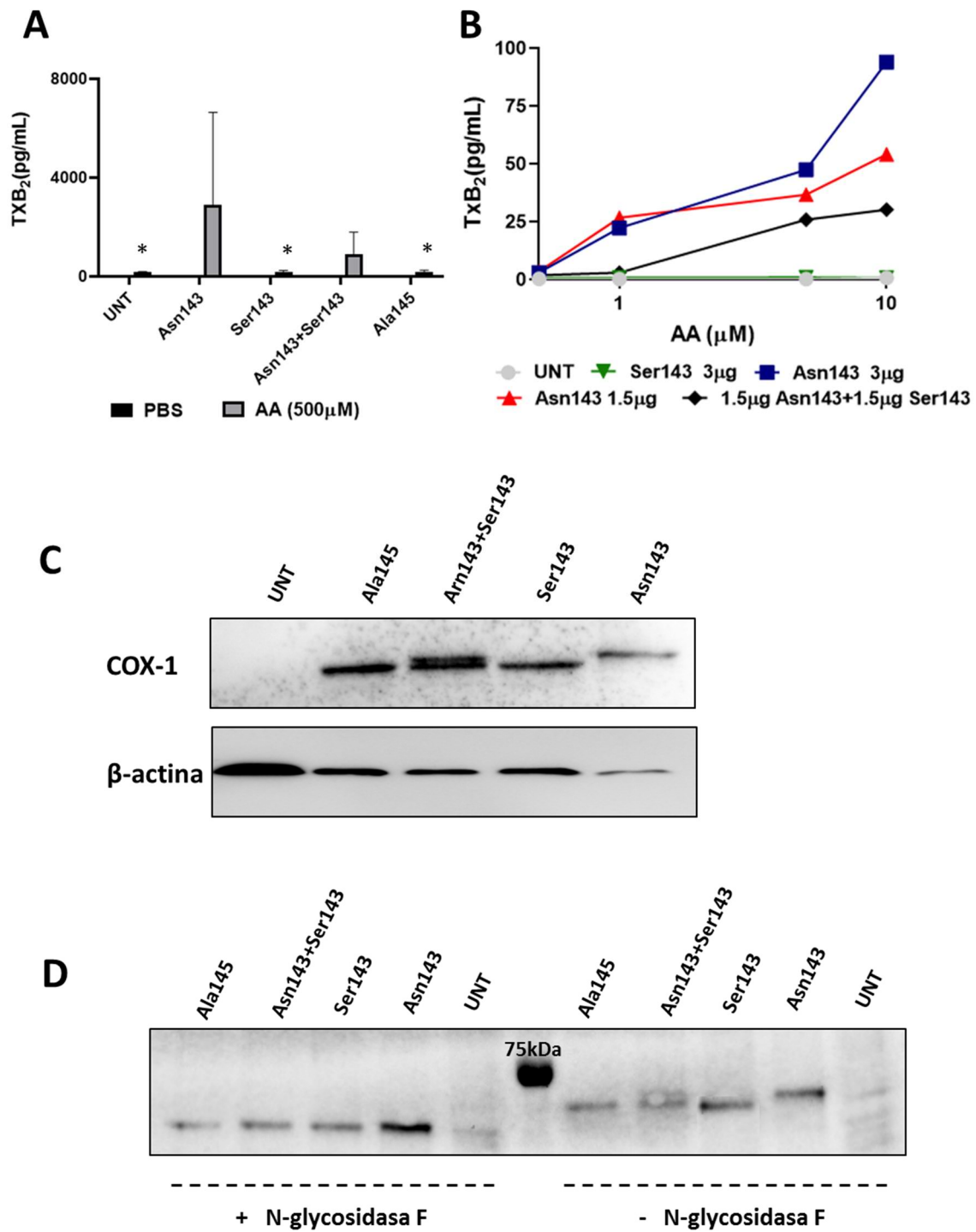


Figura 6. La sustitución c.428A>G [p.As143Ser] en *PTGS1* causa pérdida de un N-glicano dentro del dominio catalítico de COX-1 y produce una enzima disfuncional. A) Las células 293 T HEK fueron no transfectadas [UNT], transfectadas con un vector de COX-1 wild-type (Asn143), con un vector con la COX-1 mutante Ser143 (Ser143) o co-transfectadas con ambos vectores (Asn143+Ser143), o transfectadas con un vector con la COX-1 mutante Ala145 (Ala145), como se describe en Materiales y Métodos. Se evaluó la actividad catalítica enzimática de COX-1 utilizando ELISA para evaluar la formación de TXA₂ bajo estimulación con AA. Los gráficos muestran la media ± la desviación estándar de los valores obtenidos en 3 experimentos independientes. *indica un valor de P = 0.05 vs. Asn143 (U de Mann-Whitney test). **B)** Células HEK 293 T no transfectadas [UNT], transfectadas con distintas cantidades del vector COX-1 wild-type (Asn143), transfectadas con el vector mutante Ser143, o co-

transfectadas con la misma cantidad de ambos vectores (Asn143+Ser143), se estimularon con diferentes concentraciones de AA (0.5 -10 mM) y se evaluó la formación de TXA₂ utilizando un ELISA. El diagrama es representativo de dos experimentos independientes C) Determinación mediante western blot de la expresión de COX-1 en células HEK 293 T. β -actina se usó como control interno. D) Western blots de la expresión COX-1 en células HEK 293 T tratadas (+) o no tratadas (-) con N-glicosidasa F.

El mutante Ser143 COX-1 mostró una mayor movilidad electroforética que la COX-1 Asn143 nativa, compatible con una enzima hipoglicosilada con una masa molecular reducida (**Figura 6C**). Además, las células cotransfectadas con Asn y Ser143 COX-1 mostraron una banda de proteína COX-1 doble (**Figura 6C**), similar a la observada en lisados de plaquetas de pacientes. Es importante destacar que esta doble banda de COX-1 desapareció tras el tratamiento de los lisados de células cotransfectadas con N-glicosidasa F (**Figura 6D**), demostrando que la diferencia de tamaño entre proteína nativa y mutante se debe a la pérdida de un glicano en ese residuo. Para determinar el papel del N-glicano en el residuo 143 de la enzima COX-1, generamos por mutagénesis dirigida el mutante alternativo p.Ser145Ala, que interrumpe la misma secuencia consenso de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) en COX-1. Este mutante también mostró una alterada síntesis de TXB₂ inducida por AA (**Figura 6A**), así como la expresión de una proteína COX-1 hipoglicosilada cuya diferencia de tamaño con la enzima *wild-type* también se resolvió tras el tratamiento con N-glicosidasa F (**Figura 6C-D**).

Por último, con el objetivo de evaluar si, dentro de la misma célula, la variante p.Asn143Ser tiene un efecto dominante negativo en la actividad enzimática de COX-1, establecimos un segundo modelo en el que las células HEK 293 se transfectaron primero de manera estable con cualquiera de los mutantes Ser143 o Asn143 COX-1, y luego se transfectaron transitoriamente con la construcción alternativa. Como se ilustra en la **Figura 7**, en las células que expresan de manera estable Ser143 COX-1, la síntesis de TXB₂ estaba completamente anulada. La co-expresión de la COX-1 Asn143 nativa recuperó parcialmente la producción de TxB₂ en estas células, pero siguiendo un patrón no lineal dependiente de la dosis. Solo cuando los niveles de la proteína *wild-type* eran muy superiores a los de la mutante Asn143 se incrementaba la síntesis del TXB₂. Un resultado similar se observó en el modelo celular opuesto (**Figura 8**). Estos datos demuestran que la mutación p.Asn143Ser reduce la actividad enzimática de COX-1 en mayor medida de lo que se esperaría si solo hubiera una reducción de la cantidad total de proteína funcional. Estos datos demuestran que la mutación p.Asn143Ser reduce la actividad enzimática de COX-1 en mayor medida de lo que se esperaría si solo hubiera una reducción de la cantidad total de proteína funcional.

Células 293 HEK que expresan la mutante de COX-1 Ser143

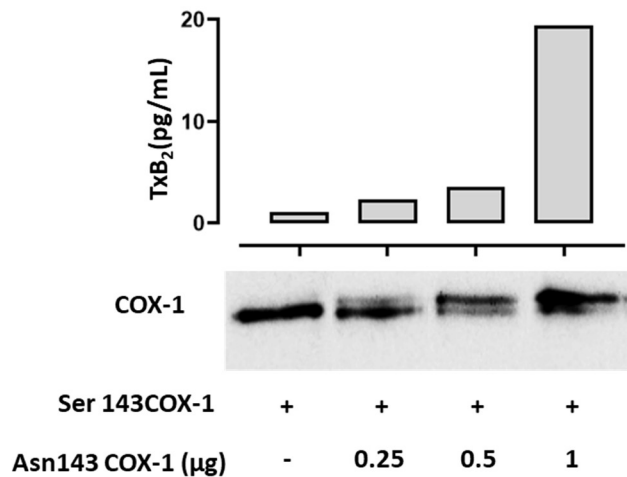


Figura 7. La COX-1 mutante Ser143 tiene un efecto dominante negativo en la actividad enzimática de la COX-1 nativa. Se transfectaron células HEK 293 con un vector que expresaba COX-1 mutante Ser143, con el gen de resistencia a neomicina y se cultivaron en presencia de gentamicina. Se aislaron los clones de células resistentes y transfectadas de forma estable y se transfectaron de forma transitoria con diferentes cantidades (0-1 mg) del vector que expresa la COX-1 nativa Asn143. Las células se lavaron y se separaron para la preparación de lisados proteicos, y para estimulación con AA (500µM) para medir la producción de TXA₂ mediante ELISA. Una doble banda proteica de COX-1 se identificó en células co-transfectadas. La transfección de la COX-1 nativa recuperó la producción de TXA₂, pero siguiendo un patrón no lineal dependiente de la dosis.

Células 293 HEK que expresan la COX-1 nativa (Asn143)

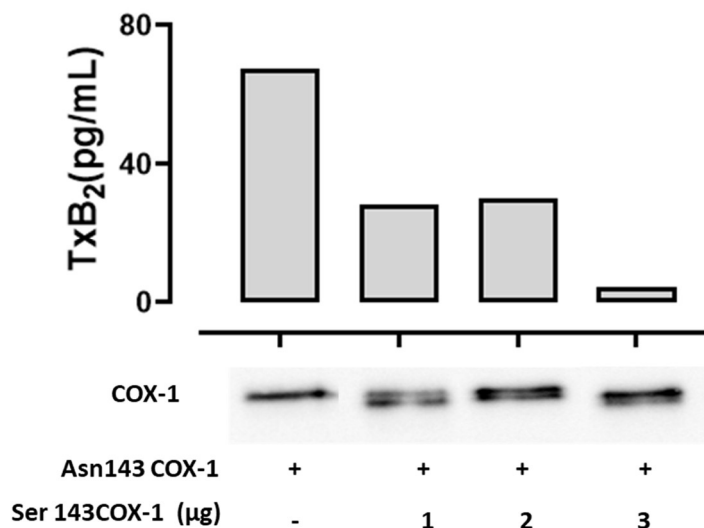


Figura 8. La COX-1 mutante Ser143 presenta un efecto dominante negativo sobre la actividad enzimática de la COX-1 nativa. Células HEK 293 se transfectaron con un vector de la COX-1 nativa con el gen de resistencia a neomicina y se cultivaron en presencia de gentamicina. Se aislaron los clones de células resistentes y transfectadas de forma estable y se transfectaron de forma transitoria con diferentes cantidades de la COX-1 mutante Ser143. Las células se lavaron y se separaron para la

preparación de lisados proteicos, y para estimulación con AA (500 μ M) para medir la producción de TXA₂ mediante ELISA.

4. Discusión

Las patologías congénitas vinculadas a genes que codifican enzimas plaquetarias implicadas en el metabolismo de los lípidos (*PLA2G4A*, *TBXAS1*, *COX-1*, *ALOX12*) constituyen un subgrupo dentro de los trastornos plaquetarios funcionales hereditarios⁴⁰⁻⁴³. Entre ellos, el defecto congénito de la COX-1 constituye una enfermedad rara, cuya presentación clínica incluye sangrado leve, agregación plaquetaria muy reducida o incluso nulo en respuesta al AA, pero normal con análogos de TxA₂ y reducción severa de la síntesis de TxA₂. Desde la década de 1970, se han reportado algunos pacientes raros con sospecha de padecer un defecto en COX-1, la mayoría de ellos sin una caracterización funcional detallada y sin diagnóstico molecular⁶. El modo de herencia de esta enfermedad es complejo y aún es desconocido, ya que se han descrito pacientes heterocigotos^{20,23}, casos con herencia autosómica dominante^{13,44} y casos con herencia recesiva⁴⁵.

Este estudio expande el espectro genético de la deficiencia congénita de COX-1 y proporciona nuevos conocimientos sobre la relación estructura-función de la enzima COX-1. Hemos caracterizado una paciente con diátesis hemorrágica desde el nacimiento y disfunción plaquetaria, que es portadora heterocigota de una nueva variante, c.428A>G [p.Asn143Ser], en el gen *PTGS1*. De manera similar a los casos previamente reportados⁶, esta paciente muestra una respuesta de agregación plaquetaria ausente con AA, pero normal con el análogo del TxA₂ U46619. La unión de fibrinógeno y la secreción de gránulos α y δ está parcialmente afectada. Confirmando el diagnóstico de laboratorio de deficiencia de COX-1 o defecto “*aspirina like*”, observamos en la paciente que la síntesis de TxB₂ en plaquetas y en sangre estimulada con agonistas es prácticamente nula.

El AA se metaboliza en los diferentes eicosanoides por tres vías enzimáticas: i) mediante las enzimas COX se generan prostanooides (incluyendo TXA₂ y las prostaglandinas); ii) a través de las enzimas LOX se transforma en ácidos hidroxieicosatrenóicos [HETEs]; iii) y a través de las enzimas P450 (CYP450) en ácidos epoxieicosatrienoicos [EETs]⁴⁶. En las plaquetas, la COX-1 está implicada en la síntesis de otros eicosanoides aparte de los prostanooides^{2,47}. Como se esperaba, en sangre de controles sanos estimulada con colágeno o PAR1p se generan niveles altos de TxB₂ y 12-HETE y bajos, pero detectables, de PGE₂, PGD₂, 15-HETE, 11-HETE y 5-HETE. En cambio, en la paciente la síntesis inducida por agonistas de todos estos metabolitos estaba muy reducida.

Un estudio muy reciente ha descrito el primer pedigrí con defecto “*aspirina-like*” asociada a la variante de herencia recesiva 965G> C [p.Trp322Ser] en *PTGS1*⁴⁵. Esta

variante anula la expresión de COX-1, altera la capacidad de *spreading* plaquetario y, como en nuestro caso, da lugar a una severa reducción de la síntesis de eicosanoides. Se ha descrito que la deficiencia de COX-1 podría estar causada por la reducción de la expresión de la enzima o por la expresión de una proteína COX-1 disfuncional^{6,19}. Nuestra paciente mostró niveles aparentemente normales de COX-1 en plaquetas y leucocitos por inmunofluorescencia e inmunoblotting. Sin embargo, el análisis mediante inmunoblotting en un gel SDS al 8% reveló en la paciente una segunda banda de proteína que encaja con una isoforma COX-1 de menor peso molecular. Esta proteína corresponde muy probablemente a una forma hipoglicosilada de COX-1, ya que la variante p.Asn143Ser elimina un sitio de N-glicosilación.

Los modelos celulares HEK 293 T y HEK 293 demostraron de forma clara el efecto deletéreo de la variante p.Asn143Ser en la N-glicosilación y en la actividad enzimática de COX-1. Mientras que las células transfectadas transitoriamente con la COX-1 *wild-type* (Asn143) respondieron a la estimulación con AA con un marcado aumento en la producción de TXB₂, las células transfectadas con la mutante Ser143 no sintetizan TXB₂, de forma similar a células no transfectadas. Curiosamente, las células cotransfectadas con cantidades iguales de COX-1 nativa y COX-1 mutante Ser143 (Asn143+Ser143), simulando un estado de heterocigosis, mostraron una reducción del ~70% en la producción de TXB₂, y no del 50% como cabría esperar si la forma nativa funcionase con normalidad.

Estos hallazgos se confirmaron en una serie alternativa de ensayos en los que encontramos que las células cotransfectadas (Asn143+Ser143) también mostraron una reducción superior al 50% en la síntesis de TXB₂ en comparación con las células que expresan un nivel equivalente de COX-1 nativa. Además, en células HEK 293 que expresan establemente el mutante Ser143 COX1 y cotransfectadas transitoriamente con cantidades variables de COX-1 nativa (Asn143), o el caso contrario, encontramos que la síntesis de TXB₂ para una cierta cantidad total de COX-1 nativa es menor en presencia, dentro de la misma célula, del mutante Ser143. En general, estos resultados muestran por primera vez que la variante p.Asn143Ser tiene un efecto dominante-negativo y su acción deletérea excede el efecto de haploinsuficiencia de la proteína COX-1 funcional.

Curiosamente, tanto las plaquetas del probando como las células HEK 293 T que expresan el mutante Ser143, mostraron una banda proteica adicional de COX-1 con mayor movilidad electroforética. El hecho de que la digestión con N-glicosidasa F de los lisados de células HEK 293 T, elimina las diferencias de tamaño entre la proteína *wild-type* y los mutantes Ser143 y Ala145, confirma que la diferencia en el tamaño de la proteína nativa y las mutantes se debe a la pérdida del N-glicano que decora el residuo Asn143.

En la secuencia de COX-1 humana se predicen tres *sequons* o secuencias de N-glicosilación en las posiciones 67, 143 y 409⁹. Otto *et al.*⁴⁸ han demostrado que la COX-1 ovina está realmente N-glicosilada en las posiciones Asn68, Asn144 y Asn410, que son los residuos ortólogos de la secuencia humana. De acuerdo con los resultados que obtuvimos en el modelo de células HEK 293 T, Otto *et al.* mostraron que la eliminación de esos N-glicanos suprime la actividad clicooxigenasa y peroxidasa de mutantes de COX-1 ovina hipoglicosilada⁴⁸.

La reciente resolución de la estructura cristalina de COX-1 humana por Scilimati *et al.*³⁹. (PDB: 6y3) proporcionó la primera evidencia experimental de que el residuo Asn143 está decorado con una cadena de un N-glicano. Nuestro estudio demuestra que este glicano es funcionalmente relevante ya que la interrupción de esta *sequon* de N-glicosilación al mutarlos residuos Asn143 o Ser145, dio como resultado una variante de COX-1 de menor tamaño y disfuncional.

La relevancia de la glicosilación en la función de las proteínas del sistema hemostático ha sido evidenciada previamente⁴⁹. Mecánicamente, los glicanos pueden influir en el plegamiento de proteínas, el tráfico y secreción celular, la afinidad de unión al sustrato, la proteólisis o aclaramiento y la actividad catalítica de las proteínas^{49,50}. Por ejemplo, la hipoglicosilación del FXI, inducida por una mutación específica en *F11* o por un defecto congénito en la glicosilación, es relevante para la dimerización y secreción del FXI^{51,52}. De la Morena *et al.*⁵³ han descrito que los defectos genéticos en la N-glicosilación conduce al plegamiento y secreción aberrante de antitrombina [AT], y representa una causa relativamente común de deficiencia de AT. Además, la β -glicofoma de AT que carece de un N-glicano en Asn135 muestra una mayor afinidad por la heparina y una mayor actividad inhibidora con relevancia clínica⁵⁴. Además, los carbohidratos también regulan la susceptibilidad del VWF y la proteína S a la proteólisis por ADAMTS13 y el aclaramiento plasmático, respectivamente^{49,55,56}. Por último, se ha mostrado que la N-glicosilación del receptor plaquetario de ADP P2Y12, no es crucial para su expresión y para la unión de ADP, pero es necesaria para la inhibición posterior de la actividad de la adenilato ciclasa⁵⁷.

Podríamos esperar que la eliminación de un N-glicano en el dominio catalítico de COX-1 afectase a su actividad enzimática. Sin embargo, fue inesperado el hecho de que las variantes heterocigotas que afectan la N-glicosilación en Asn143a puedan ejercer un efecto dominante negativo que anula la síntesis plaquetaria de TXA₂ en la paciente y que causa una reducción superior al 50% en la generación de TxA₂ en células heterocigotas para el cambio p.Asn143Ser.. Varios mecanismos pueden contribuir a un efecto dominante negativo. Primero, el hecho de que la COX-1 funcional actúe como un homodímero permite especular que tanto los dímeros de tipo *wild-type*/mutante como los mutante/mutante puedan tener una actividad alterada. Además, se ha mostrado que la dimerización entre los monómeros glicosilados y no glicosilados de COX-2, una isoforma de COX-1, es energéticamente más favorable que la dimerización

entre dos monómeros N-glicosilados⁵⁸. Por otro lado, el hallazgo que la síntesis de TXA₂, especialmente a baja concentración de AA, se reduce en células cotransfectadas con niveles equivalentes de la COX-1 mutante Ser143 y COX-1 nativa, sostiene que la pérdida de N-glicanos reduce el impedimento estérico y favorece el acceso del AA al dominio catalítico de la COX-1 mutante no funcional. En consonancia, se ha descrito un mecanismo similar para la variante Londres de AT⁵⁹.

En resumen, este trabajo amplía el espectro genético de la deficiencia congénita de COX-1, a través de la caracterización de un paciente con una variante nueva (c.428A>G) en *PTGS1*. Los estudios realizados en las plaquetas de la paciente y en modelos celulares demuestran que esta variante afecta la N-glicosilación postraduccional de COX-1 y conduce a la expresión de una proteína hipoglicosilada con un efecto dominante negativo en la actividad enzimática de la COX-1. Este estudio evidencia que la hipoglicosilación de COX-1 constituye un nuevo mecanismo dominante negativo que causa un trastorno de la función plaquetaria. De forma más general, nuestro estudio refuerza la relevancia de los N-glicanos en la actividad de las proteínas y destaca el papel de los defectos de la glicosilación en las enfermedades humanas.

5. Referencias

1. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009;94(5):700–711.
2. Kirkby NS, Reed DM, Edin ML, et al. Inherited human group IVA cytosolic phospholipase A2 deficiency abolishes platelet, endothelial, and leucocyte eicosanoid generation. *FASEB J*. 2015;29(11):4568–4578.
3. Nakahata N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 2008;118(1):18–35.
4. Crescente M, Menke L, Chan M V, Armstrong PC, Warner TD. Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). *Br. J. Pharmacol.* 2019;176(8):988–999.
5. Baigent C, Sudlow C, Collins R, Peto R. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br. Med. J.* 2002;324(7329):71–86.
6. Palma-Barqueros V, Bohdan N, Revilla N, et al. *PTGS1* gene variations associated with bleeding and platelet dysfunction. *Platelets*. 2021;32(5):710–716.
7. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. 1998;97–120.
8. Gerrard JM, White JG, Rao GHR, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am. J. Pathol.* 1976;83(2):283–298.
9. Majed BH, Khalil RA. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol. Rev.* 2012;64(3):540–582.
10. Chandrasekharan N V, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004;5(9):241.
11. Malmsten C, Hamnerg M, Svensson J, Samuelsson B. Physiological role of an endoperoxide in human platelets: hemostatic defect due to platelet cyclo oxygenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1975;72(4):1446–1450.
12. Lagarde M, Byron PA, Vargaftig BB, Dechavanne M. Impairment of Platelet

- Thromboxane A2 Generation and of the Platelet Release Reaction in Two Patients with Congenital Deficiency of Platelet Cyclo-oxygenase. *Br. J. Haematol.* 1978;38(2):251–266.
13. Nyman D, Eriksson AW, Lehmann W, Blombäck M. Inherited defective platelet aggregation with arachidonate as the main expression of a defective metabolism of arachidonic acid. *Thromb. Res.* 1979;14(4–5):739–746.
 14. Pareti FI, Mannucci PM, D'Angelo A, et al. Congenital deficiency of thromboxane and prostacyclin. *Lancet (London, England)*. 1980;1(8174):898–901.
 15. Boda Z, Tamás E, Altorjay I, Pfliegler G, Rak K. Congenital deficiency of cyclo-oxygenase in a woman with generalized atherosclerosis. *Scand. J. Haematol.* 1981;27(2):65–69.
 16. Horellou MH, Lecompte T, Lecrubier C, et al. Familial and constitutional bleeding disorder due to platelet cyclo-oxygenase deficiency. *Am. J. Hematol.* 1983;14(1):1–9.
 17. Nakanishi K, Ikeda K, Hato T, et al. Platelet cyclo-oxygenase deficiency in a Japanese. *Scand. J. Haematol.* 1984;32(2):167–174.
 18. Dubé JN, Drouin J, Aminian M, Plant MH, Laneuville O. Characterization of a partial prostaglandin endoperoxide H synthase-1 deficiency in a patient with a bleeding disorder. *Br. J. Haematol.* 2001;113(4):878–885.
 19. Matijevic-Aleksic N, Mcphedran P, Wu KK. Bleeding disorder due to platelet prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) deficiency. *Br. J. Haematol.* 1996;92(1):212–217.
 20. Yagmur E, Weiskirchen R, Schedel A, Bugert P. PTGS1 compound heterozygosity impairs gene expression and platelet aggregation and is associated with severe bleeding complications. *Thromb. Haemost.* 2013;110(5):1083–1085.
 21. Lee CR, Bottone FG, Krahn JM, et al. Identification and functional characterization of polymorphisms in human cyclooxygenase-1 (PTGS1). *Pharmacogenet. Genomics.* 2007;17(2):145–160.
 22. Nance D, Campbell RA, Rowley JW, et al. Combined variants in factor VIII and prostaglandin synthase-1 amplify hemorrhage severity across three generations of descendants. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14(11):2230–2240.
 23. Leinøe E, Zetterberg E, Kinalis S, et al. Application of whole-exome sequencing to direct the specific functional testing and diagnosis of rare inherited bleeding disorders in patients from the Öresund Region, Scandinavia. *Br. J. Haematol.* 2017;179(2):308–322.
 24. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1975;72(8):2994–2998.
 25. Chan M V, Hayman MA, Sivapalaratnam S, et al. Identification of a homozygous recessive variant in PTGS1 resulting in a congenital aspirin-like defect in platelet function. 2020;
 26. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2018;103(1):148–162.
 27. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:213.
 28. Gresele P, Orsini S, Noris P, et al. Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(3):732–739.
 29. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(9):2063–2065.
 30. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics.* 2019;35(11):1978–1980.
 31. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of

- sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015;17(5):405–424.
32. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25(9):1189–1191.
 33. Hardy AT, Palma-Barqueros V, Watson SK, et al. Significant Hypo-Responsiveness to GPVI and CLEC-2 Agonists in Pre-Term and Full-Term Neonatal Platelets and following Immune Thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.* 2018;118(6):1009–1020.
 34. Newman JW, Watanabe T, Hammock BD. The simultaneous quantification of cytochrome P450 dependent linoleate and arachidonate metabolites in urine by HPLC-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2002;43(9):1563–1578.
 35. Edin ML, Hamedani BG, Gruzdev A, et al. Epoxide hydrolase 1 (EPHX1) hydrolyzes epoxyeicosanoids and impairs cardiac recovery after ischemia. *J. Biol. Chem.* 2018;293(9):3281–3292.
 36. Kahr WHA, Lo RW, Li L, et al. Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2(-/-) mice. *Blood.* 2013;122(19):3349–3358.
 37. Sood R, Flint-Ashtamker G, Borenstein D, Barki-Harrington L. Upregulation of prostaglandin receptor EP1 expression involves its association with cyclooxygenase-2. *PLoS One.* 2014;9(3):e91018.
 38. Navarro-Fernández J, Eugenia de la Morena-Barrio M, Martínez-Alonso E, et al. Biochemical and cellular consequences of the antithrombin p.Met1? mutation identified in a severe thrombophilic family. *Oncotarget.* 2018;9(69):33202–33214.
 39. Miciaccia M, Belviso BD, Iaselli M, et al. Three-dimensional structure of human cyclooxygenase (hCOX)-1. *Sci. Rep.* 2021;11(1):4312.
 40. Bastida JM, Benito R, Lozano ML, et al. Molecular Diagnosis of Inherited Coagulation and Bleeding Disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019;45(7):695–707.
 41. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br. J. Haematol.* 2014;165(2):165–178.
 42. Rao AK. Inherited platelet function disorders. Overview and disorders of granules, secretion, and signal transduction. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2013;27(3):585–611.
 43. Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelet function: Selected updates. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(S1):S2–S9.
 44. Rolf N, Knoefler R, Bugert P, et al. Clinical and laboratory phenotypes associated with the aspirin-like defect: A study in 17 unrelated families. *Br. J. Haematol.* 2009;144(3):416–424.
 45. Chan M V, Hayman MA, Sivapalaratnam S, et al. Identification of a homozygous recessive variant in PTGS1 resulting in a congenital aspirin-like defect in platelet function. *Haematologica.* 2020;
 46. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15(8):511–523.
 47. Rauzi F, Kirkby NS, Edin ML, et al. Aspirin inhibits the production of proangiogenic 15(S)-HETE by platelet cyclooxygenase-1. *FASEB J.* 2016;30(12):4256–4266.
 48. Otto JC, DeWitt DL, Smith WL. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1993;268(24):18234–18242.
 49. Preston RJS, Rawley O, Gleeson EM, O'Donnell JS. Elucidating the role of carbohydrate determinants in regulating hemostasis: Insights and opportunities. *Blood.* 2013;121(19):3801–3810.
 50. Goettig P. Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(12):1–24.

51. Linssen M, Mohamed M, Wevers RA, Lefeber DJ, Morava E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol. Genet. Metab.* 2013;109(1):107–111.
52. McVey JH, Lal K, Imanaka Y, et al. Characterisation of blood coagulation factor XI T475I. *Thromb. Haemost.* 2005;93(6):1082–1088.
53. de la Morena-Barrio ME, Martínez-Martínez I, de Cos C, et al. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14(8):1549–1560.
54. McCoy AJ, Pei XY, Skinner R, Abrahams JP, Carrell RW. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J. Mol. Biol.* 2003;326(3):823–833.
55. McKinnon TAJ, Chion ACK, Millington AJ, Lane DA, Laffan MA. N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13. *Blood.* 2008;111(6):3042–3049.
56. Denis C V, Roberts SJ, Hackeng TM, Lenting PJ. In vivo clearance of human protein S in a mouse model: influence of C4b-binding protein and the Heerlen polymorphism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(10):2209–2215.
57. Zhong X, Kriz R, Seehra J, Kumar R. N-linked glycosylation of platelet P2Y₁₂ ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression. *FEBS Lett.* 2004;562(1–3):111–117.
58. Vann-Victorino DDC, Cunanan J, Chen M, et al. Effect of glycosylation of cyclooxygenase-2 (COX-2) on homodimerization. *FASEB J.* 2017;31(S1):1b79–1b79.
59. Raja SM, Chhablani N, Swanson R, et al. Deletion of P1 arginine in a novel antithrombin variant (antithrombin London) abolishes inhibitory activity but enhances heparin affinity and is associated with early onset thrombosis. *J. Biol. Chem.* 2003;278(16):13688–13695.

Capítulo II

Trombocitopenia asociada a SRC: una delgada línea entre una disfunción de megacariocitos y una enfermedad inmune.

Capítulo II: Trombocitopenia asociada a SRC: una delgada línea entre una disfunción de megacariocitos y una enfermedad inmune.

1. Introducción.

La tirosina quinasa Src es una proteína de señalización intracelular que pertenece a la familia de quinasas Src [SFK], que son reguladores clave de la transducción de señales aguas abajo de diferentes receptores implicados en procesos como la diferenciación, proliferación, supervivencia, motilidad y adhesión celular. Aunque en vertebrados la expresión de Src es ubicua en todas las células, destaca su mayor expresión en osteoclastos, neuronas y plaquetas¹. Las quinasas de la familia SFK juegan un papel central en la respuesta plaquetaria a una lesión vascular. La Src, la SFK más abundante en las plaquetas humanas, es esencial no solo para iniciar y propagar señales aguas abajo de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (receptor plaquetario del fibrinógeno), sino que también participa en la señalización mediada por el complejo inmunoreceptor apoyado en tirosina GPVI-FcR γ (receptor de colágeno) y el complejo GPIb-IX-V (receptor del factor de von Willebrand)². Las familias de tirosina quinasas Src y Bruton [BTK] forman unidades de señalización específicas en los tejidos en los que ambas se expresan, donde las SFK actúan como reguladores de la BTK^{3,4}. Cada vez hay más evidencias de que la sobreexpresión de BTK está implicada en la autoinmunidad sistémica, ya que induce un fenotipo autoinmune espontáneo con producción aumentada de citocinas⁵⁻⁹. Mientras que los pacientes con una función de BTK deteriorada sufren inmunodeficiencia debido a la ausencia de células B maduras e inmunoglobulinas^{10,11}, una fracción de ellos también muestra síntomas clínicos de autoinmunidad¹². En 2016, *Turro et al.* identificó por primera vez una variante germinal de ganancia de función en Src, el cambio p.E527K, en una familia que presentaba trombocitopenia dominante y hemorragia. Los pacientes afectados presentaban mielofibrosis juvenil, esplenomegalia y alteraciones óseas que incluían dismorfia facial leve y edentulismo prematuro¹³. Recientemente, se ha identificado la misma variante, *de novo*, en dos niños no emparentados con características clínicas muy diferentes. Una era una niña de 5 años con un fenotipo sindrómico complejo caracterizado por trombocitopenia variable asociada a dismorfismo facial, osteoporosis severa y trastornos neurológicos como autismo y retraso en el desarrollo del lenguaje¹⁴. El segundo era un niño de 2 años nacido en padres sanos, con trombocitopenia aislada no sindrómica¹⁵.

En este estudio presentamos una nueva familia muy amplia grande con trombocitopenia relacionada con Src [SRC-RT]. Mostramos que estos pacientes presentan un trastorno autosómico dominante de la megacariopoyesis, así como con una expresión y funcionalidad de BTK aparentemente alterada, que podría tener un

papel fundamental en su presentación clínica y en el perfil autoinmune de su enfermedad

2. Pacientes

En este proyecto hemos tenido la oportunidad de estudiar una familia en la que siete miembros presentan trombocitopenia asociada a la presencia en heterocigosis de la variante de ganancia de función p.E527K Src. Estos pacientes han sufrido con alta frecuencia trastornos autoinmunes y neurológicos, a diferencia de los familiares no trombocitopénicos (**Figura 1A y Tabla 1**).

Caso 3. Varón nacido en 1976, diagnosticado a los 9 años de trombocitopenia inmune [PTI], con recuento plaquetario de $57 \times 10^9/L$. Tres años después del diagnóstico el recuento de plaquetas fue de $22 \times 10^9/L$ y por ello se inició tratamiento con metilprednisolona 34 mg/día. Después de dos semanas, el recuento de plaquetas aumentó a $73 \times 10^9/L$, y desde julio de 1988 hasta noviembre de 1989 recibió tratamiento continuado con esteroides (rango 4-32mg/día) con una respuesta plaquetaria dependiente de la dosis (**Figura 1B**). En noviembre de 1989 fue sometido a esplenectomía, con hallazgos histológicos de bazo congestivo de $14 \times 9 \times 5,5$ cm. Desde entonces, ha mantenido una respuesta plaquetaria y no ha requerido tratamientos adicionales para la trombocitopenia. Se le detectó una deficiencia selectiva parcial de IgM (31mg/dL; valores normales [VN] 40-275mg/dL), con leve hipogammaglobulinemia (7 g/L; VN 8-14 g/L). Durante el seguimiento ha desarrollado amigdalitis recurrente, psoriasis en placas, angioedema y edema de úvula (**Tabla 1**).

Caso 6. Mujer nacida en 1977, diagnosticada de PTI a la edad de 8 años (recuento de plaquetas al diagnóstico de $96 \times 10^9/L$). Durante los siete años siguientes, el recuento de plaquetas disminuyó lentamente. En 1992 fue esplenectomizada (recuento de plaquetas en la cirugía: $58 \times 10^9/L$) con hallazgos histológicos de bazo congestivo con megacariocitos aislados. La paciente mostró una respuesta plaquetaria completa (con recuentos plaquetarios $>100 \times 10^9/L$) hasta diciembre de 2010 (semana 36 de embarazo) cuando el recuento de plaquetas bajó a $22 \times 10^9/L$. En ese momento, inició tratamiento con prednisona 60 mg/día, con un incremento en los recuentos plaquetarios ($48 \times 10^9/L$) después de una semana de terapia con corticoesteroides. Fue transfundida con un concentrado de plaquetas y tuvo un parto sin incidencias. Desde entonces, la paciente mantiene unos recuentos plaquetarios superiores a $100 \times 10^9/L$, con una fracción de plaquetas inmaduras [FPI] del 27.3% (VN $< 7\%$) (**Figure 1B**). No se han registrado complicaciones autoinmunes relevantes.

Caso 7. Varón nacido en 1979 con diagnóstico de PTI a la edad de 6 años (recuento de plaquetas al diagnóstico: $98 \times 10^9/L$). En enero de 2020, inició tratamiento de metilprednisolona 48 mg/día ya que el recuento de plaquetas era de $4 \times 10^9/L$. Después de 9 semanas, las plaquetas aumentaron a $91 \times 10^9/L$ y el paciente se sometió

a una esplenectomía (bazo de 18 x 12 x 8 cm). Desde entonces, los recuentos de plaquetas se han mantenido por encima de $150 \times 10^9/L$ (**Figura 1B**) con una FPI entre 13,1 y 22,6%. Se le ha detectado de forma recurrente una deficiencia leve de IgM y gammaglobulinas (35 mg/dL y 8 g/L, respectivamente). También presentó otras complicaciones médicas importantes: psoriasis, asma bronquial grave persistente, enfermedad de Crohn ileal y pleuropericarditis autoinmune (**Tabla 1**). El paciente también ha sufrido diversos eventos vasculares como trombosis portal, embolia pulmonar y trombosis de la vena yugular. Desde el año 2000 ha presentado crisis epilépticas parciales complejas con una frecuencia de 6-8 por mes, y en enero de 2018 fue sometido a resección del lóbulo temporal anterior y medial derecho con deterioro cognitivo residual y episodios convulsivos reducidos (2-3 por mes).

Caso 9. Varón nacido en 2001 que fue diagnosticado de trombocitopenia hereditaria (recuento de plaquetas: $38 \times 10^9/L$) y con mega-cisterna magna a la edad de 6 días, sin asociación posterior de discapacidad del neurodesarrollo. Ha padecido asma bronquial intrínseca y bronquitis recurrente en presencia de deficiencia parcial de IgA (41 mg/dL; VN, 70-400 mg/dL) e hipogammaglobulinemia leve (6 g/L). La evaluación ecográfica identificó un bazo levemente agrandado (14,3 cm). El estudio de subpoblaciones de linfocitos reveló una reducción en la subpoblación de plasmablastos conmutados memoria CD19⁺CD27⁺IgM-IgD-B (5,21%, VN 6,5-29,1%). En la actualidad, el paciente mantiene cifras de plaquetas por debajo de $40 \times 10^9/L$ con una FPI de 30,3-35,6%. No ha presentado complicaciones hemorrágicas reseñables y hasta el momento no ha recibido tratamiento específico para su trombocitopenia.

Caso 11. Varón nacido en 2010 que fue diagnosticado de trombocitopenia hereditaria a la edad de 3 días (recuento de plaquetas: $53 \times 10^9/L$; FPI 16%). Posteriormente, le fue detectado un trastorno leve, no especificado, del desarrollo del habla y el lenguaje. A la edad de 10 años requirió ingreso hospitalario por broncoespasmo severo en el contexto de la infección por influenza A. En esta conjunción, mostró epistaxis, y se le administró un ciclo de 0,3 mg/kg de dexametasona. El recuento de plaquetas al ingreso fue de $16 \times 10^9/L$, que se elevó a $38 \times 10^9/L$ y a $66 \times 10^9/L$ después de 4 y 10 días de terapia con esteroides, respectivamente. Desde entonces, no ha requerido ningún tratamiento adicional para la trombocitopenia.

Caso 12. Mujer nacida en 1999 que fue diagnosticada de trombocitopenia hereditaria a la edad de 6 años. A los 17 años, presentó trombosis espontánea de la vena gastrocnemio de miembros inferiores y recibió anticoagulación con acenocumarol durante 10 meses. Los estudios de trombofilia (antitrombina, proteína C, proteína S, factor V Leiden, protrombina G20210A, anticoagulante lúpico) mostraron resultados negativos. Sus recuentos de plaquetas se han mantenido alrededor de $80 \times 10^9/L$ (FPI: 24-40%). En Junio de 2020, durante el octavo mes de gestación, las plaquetas se redujeron a $14 \times 10^9/L$, y comenzó tratamiento con 1 mg/kg/día de prednisona. Siete

días después del inicio de la terapia con corticosteroides, los recuentos de plaquetas aumentaron a $34 \times 10^9/L$; recibió una transfusión de plaquetas y se sometió al parto con un recuento de plaquetas de $93 \times 10^9/L$. El paciente no ha requerido otros fármacos para aumentar las plaquetas y actualmente solo está recibiendo medicación para la ansiedad y las anomalías del comportamiento.

Caso 13. Mujer nacida en 2009 también portadora de la variante heterocigota en Src p.E527K. Su historial médico no revela otras enfermedades relevantes. El recuento de plaquetas al diagnóstico y durante el seguimiento se ha reducido levemente ($100-140 \times 10^9/L$).

Adicionalmente, el **Caso 2**, nacido en 1955, fue diagnosticado de PTI y esplenectomizado con respuesta completa (recuento de plaquetas: $203 \times 10^9/L$). También fue diagnosticado de epilepsia generalizada idiopática, y falleció a la cuarta década de la vida por muerte súbita inesperada en epilepsia [SUDEP]. El **caso 10** es una niña no portadora de la variante Src p.E527K. Hasta la fecha no ha presentado trombocitopenia, ni alteraciones neurológicas o autoinmunes, ni ha sufrido eventos trombóticos.

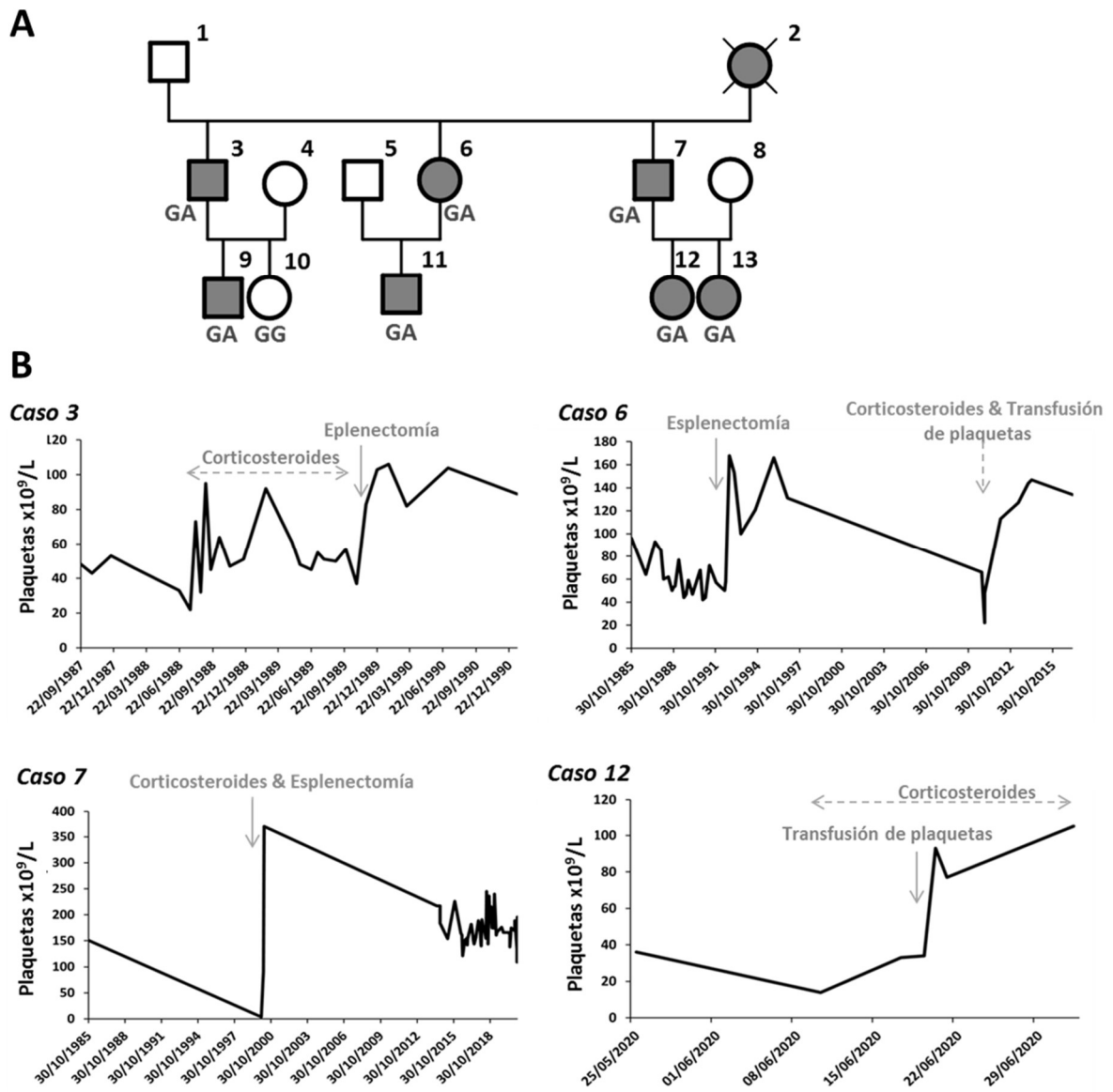


Figura 1. Pedigrí de la familia y respuesta plaquetaria a los distintos tratamientos administrados. **A)** Pedigrí de la familia y presencia de la enfermedad SRC-RT por la variante de ganancia de función Src p.E527K. La figura muestra en gris a los pacientes con macrotrombocitopenia y en blanco a aquellos sujetos con recuentos plaquetarios normales. El paciente fallecido se señala con una cruz. Los portadores de la variante heterocigota c.1579G>A en SRC se identifican con el genotipo GA y los no portadores con el genotipo GG. **B)** Respuesta plaquetaria a la esplenectomía y/o los corticosteroides. Las gráficas muestran el momento de la esplenectomía y de la terapia con corticosteroides, así como la evolución del recuento de plaquetas de los casos #3, #6, #7 y #12. En el caso #11 no se muestran la respuesta de plaquetas a los esteroides porque sufrió una infección viral podría influenciar esta respuesta plaquetaria.

Tabla 1. Características clínicas y biológicas de los portadores de la variante p.E527 en SRC

ID	Sexo	ISTH-BAT	Recuento de plaquetas al diagnóstico (x10 ⁹ /L)	Último recuento de plaquetas (x10 ⁹ /L) (%FPI)	Esplenomegalia/ Esplenectomía	Complicaciones neurológicas	Alteraciones inmunes	Procesos infecciosos relevantes	Trombosis
2 [†]	M	NC	NC	203 (Nr)	Si/ Si (<30a)	Epilepsia; SUDEP	NC	NC	NC
3	V	3	57	83 (Nr)	Si/ Si (13a)	No	Psoriasis en placa; angioedema uvular; deficiencia parcial de IgM	Tonsillitis recurrente >2 episodios/año	No
6	M	1	96	134 (27.2)	Si/ Si (14a)	No	No	Pitiriasis versicolor	No
7	V	4	98	177 (17.6)	Si/ Si (21a)	Convulsiones epilépticas severas	Psoriasis; asma bronquial severo; enfermedad de Crohn ileal; pleuropericarditis autoinmune; deficiencia parcial de IgM	En tracto respiratorio superior (>1/año); epididimoorquitis. Pitiriasis versicolor; Acné papulopostular	Trombosis portal y embolismo pulmonar; trombosis de la vena yugular
9	V	3	38	17 (36.9)	Si/No	Megacisterna magna (asintomática)	Asma bronquial intrínseco; deficiencia parcial de IgA	Bronquitis recurrente (>3/año). Pitiriasis versicolor	No
11	V	3	70	66 (16.1)	Nr/No	Alteración del habla y del lenguaje	Dermatitis atópica; hiperreactividad bronquial	Bronquitis recurrente, >2 episodios/año	No
12	M	4	71	105 (40.0)	Nr/No	Ansiedad y alteraciones del comportamiento	No	Otitis media; tracto respiratorio superior	Trombosis venosa profunda
13	M	0	139	114 (Nr)	Nr/No	No	No	Tracto respiratorio superior	No

Abreviaturas: ID, número en el pedigrí (Figura 1A); [†]Fallecido; M: mujer; V: varón; NC: no conocido; Nr: no registrado; FPI: fracción de plaquetas inmaduras; a: años; SUDEP: muerte súbita inesperada en epilepsia.

3. Materiales y métodos.

Los miembros de esta familia fueron reclutados en el proyecto multicéntrico español “Caracterización funcional y molecular de pacientes con Trastornos Plaquetarios Congénitos”. Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Reina Sofía (Murcia, España) y sigue la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. La información del paciente fallecido se obtuvo tras el consentimiento verbal de sus familiares. Se revisaron los registros clínicos y los síntomas hemorrágicos se cuantificaron utilizando a la herramienta de evaluación de hemorragias ISTH-BAT¹⁶.

Se extrajeron a los pacientes muestras de sangre en tubos con EDTA y citrato sódico para los diferentes estudios. El ADN de dos casos índice (#3 y #6) fue analizado mediante HTS de un panel de genes, usando una plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. EE. UU.)^{17,18}. Las secuencias crudas obtenidas se anotaron y las variantes genéticas candidatas se identificaron según hemos descrito previamente^{17,18}. Estas variantes se confirmaron en los probandos y en otros miembros de la familia, mediante amplificación de ADN por PCR con cebadores específicos y secuenciación de Sanger usando un Secuenciador automático ABI 3130.

Realizamos un estudio amplio del fenotipo plaquetario de en lo pacientes de esta familia. La FPI se midió utilizando Sysmex XE-2100 (Sysmex, Sant Just Desvern, España). La expresión de glicoproteínas de superficie plaquetaria [GP], la unión de fibrinógeno y la secreción de gránulos α y δ (CD62 y CD63, respectivamente), basal y tras estimulación con agonistas, fueron evaluados por citometría de flujo^{18,19}. Realizamos también estudios de agregación plaquetaria y un examen de las plaquetas por microscopía electrónica, siguiendo nuestros procedimientos estándar¹⁸⁻²¹. Utilizamos un procedimiento de tinción inmunofluorescente de frotis sanguíneos con anticuerpos específicos²², para valorar la expresión y localización intraplaquetaria de proteínas de gránulos α (trombospondina, VWF y selectina P), marcadores de gránulos δ (LAMP-1, LAM-2 y CD63), β 1-tubulina, así como Src y Src fosforilada. Los anticuerpos usados estaban disponibles comercialmente: anticuerpos anti-trombospondina (ab85762, Abcam, Cambridge, Reino Unido); anti-P-Selectina (555522, BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.); anti-vWF (A0082, Dako, Waldbronn, Alemania); anti-LAMP1 (sc18821, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania); anti-LAMP2 (sc18822, Santa Cruz); anti-CD63 (558019, BD Biosciences); anti- β 1-tubulina (T4026; Merck Life Science, Darmstadt, Alemania); anti c-Src (17AT28, sc130124, Santa Cruz); anti-Tyr-419-fosforilado-c-Src (sc-139601, Santa Cruz)].

En plaquetas en reposo (no estimuladas con agonistas), evaluamos la fosforilación en en residuos tirosina tanto del conjunto de proteínas plaquetarias, como de ciertas proteínas específicas, mediante inmunoblotting estándar¹⁸, utilizando los anticuerpos

PY20 anti-fosfotirosina (Merck Life Science, Madrid, España), anti-BTK, anti-fosfo-BTK (Tyr223), anti-fosfo-fosfolipasa $\text{C}\gamma 2$ [PLC $\gamma 2$] (Tyr1217) (Cell Signalling Technology; Frankfurt, Alemania), y anti-PLC $\gamma 2$ (Santa Cruz).

4. Resultados.

Recuentos y morfología plaquetaria, y evaluación del sangrado.

Los siete pacientes vivos de esta familia (**Figura 1A y Tabla 1**) presentaban trombocitopenia desde el nacimiento, con un recuento plaquetario en el momento del diagnóstico que variaba de 38 a 139 x 10⁹/L (rango normal 142-359 x 10⁹/L [n = 107]). Los pacientes presentan una FPI aumentada (**Tabla 1**), y VPM proporcionado por el contador hematológico normal o ligeramente aumentado. El análisis de los frotis de sangre periférica mostró anisocitosis plaquetaria con aproximadamente un 20% de plaquetas grandes y aproximadamente un tercio de plaquetas de apariencia grisácea. No se observaron anomalías en otros parámetros hematológicos, a excepción de la anemia por deficiencia de hierro leve en dos casos (#7 y #12). La mediana de la puntuación del sangrado obtenida con la herramienta ISTH-BAT de los pacientes fue de 3 (rango 1-4) (**Tabla 1**).

Estudio genético

El análisis de ADN de los probandos #3 y #6 mediante HTS de un panel de genes, identificó tres variantes candidatas en genes relacionados con trombocitopenia hereditaria: la variante heterocigota c.1579G> A [p.E527K] en el gen *SRC* (OMIM 616937, LRG_1018, NM_198291.2); la variante heterocigota c.754A> G [p.I252V] en el gen *ITGB3* (OMIM 273800, LRG_481, NM_000212.2); y la variante heterocigota c.236C> T (p.T79I) en el gen *GP9* (OMIM 231200; LRG_477, NM_000174.4). Se confirmó mediante secuenciación de Sanger la presencia de estas variantes en los dos probandos, pero se encontró que solo la variante en *SRC* segregaba con trombocitopenia en otros cinco miembros de la familia (#7, #9, #11, #12 y #13, **Figura 1A**). El caso no afectado #10 (**Figura 1A**) no es portador de esta variante.

Estudios de función plaquetaria

Como se ilustra en la **Figura 2A**, el análisis por microscopía electrónica de las plaquetas de los individuos portadores de la variante p.E527K en *Src*, mostró la presencia de plaquetas redondeadas, con un tamaño heterogéneo pero en promedio alto, con un contenido reducido de α -gránulos y con presencia de abundantes vacuolas. Se realizaron ensayos de agregometría en tres individuos portadores, que mostraron un defecto de agregación plaquetaria en respuesta a ácido araquidónico y CRP, y en menor medida a ADP y TRAP (**Figura 2B**). Los estudios de citometría de flujo mostraron en los portadores de la variante p.E527K, en comparación con sujetos control estudiados en paralelo y con nuestro rango de normalidad, una expresión normal de

las GP Ib/IX y Ia, un discreto aumento en los niveles de IIb/IIIa y una reducción en los niveles de GPVI (**Figura suplementaria S1**). La unión de fibrinógeno y la secreción de gránulos α - y δ inducida por agonistas estaba marcadamente alterada en plaquetas Src p.E527K (**Figura suplementaria S1**).

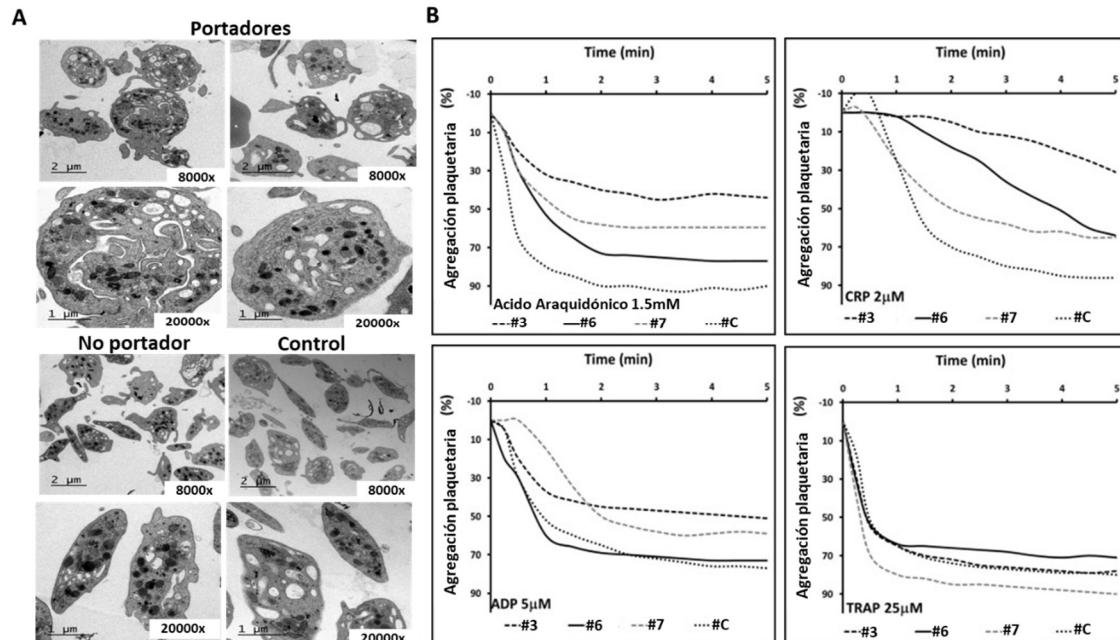


Figura 2. Análisis de plaquetas por microscopía electrónica y respuesta de agregación plaquetaria en portadores y no portadores de la variante p.E527K en Src. **A)** Microscopía electrónica de plaquetas de dos portadores de la variante p.E527K en SRC (casos #3, y #7), de un miembro de la familia no portador (caso #10), y de un control sano. La escala de ampliación para cada imagen se muestra (8000-20000x). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL. **B)** Perfil de agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas (pacientes #3, #6, #7 y un control sano) en respuesta a los agonistas que se indican. Abreviaturas: TRAP: péptido activador del receptor de trombina (PAR-1); CRP: péptido similar al colágeno; ADP: adenosín difosfato.

Los marcadores de gránulos de plaquetas, así como otras proteínas, también se evaluaron en frotis de sangre mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. En general, las plaquetas Src p.E527K mostraron un defecto moderado en los marcadores de gránulos α trombospondina, VWF y selectina-P (**Figura 3**). Por el contrario, los niveles de los marcadores de gránulos δ , LAMP-1, LAMP-2 y CD63 fueron similares a los de las plaquetas de controles (**Figura suplementaria S2**). Curiosamente, las plaquetas Src p.E527K, especialmente las de mayor tamaño, también mostraron alteración en la tinción de β 1-tubulina (**Figura suplementaria S2**). Dado que la variante Src p.E527K ya ha sido descrita previamente como una mutación que causa la activación constitutiva de Src¹³⁻¹⁵, evaluamos el nivel basal de Src y de fosfo-Src (en Tyr419) en las plaquetas de nuestros pacientes portadores. En la tinción de frotis de sangre con anticuerpos específicos contra estas proteínas no observamos diferencias apreciables en comparación con los controles, quizás por las limitaciones de sensibilidad en la técnica inmunofluorescente (**Figura 3**).

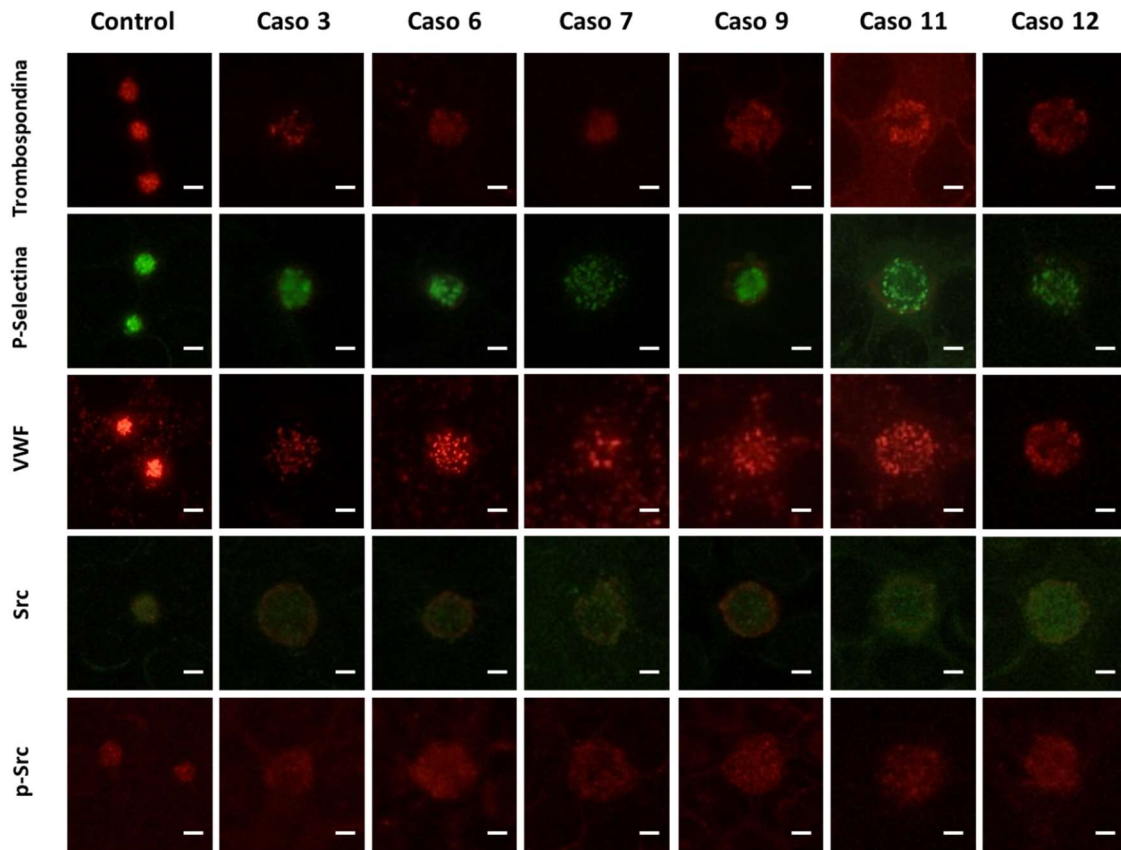


Figure 3. Ensayos de inmunofluorescencia en frotis de sangre. *Los paneles muestran marcadores de α -gránulos plaquetarios (trombospondina, P-selectina and VWF), quinasa Src y fosfo-SRC en Tyr-419, en 6 miembros de la familia portadores de la variante p.E527K en Src. Las barras de la escala se corresponden con 2 μ m.*

Dado que la fosfo-Src causa fosforilación de residuos tirosina en BTK, y la fosfo-BTK provoca la activación de la PLC γ 2, estudiamos en plaquetas en reposo si proteínas aguas debajo de las vías de señalización de Src estaban fosforiladas en tirosinas. Como se muestra en la **Figura 4A**, los portadores de Src p.E527K presentaron un incremento en proteínas fosforiladas en tirosinas respecto del control. En ausencia de estímulos externos, la fosforilación de Y223 de BTK estaba *upregulada* en las plaquetas portadoras de Src p.E527K, mientras que los niveles totales de esta proteína fueron similares a los de plaquetas control. Observamos resultados similares para fosfo-PLC γ 2 (Y1217), mientras que no se observaron diferencias en los niveles de PLC γ 2 total (**Figura 4B**).

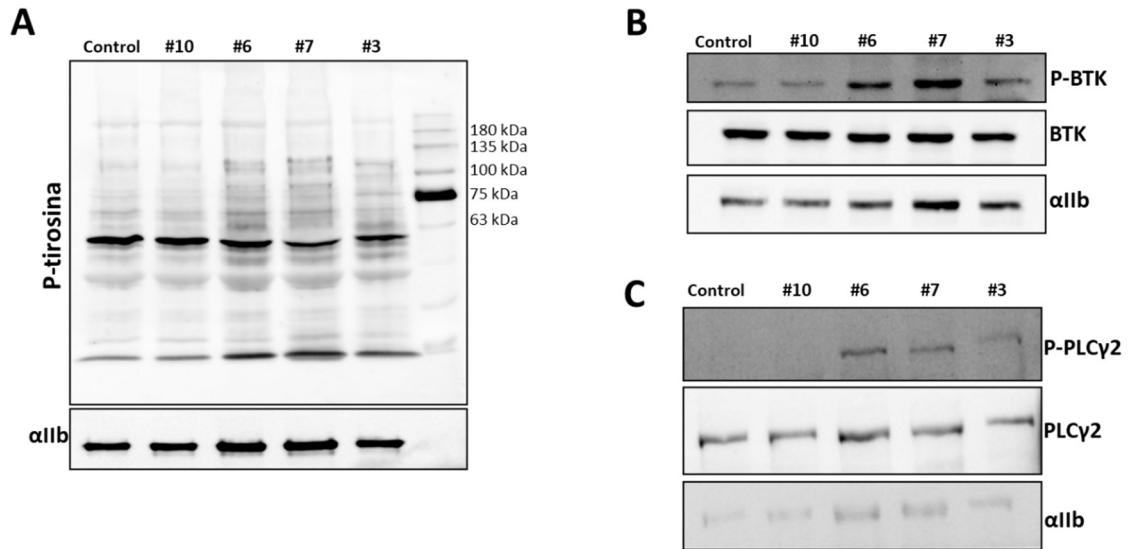


Figure 4. Inmunoblotting de proteínas plaquetarias fosforiladas en residuos de tirosinas. Evaluamos lisados de plaquetas, no estimuladas, de miembros de la familia portadores de la variante p.E527K (casos #3, #6, #7), un no portador (#10), y un control. **A)** Fosforilación en residuos tirosina del conjunto de proteínas totales. **B)** BTK total [BTK], BTK activa fosforilada en Tyr223 [P-BTK]. **C)** PLCy2 total [PLCy2], y un PLCy2 activa fosforilada en Tyr1217 [P- PLCy2]. Los niveles de α IIb se usaron como control de carga.

5. Discusión

La Src es una tirosin quinasa no receptora que participa en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y adhesión²³. Src, que normalmente está presente en un estado inactivo, se activa transitoriamente por la fosforilación de la Tyr419 en combinación con la desfosforilación de Src en Tyr530²³. La expresión de Src es ubicua, pero está presente en niveles altos en plaquetas, neuronas y osteoclastos^{24,25}. Los estudios previos evaluando el papel de Src en la biología plaquetaria han demostrado su implicación en la activación de varios sustratos, especialmente los componentes del citoesqueleto necesarios para el *spreading* plaquetario y para la agregación plaquetaria²⁶. Los datos del presente estudio confirman que la desregulación de la señalización Src se asocia con un defecto en el número de gránulos α y en la disfunción plaquetaria. Sin embargo, y a diferencia de estudios anteriores que mostraron que las plaquetas de sujetos con Src p.E527K presentann principalmente una alteración en la agregación inducida por colágeno¹³⁻¹⁵, nuestros pacientes mostraron una alteración de las respuestas de agregación a otros agonistas como ADP y ácido araquidónico. Los resultados de este pedigrí también sugieren que la hiperactivación de Src altera las rutas de señalización implicadas en la formación de gránulos α , y que puede tener un papel en la formación de la banda plaquetaria marginal causando una alterada reorganización del citoesqueleto.

Gracias al estudio de los tres pedigrís descritos con trombocitopenia asociada a la variante p.E527K, existe una evidencia sólida del papel de Src en la megacariopoyesis¹³⁻¹⁵. Inicialmente se describió que los ratones *knockout* para Src tenían recuentos de plaquetas normales²⁷. Sin embargo, estudios murinos más recientes, donde se elimina el extremo C-terminal de la quinasa Src sugieren defectos en la producción/aclaramiento de las plaquetas, ya que los ratones deficientes, al igual que nuestros pacientes, muestran macrotrombocitopenia y una mayor proporción de plaquetas inmaduras²⁸. Previamente, se ha descrito que los megacariocitos portadores de la variante Src p.E527K tienen interacciones aberrantes con los componentes de la matriz de la médula ósea. Esto sugirió la hipótesis de que una defectuosa regulación de Src podría estar detrás del defecto en la formación de proplaquetas, debido a una alterada interacción con las proteínas de la matriz¹⁵. Sin embargo, está claro que necesitamos más estudios para entender mejor el papel de Src en la megacariopoyesis.

Los datos del presente estudio cuestionan la hipótesis de que el defecto de producción de proquetas, sea la única y/o principal causa de la trombocitopenia en pacientes con la alteración p.E527K en Src. En primer lugar, demostramos unos niveles elevados de la FPI, típicamente > 15%. Se ha establecido que una FPI por encima del 7% es un buen biomarcador para diferenciar la PTI de otras causas de trombocitopenia²⁹. En segundo lugar, la esplenectomía de algunos familiares portadores produjo un aumento significativo en su recuento de plaquetas llegando, en algunos casos (pacientes #2 y #7), a una cifra normal de plaquetas circulantes. Aunque se puede argumentar que la esplenectomía puede mejorar (al menos temporalmente) el recuento de plaquetas en casi cualquier tipo de trombocitopenia, en nuestro pedigrí el tratamiento con corticosteroides, el estándar inicial para adultos con PTI, también aumentó el recuento de plaquetas (#3, #6, #7 y #12). De este modo, parece que existen paralelismos entre las patologías SRC-RT y la PTI; en ambas, tanto una producción alterada de plaquetas como un consumo plaquetario acelerado parecen contribuir a la trombocitopenia. Además, el aumento compensatorio de la producción de plaquetas que se produce en respuesta a un estrés específico, también parece estar alterado en estos pacientes. Situaciones como la gestación avanzada o la infección por el virus influenza A, se asociaron a una caída significativa en el recuento de plaquetas en los pacientes que presentaban una trombocitopenia moderada (casos #6, #12 y #11). En los tres casos, la terapia con corticosteroides, que sirven para inhibir la función de células B y Treguladores, y modular la función de FcR, aumentó el recuento de plaquetas. Así, evidenciamos que aún quedan interrogantes abiertos acerca de la producción de plaquetas y el mecanismo que subyace a la alterada formación de proplaquetas. De forma análoga, mientras que se ha sugerido que una Src hiperactivada podría alterar la formación de proplaquetas al afectar la interacción de megacariocitos con la matriz extracelular¹⁵, defectos intrínsecos en los megacariocitos y extrínsecos del medio

ambiente también se ha visto implicados en la megacariopoyesis alterada en la PTI^{30,31}.

Una diana aguas abajo de Src es la quinasa BTK, que a su vez influye en la activación de PLC γ 2. BTK es una proteína clave de las vías de señalización de los linfocitos y también está implicada en la activación plaquetaria inducida por colágeno. La deficiencia de BTK conduce a agammaglobulinemia ligada al cromosoma X [XLA], un desorden que afecta al sistema inmunológico y se asocia a infecciones y a manifestaciones inflamatorias crónicas que ocurre casi exclusivamente en varones³². A diferencia de la influencia de la deficiencia de BTK en el linaje de células B, los pacientes con XLA, a pesar de tener alteración en la movilización del calcio plaquetario, no presentan manifestaciones hemorrágicas³³. De manera similar, a pesar de la trombocitopenia, no se han descrito eventos hemorrágicos recurrentes en los pacientes de este pedigrí, y el *score* del ISTH-BAT estaba dentro de los rangos normales³⁴. A pesar de que una actividad elevada de SFK se ha asociado con una menor trombosis en modelos murinos³⁵, dos portadores de la variante p.E527K en nuestra familia sufrieron episodios trombóticos venosos. Es destacable que en la PTI, incluso en el contexto de la trombocitopenia, se han descrito tasas incrementadas de eventos trombóticos arteriales y venosos³⁶.

Nuestro estudio muestra que los pacientes con SRC-RT presentan un aumento en los niveles de varios sustratos fosforilados plaquetarios. Estos sustratos incluyen BTK y PLC γ 2. Hay evidencia creciente de que la actividad de BTK alterada, ya sea por elevación o disminución de la expresión, puede desempeñar un papel en la pérdida de tolerancia de las células B e inducir un fenotipo autoinmune³⁷. Nuestros pacientes con SRC-RT exhiben características que se ven comúnmente en pacientes con XLA. Los síntomas clínicos, que afectaron principalmente a los hombres, incluyen susceptibilidad a infecciones, fenómenos de autoinmunidad, junto con hipogammaglobulinemia y un compartimento de células B sesgado. En las mujeres, se ha demostrado previamente que el gen *BTK* no sufre una inactivación aleatoria, sino que tiene una inactivación preferencial del cromosoma X heredado materno o paterno en 75-80% de las células^{38,39}. Esto puede explicar el hecho de que las mujeres portadoras de la variante Src p.E527K expresen un fenotipo diferente; los casos #6 y #12 tuvieron trombocitopenia, mientras que el caso #13 exhibió plaquetas por encima de $100 \times 10^9/L$. En los hombres, nuevos estudios podrían demostrar el potencial de la inhibición de BTK no solo para abordar los fenómenos de autoinmunidad sistémica, sino también para el aumento del recuento de plaquetas. Rilzabrutinib un inhibidor, reversible y altamente selectivo, de BTK diseñado para enfermedades inmunes, podría ser una estrategia de tratamiento prometedora. Se ha demostrado una rápida actividad clínica en el pénfigo vulgar⁴⁰, y también en PTI⁴¹, donde actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase III (NCT04562766).

Adicionalmente, los datos obtenidos en estos pacientes especulamos que el Src hiperactivo puede participar en los trastornos neurológicos de algunos de estos pacientes (casos #2, #7, #11 y #12). Una de las principales funciones de Src es regular al alza la actividad de receptores de Nmetil-D-aspartato [NMDA], que median la rápida transmisión excitadora en la mayoría de las sinapsis^{42,43}. En modelos de epilepsia se ha descrito una exacerbación de los receptores NMDA⁴⁴. En consecuencia, Src podría ser fundamental para los procesos que subyacen a la plasticidad fisiológica, como el aprendizaje y la memoria, y la plasticidad patológica, como el dolor y la epilepsia⁴². Hasta la fecha, solo se ha informado previamente de un caso con esta variante que tenía un trastorno neurológico y del desarrollo¹⁴. Pero también se observaron anomalías del comportamiento y discapacidad intelectual en los portadores afectados del primer pedigrí descrito en la literatura¹³. Los inhibidores de este sistema detienen la hiperexcitabilidad mediada por inflamación^{45,46}. Saracatinib constituye un potente inhibidor de la familia Src de tirosina quinasas con el que se ha demostrado que previene la epileptogénesis y que reduce significativamente las convulsiones espontáneas y epileptiformes en un modelo murino^{47,48}.

En resumen, este estudio pone de manifiesto que en la relativamente nueva patología SRC-RT existen otras implicaciones clínicas relevantes, aparte de las alteraciones a nivel de plaquetas y megacariocitos. En cientos de casos con sospecha inicial de PTI familiar, podría ser razonable evaluar si se trata de SRC-RT. El diagnóstico diferencial precoz de SRC-RT es fundamental dado que puede dirigir/reconducir el enfoque terapéutico. Las manifestaciones clínicas y biológicas de este trastorno subrayan las diferencias sutiles y la superposición significativa de esta forma de trombocitopenia hereditaria y una enfermedad inmunomediada. También arrojan luz sobre la posibilidad de nuevas perspectivas de tratamiento para los pacientes con el uso de fármacos que inhiben tirosina quinasas específicas.

6. Referencias

1. De Kock L, Freson K. The (Patho)Biology of SRC Kinase in Platelets and Megakaryocytes. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(12):.
2. Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*. 2014;124(13):2013–2024.
3. Afar DE, Park H, Howell BW, et al. Regulation of Btk by Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16(7):3465–3471.
4. Park H, Wahl MI, Afar DE, et al. Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity*. 1996;4(5):515–525.
5. Corneth OBJ, de Bruijn MJW, Rip J, et al. Enhanced Expression of Bruton's Tyrosine Kinase in B Cells Drives Systemic Autoimmunity by Disrupting T Cell Homeostasis. *J. Immunol.* 2016;197(1):58–67.
6. Corneth OBJ, Verstappen GMP, Paulissen SMJ, et al. Enhanced Bruton's Tyrosine Kinase Activity in Peripheral Blood B Lymphocytes From Patients With Autoimmune Disease. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*. 2017;69(6):1313–1324.
7. Heukels P, van Hulst JAC, van Nimwegen M, et al. Enhanced Bruton's tyrosine kinase in

- B-cells and autoreactive IgA in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 2019;20(1):232.
8. Kil LP, de Bruijn MJW, van Nimwegen M, et al. Btk levels set the threshold for B-cell activation and negative selection of autoreactive B cells in mice. *Blood.* 2012;119(16):3744–3756.
 9. von Borstel A, Abdulahad WH, Sanders JS, et al. Evidence for enhanced Bruton's tyrosine kinase activity in transitional and naïve B cells of patients with granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatology (Oxford).* 2019;58(12):2230–2239.
 10. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell.* 1993;72(2):279–290.
 11. Vetrie D, Vorechovský I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1993;361(6409):226–233.
 12. Hernandez-Trujillo VP, Scalchunes C, Cunningham-Rundles C, et al. Autoimmunity and inflammation in X-linked agammaglobulinemia. *J. Clin. Immunol.* 2014;34(6):627–632.
 13. Turro E, Greene D, Wijgaerts A, et al. A dominant gain-of-function mutation in universal tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia, myelofibrosis, bleeding, and bone pathologies. *Sci. Transl. Med.* 2016;8(328):328ra30.
 14. De Kock L, Thys C, Downes K, et al. De novo variant in tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia: case report of a second family. *Platelets.* 2019;30(7):931–934.
 15. Barozzi S, Di Buduo CA, Marconi C, et al. Pathogenetic and clinical study of a patient with thrombocytopenia due to the p.E527K gain-of-function variant of SRC. *Haematologica.* 2021;106(3):918–922.
 16. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(9):2063–2065.
 17. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2018;103(1):148–162.
 18. Palma-Barqueros V, Crescente M, de la Morena ME, et al. A novel genetic variant in PTGS1 affects N-glycosylation of cyclooxygenase-1 causing a dominant-negative effect on platelet function and bleeding diathesis. *Am. J. Hematol.* 2021;96(3):E83–E88.
 19. Lozano ML, Cook A, Bastida JM, et al. Novel mutations in RASGRP2, which encodes CalDAG-GEFI, abrogate Rap1 activation, causing platelet dysfunction. *Blood.* 2016;128(9):1282–1289.
 20. Navarro-Núñez L, Teruel R, Antón AI, et al. Rare homozygous status of P43 β 1-tubulin polymorphism causes alterations in platelet ultrastructure. *Thromb. Haemost.* 2011;105(5):855–863.
 21. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:213.
 22. Zaninetti C, Greinacher A. Diagnosis of Inherited Platelet Disorders on a Blood Smear. *J. Clin. Med.* 2020;9(2):.
 23. Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene.* 2000;19(49):5620–5635.
 24. Roskoski RJ. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;324(4):1155–1164.
 25. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996;1287(2–3):121–149.
 26. Oberfell A, Eto K, Mocsai A, et al. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]I\text{Ib}[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.*

- 2002;157(2):265–275.
27. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*. 1991;64(4):693–702.
 28. Mori J, Nagy Z, Di Nunzio G, et al. Maintenance of murine platelet homeostasis by the kinase Csk and phosphatase CD148. *Blood*. 2018;131(10):1122–1144.
 29. Jeon MJ, Yu ES, Kang K-W, et al. Immature platelet fraction based diagnostic predictive scoring model for immune thrombocytopenia. *Korean J. Intern. Med.* 2020;35(4):970–978.
 30. Iraqi M, Perdomo J, Yan F, Choi PY-I, Chong BH. Immune thrombocytopenia: antiplatelet autoantibodies inhibit proplatelet formation by megakaryocytes and impair platelet production in vitro. *Haematologica*. 2015;100(5):623–632.
 31. Khodadi E, Asnafi AA, Shahrabi S, Shahjehani M, Saki N. Bone marrow niche in immune thrombocytopenia: a focus on megakaryopoiesis. *Ann. Hematol.* 2016;95(11):1765–1776.
 32. Paccoud O, Mahlaoui N, Moshous D, et al. Current Spectrum of Infections in Patients with X-Linked Agammaglobulinemia. *J. Clin. Immunol.* 2021;
 33. Oda A, Ikeda Y, Ochs HD, et al. Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking. *Blood*. 2000;95(5):1663–1670.
 34. Elbatarny M, Mollah S, Grabell J, et al. Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the merging project. *Haemophilia*. 2014;20(6):831–835.
 35. Zhu J. Csk/CD148 and platelet SFK activation: a balancing act! *Blood*. 2018;131(10):1042–1043.
 36. Swan D, Newland A, Rodegheiro F, Thachil J. Thrombosis in immune thrombocytopenia - current status and future perspectives. *Br. J. Haematol.* 2021;
 37. Rip J, Van Der Ploeg EK, Hendriks RW, Corneth OBJ. The Role of Bruton's Tyrosine Kinase in Immune Cell Signaling and Systemic Autoimmunity. *Crit. Rev. Immunol.* 2018;38(1):17–62.
 38. Li H, Zhao C, Tian Y, et al. Src family kinases and pulmonary fibrosis: A review. *Biomed. Pharmacother.* 2020;127:110183.
 39. Moschese V, Orlandi P, Plebani A, et al. X-chromosome inactivation and mutation pattern in the Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinemia. Italian XLA Collaborative Group. *Mol. Med.* 2000;6(2):104–113.
 40. Murrell DF, Patsatsi A, Stavropoulos P, et al. Proof of concept for the clinical effects of oral rilzabrutinib, the first Bruton tyrosine kinase inhibitor for pemphigus vulgaris: the phase II BELIEVE study. *Br. J. Dermatol.* 2021;
 41. Kuter DJ, Efraim M, Mayer J et al. Oral Rilzabrutinib, a Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor, Showed Clinically Active and Durable Platelet Responses and Was Well-Tolerated in Patients with Heavily Pretreated Immune Thrombocytopenia. *Blood*. 2020;136 (Suppl:13–14.
 42. Kalia L V, Gingrich JR, Salter MW. Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene*. 2004;23(48):8007–8016.
 43. Steinlein OK. Calcium signaling and epilepsy. *Cell Tissue Res.* 2014;357(2):385–393.
 44. Avoli M, Bernasconi A, Mattia D, Olivier A, Hwa GG. Epileptiform discharges in the human dysplastic neocortex: in vitro physiology and pharmacology. *Ann. Neurol.* 1999;46(6):816–826.
 45. Kumar A, Jaggi AS, Singh N. Pharmacology of Src family kinases and therapeutic implications of their modulators. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2015;29(2):115–130.
 46. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* 2011;7(1):31–40.

47. Liu J, Schenker M, Ghiasvand S, Berdichevsky Y. Kinase Inhibitors with Antiepileptic Properties Identified with a Novel in Vitro Screening Platform. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(10):.
48. Sharma S, Carlson S, Puttachary S, et al. Role of the Fyn-PKC δ signaling in SE-induced neuroinflammation and epileptogenesis in experimental models of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 2018;110:102–121.

Anexo Capítulo II: Trombocitopenia asociada a SRC: una delgada línea entre una disfunción de megacariocitos y una enfermedad inmune.

1. Materiales y Métodos

Extracción de muestras de sangre y ADN

Se extrajeron muestras de sangre venosa en tubos K3 EDTA al 7,5% (para los recuentos sanguíneos y purificación de ADN) o en tampón de citrato de sodio 0,105 M (para estudios funcionales). Los recuentos sanguíneos se realizaron con un contador hematológico Sysmex® XS1000i (Sysmex, Sant Just Desvern, España). La FPI se midió con un contador Sysmex XE-2100. El ADN se aisló usando el kit *DNeasy blood and tissue* (Qiagen, Alemania) y se cuantificó usando un fluorómetro Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific, CA, EE. UU.).

Análisis molecular mediante HTS y secuenciación de Sanger

El ADN de dos hermanos (casos #3 y #6) se analizaron mediante HTS de un panel de genes utilizando una plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.)¹. Las secuencias se anotaron como ya hemos descrito anteriormente¹, usando la versión del genoma hg19/GRCh37. La patogenicidad de las variantes genéticas identificadas se evaluó de acuerdo con los estándares del ACMG². La variante SRC c.1579G> A (p.E527K) identificada por el panel de genes HTS fue confirmado y segregado en otro miembro de la familia mediante secuenciación Sanger en un secuenciador automático ABI 3130. Los cebadores específicos se diseñaron utilizando Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>).

Agregación plaquetaria

La LTA se realizó en muestras de PRP usando un agregómetro Aggrecorder II (Menarini Diagnostics, Florencia, Italia), tal y como se describe en el capítulo I. Los agonistas plaquetarios empleados fueron: ácido araquidónico 1,5 mM (AA; Diagnostica Stago, Barcelona, España), ADP 5 μ M (Merck Life Science SLU [Sigma-Aldrich], Madrid, España), péptido agonista del receptor activado por proteasa 25 μ M (TRAP o PAR1) (Merck Life Science SLU), 2 Mm Péptido relacionado con el colágeno (CRP) (CambCol Laboratories, Cambridge, Reino Unido) y ristocetina 1,25 mg/ml (Merck Life Science S.L.U).

Ensayos de citometría de flujo

La expresión de glicoproteínas de superficie plaquetaria, la secreción de gránulos y la activación de α IIb β 3 en presencia de agonistas, se evaluó, como se describe en el

capítulo I, mediante citometría de flujo en un equipo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

Análisis de inmunofluorescencia en frotis de sangre

Mediante técnicas de inmunofluorescencia en frotis de sangre, descritas recientemente^{3,4}, se evaluó la expresión de proteínas de gránulos α (trombospondina, VWF y selectina-P), de marcadores de gránulos δ (LAMP-1, LAM-2 y CD63), de tubulina β 1, Src y Src fosforilada. Brevemente, se preparan los frotis de sangre añadiendo 3-4 μ L de sangre en un portaobjetos de microscopía (Menzel-Gläser, Linea LAB, Badalona, España). Estos frotis se enviaron por correo regular al laboratorio del profesor A. Greinacher para una tinción centralizada. Los portaobjetos se fijaron y se permeabilizaron con acetona congelada (-20°C; 2-5 min) y se tiñeron con anticuerpos primarios específicos: anti-trombospondina (ab85762, Abcam, Cambridge, Reino Unido); anti-P-Selectina (555522, BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.); anti-vWF (A0082, Dako, Waldbronn, Alemania); anti-LAMP1 (sc18821, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania); anti-LAMP2 (sc18822, Santa Cruz); anti-CD63 (558019, BD Biosciences); anti- β 1-tubulina (T4026; Merck Life Science, Darmstadt, Alemania); anti c-Src (17AT28, sc130124, Santa Cruz); anti-Tyr-419-fosforilado-c-Src (sc-139601, Santa Cruz)]. Después de lavar los frotis de sangre se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado: ALEXAFluor*568 (de cabra anti-conejo) (A11011, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) o ALEXAFluor*488 (de cabra anti-ratón) (A11001, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania).

Inmunoblotting

Plaquetas lavadas ($0,5-1 \times 10^9$ / ml) en tampón HEPES de Tyrode modificado (134 mmol/L de NaCl, 2,9 mmol/L de KCl, 0,34 mmol/L de Na₂HPO₄, 12 mmol/L de NaHCO₃ y 1 mmol/L de MgCl₂ y HEPES 20 mmol/L, pH 7,4; todos Sigma, Reino Unido), a pH 7,4, se lisaron mediante un tampón reductor con dodecilsulfato de sodio [SDS]. Las proteínas en los lisados se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 8% durante 60 minutos y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Merck KGaA, Alemania). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios seguidos por el anticuerpo secundario IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante (Merck Life Science). Se utilizó una reacción de quimioluminiscencia (BioRad GE Healthcare, Reino Unido) para detectar las proteínas utilizando una película de rayos X de color azul claro.

Microscopía electrónica

Se usó microscopía electrónica para examinar la morfología y ultraestructura de las plaquetas como se describe⁵. Brevemente, se fijó PRP en glutaraldehído al 1,25% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvania) (45 min RT). Después, las

muestras se lavaron y se fijaron en tetróxido de osmio al 1% (Sigma-Aldrich) (2 horas a 4°C), y se trataron con acetato de uranilo (2 horas a 4°C). Posteriormente, las muestras se deshidrataron con etanol graduado y soluciones de propileno y se incrustaron en Epon (Taab Laboratories, Reading, Reino Unido). Las muestras incrustadas se seccionaron con un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert, Viena, Austria) y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Merck, Darmstadt, Alemania). Las secciones de plaquetas se observaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL.

2. Figuras suplementarias

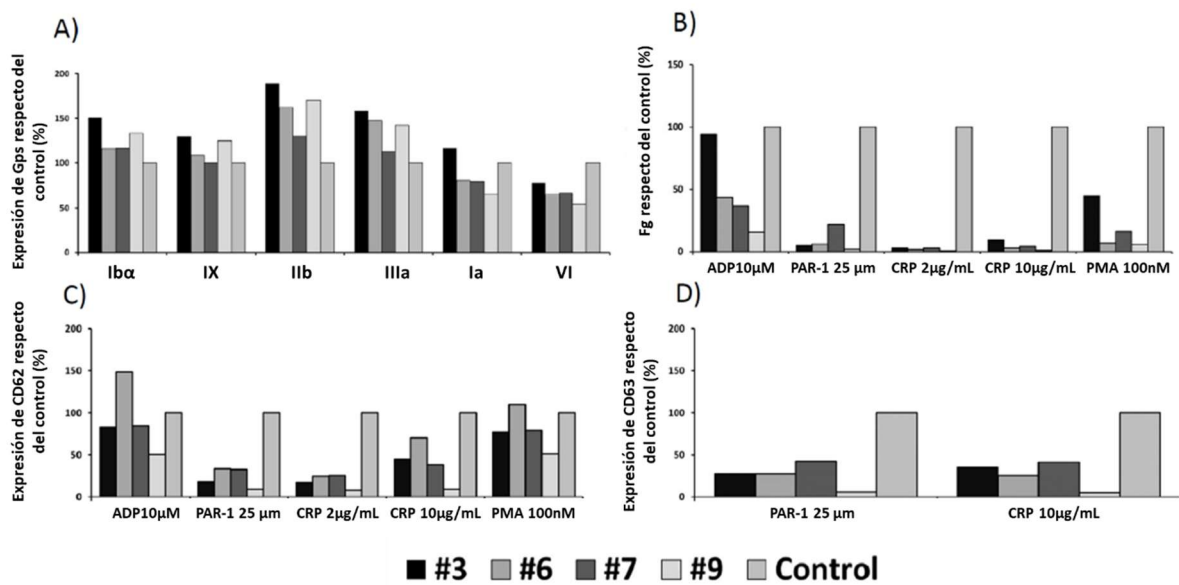


Figura S1. Análisis de expresión de glicoproteínas, unión de fibrinógeno y secreción de gránulos por citometría de flujo. A) Expresión de GPs plaquetarias en portadores de la variante p.E527K en SRC (casos #3, #6, #7, #9), y un control. B) Unión de Fibrinógeno*Alexa488, C) secreción de gránulos α , y D) secreción de gránulos delta bajo estimulación con agonistas plaquetarios. Las gráficas muestran la Mediana de Intensidad de Fluorescencia respecto del control (100%). Abreviaturas: Fg, fibrinógeno.

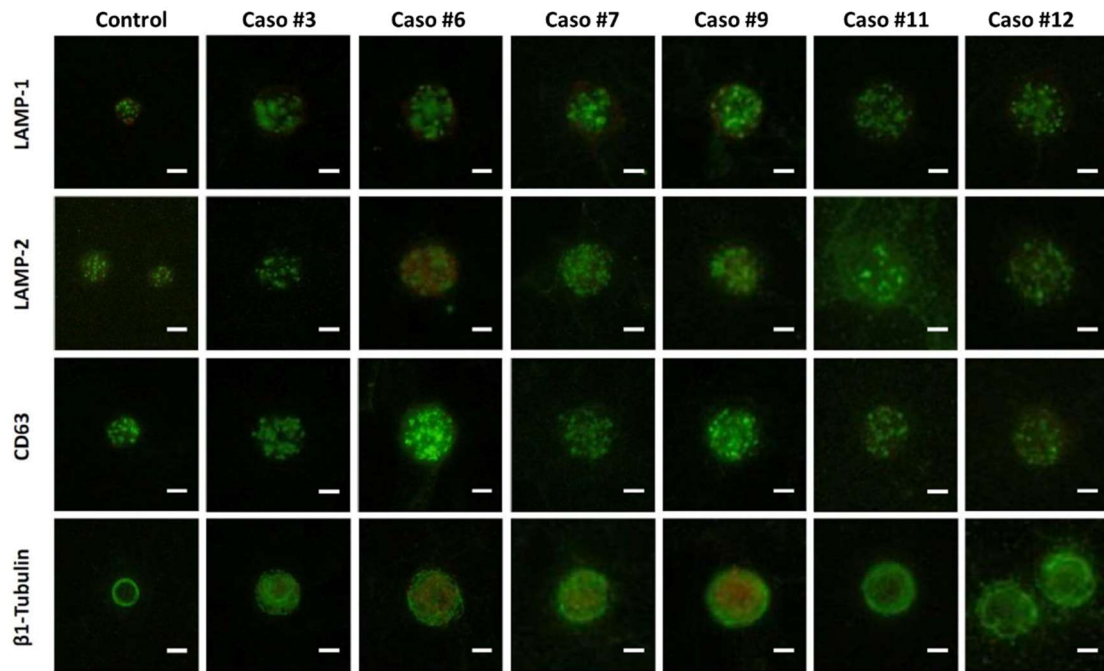


Figure S2. Inmunofluorescencia de marcadores de gránulos densos y de la tubulina $\beta 1$. Fotis de controles y de portadores de la variante *p.E527K* en *Src* (casos #3, #6, #7, #9, #11, #12) teñidos con anticuerpos específicos anti marcadores de gránulos δ (LAMP-1, LAM-2 y CD63) y la proteína tubulina- $\beta 1$.

3. Referencias

1. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica*. 2018;103(1):148–162.
2. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med*. 2015;17(5):405–424.
3. Greinacher A, Pecci A, Kunishima S, et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2017;
4. Zaninetti C, Greinacher A. Diagnosis of Inherited Platelet Disorders on a Blood Smear. *J. Clin. Med*. 2020;9(2):.
5. Navarro-Núñez L, Teruel R, Antón AI, et al. Rare homozygous status of P43 $\beta 1$ -tubulin polymorphism causes alterations in platelet ultrastructure. *Thromb. Haemost.* 2011;105(5):855–863.

Capítulo III

**Ampliación del espectro genético de la trombocitopenia
asociada al gen TUBB1.**

Capítulo III: Ampliación del espectro genético de la trombocitopenia asociada al gen *TUBB1*.

1. Introducción.

El uso de técnicas de HTS¹ ha ampliado el espectro genético de las Trombocitopenias Congénitas [TC], identificando cerca de 40 genes que contienen variantes moleculares que causan TC²⁻⁷. Generalmente, la TC se presenta con trombocitopenia moderada y diátesis hemorrágica leve o nula. Sin embargo, también existen pacientes con trombocitopenia grave que pueden sufrir hemorragias clínicamente relevantes^{4,8,9}. Algunas TC se asocian con un mayor riesgo de desarrollar trastornos graves, entre los que destacan las neoplasias hematológicas^{2-5,8}. Variantes en genes que codifican componentes del citoesqueleto de actomiosina o del sistema microtubular representan las formas más frecuentes de TC, que incluyen los trastornos relacionados con la cadena pesada de miosina no muscular IIA [MYH9-RD], la trombocitopenia relacionada con la actinina 1 [ACTN1-RT] y la trombocitopenia relacionada con la tubulina β 1 [TUBB1-RT]^{5,10}. Los microtúbulos están formados por el ensamblaje de heterodímeros de α y β -tubulina. La tubulina β 1, codificada por el gen *TUBB1*, es la isoforma de β -tubulina predominante en los microtúbulos de MKs y plaquetas, que se encarga en los Mks de regular la extensión de las proplaquetas, y en las plaquetas forman la banda marginal que mantiene su forma discoide¹¹⁻¹³. Los ratones *knockout* para la β 1-tubulina muestran macrotrombocitopenia y una alteración de la formación de proplaquetas¹⁴.

Nosotros y otros grupos hemos descrito variantes comunes en la β 1-tubulina (p.Gln43Pro^{15,16}, p.Thr274Met¹⁷ y p.Arg307His¹⁸). En particular, el cambio p.Gln43Pro es una variante frecuente en pacientes con macrotrombocitopenia que se ha asociado con protección frente a enfermedades cardiovasculares¹⁵ y con un mayor riesgo de hemorragia intracerebral¹⁹. Las variantes p.Arg307His y p.Thr274Met se han relacionado con unos recuentos plaquetarios más bajos en el Síndrome de Bernard Soulier¹⁸ y en la trombocitopenia inmune²⁰ y con una trombocitopenia menos severa bajo tratamiento con paclitaxel¹⁷. Estos datos sugieren que variantes comunes de la β 1-tubulina pueden modular también los rasgos plaquetarios cuando se combinan con otros defectos genéticos o factores adquiridos.

Adicionalmente, se ha identificado un reducido número de variantes raras (MAF <1%) asociadas con trombocitopenia, con la aplicación de las técnicas de HTS en grandes series de pacientes con TPC. Para la mayoría de estas variantes no se ha demostrado experimentalmente su patogenicidad²¹⁻²⁶.

En este trabajo, caracterizamos la serie más amplia de casos de TUBB1-RT reportada hasta ahora, que abarca 38 individuos de 9 familias españolas no emparentadas

portadoras de 6 variantes diferentes en *TUBB1*. Para evaluar adecuadamente los efectos patogénicos de estas variantes, realizamos estudios de segregación familiar, estudios funcionales en plaquetas de pacientes, y estudios mecanísticos en modelos celulares.

2. Materiales y métodos

Pacientes, muestras de sangre y obtención de ADN

Los pacientes con sospecha de TC y sus familiares fueron reclutados en el proyecto multicéntrico español, liderado por nuestro grupo, de “*Caracterización funcional y molecular de pacientes con trastornos plaquetarios hereditarios*”. El proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Reina Sofía (Murcia, España) y sigue las normas de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes en el estudio proporcionaron su consentimiento informado por escrito. Se revisaron sus datos clínicos y cuantificamos sus síntomas hemorrágicos utilizando la herramienta de evaluación de hemorragias de ISTH-BAT^{27,28}. Se extrajeron muestras de sangre venosa en EDTA y citrato de sodio (0.105M tamponado) para los diferentes estudios (recuentos sanguíneos, fracción de plaquetas inmaduras (%FPI), frotis de sangre e inmunofluorescencia, estudios funcionales, microscopía electrónica, aislamiento de células CD34⁺ y cultivos MKs, y aislamiento de ADN y ARN).

Análisis molecular con un panel de genes de HTS

El ADN de los casos índice se analizó mediante un panel de genes de HTS extendido^{24,29}, diseñado con sondas dirigidas a todos los exones, extremos 3'UTR y regiones flanqueantes de 89 genes relacionados, o probablemente relacionados, con TPC (**Tabla Suplementaria S1**). El proceso HTS se llevó a cabo utilizando una plataforma MiSeq Illumina (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.)^{24,29}, o una plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los datos de la secuencia se mapearon en el genoma humano de referencia (hg 19). La selección y anotación de variantes se realizó utilizando una *pipeline* propia, basada en las herramientas bioinformáticas VarScan v2.3.9, SAMTools v1.3.1, ANNOVAR, Ensembl-VEP v99 y dbNFSP v4.0a. Las variantes seleccionadas y su segregación en las familias se confirmaron mediante secuenciación de Sanger con primers específicamente diseñados al efecto. La información sobre las variantes génicas (posición en el cromosoma, nombre de HGVS, ID de Rs, frecuencia en diferentes poblaciones, predicción de patogenicidad y conservación, clasificación automatizada, anotación en ClinVar, etc.) se obtuvo inicialmente utilizando la herramienta Varsome (<https://varsome.com>)³⁰ (consultada en mayo de 2021). Seguimos las directrices del ACMG³¹ para evaluar la patogenicidad de las variantes en *TUBB1* antes y después de tener en cuenta los resultados del presente estudio. Debe tenerse en cuenta que, hasta la fecha, solo se han descrito reglas específicas de ACGM para la Trombastenia

de Glanzmann³² y la enfermedad relacionada con *RUNX1*^{33,34}, pero no para otros TPC. En consecuencia, adaptamos los criterios ACGM a la clasificación de variantes en *TUBB1* de nuestros pacientes como se especifica en la leyenda de la **Tabla Suplementaria S3**.

Estudios del fenotipo plaquetario

La expresión de GPs de superficie plaquetaria, la unión de fibrinógeno inducida por agonistas y la secreción de gránulos α y δ (CD62 y CD63, respectivamente) se evaluaron mediante citometría de flujo^{29,35}. La agregometría de transmisión de luz se realizó como hemos descrito previamente³⁶. La adhesión y agregación plaquetaria se valoró usando el analizador de cono y placa Impact-R (analizador de plaquetas Impact-R 47600, Matis Medical Inc.)³⁷. La morfología de las plaquetas se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión¹⁶. Mediante inmunofluorescencia, estudiamos las proteínas del citoesqueleto, incluidas las tubulinas, en plaquetas lavadas en condiciones de reposo y en *spreading*³⁸. También usamos inmunofluorescencia para evaluar en frotis de sangre periférica, la presencia de preplaquetas y de proplaquetas de tipo *barbell*^{39,40}. Se evaluó la expresión de la tubulina β 1 en lisados plaquetarios mediante inmunoblotting³⁸. En ARN plaquetario extraído de sangre con Trizol (ThermoFisher Scientific), medimos los niveles de ARNm de tubulina utilizando ensayos Taqman (ThermoFisher)³⁸.

Cultivos de megacariocitos y formación de proplaquetas

El aislamiento inmunomagnético de células CD34⁺ de muestras de sangre periférica, la diferenciación *in vitro* de MK, los estudios de inmunofluorescencia y formación de proplaquetas se realizaron como se ha descrito anteriormente^{41,42}.

Modelos celulares CHO

Se evaluó el efecto de las variantes *missense* en tubulina β 1 en modelos de células CHO. Para las variantes p.Arg359Trp, p.Thr107Pro y p.Pher260Ser, éste último un mutante previamente descrito como patogénico, usamos construcciones que incluyen un tag de N-myc fusionada con el cDNA de *TUBB1*^{22,23}. Para las variantes p.Gly269Asp y Gly109Glu se utilizaron construcciones de cDNA de *TUBB1* fusionadas con un tag de DYK (GenScript, Leiden, Países Bajos). Las células se transfectaron transitoriamente con los vectores usando el sistema Turbofect (ThermoFisher).

Se describen más detalles metodológicos en Métodos suplementarios.

3. Resultados

Pacientes

Estudiamos un total de 38 pacientes de 9 familiares españolas no emparentadas con sospecha de padecer un TPC (**Figura 1A**). Los probandos presentaban macrotrombocitopenia desde el nacimiento. En la mayoría de ellos no se encontró con una tendencia hemorrágica relevante (puntuación media ISTH-BAT±Desviación standard [SD]:1,10±2,07; mediana 0, rango 0-8) (**Tabla 1**). La trombocitopenia, definida como un recuento de plaquetas por debajo del rango de voluntarios sanos normales (n=107; 142-359 x10⁹/L), fue en general moderada (mediana 76, rango 57-134 x10⁹/L) y se asoció con un aumento del tamaño de las plaquetas (MPV: 13,3-15.0 fL; normal: 9.0-12.8 fL) (**Tabla 1**). En varios casos, el VPM no pudo medirse debido a la distribución anormal del tamaño de las plaquetas (**Figura suplementaria S1**). Curiosamente, encontramos que el porcentaje de FPI, medido en algunos miembros de los pedigrís F, H e I, era anormalmente alto en los pacientes con trombopenia (**Tabla 1**), especialmente en aquellos que eran portadores de variantes *missense* en la tubulina β1. El resto de los parámetros sanguíneos eran normales (**Tabla 1**). En el pedigrí I, los padres (I.1 y I.2) de los probandos (II.1 y II.2) eran primos segundos. En esta familia, varios sujetos a lo largo de tres generaciones mostraron un aumento del VPM, pero solo los dos probandos eran trombocitopénicos (≈60x10⁹/L en el contador automático). A pesar de su trombocitopenia, estos probandos no tenían un historial de sangrado excesivo, incluso a pesar de procesos de riesgo como parto y un aborto espontáneo (II.1). El recuento de plaquetas al microscopio⁴³ fue ≈100x10⁹/L en ambos hermanos, identificándose más del 20% de plaquetas grandes (diámetro plaquetario medio, [DPM]>5μm) y ocasionalmente plaquetas gigantes (DPM> 6 μm) (**Figura 1B**). En los frotis de sangre de los familiares no trombocitopénicos, como el caso II.3 (**Figura 1A**), se observaron pocas plaquetas grandes (5%) (DPM> 5 μm) (**Figura 1B**) (**Tabla 1**).

Identificación de variantes raras en la tubulina β1 mediante HTS

En el análisis de ADN con el panel de genes de HTS, se identificaron 6 variantes candidatas en *TUBB1* (NM_030773.4). La secuenciación de Sanger confirmó estas variantes en los probandos y en varios familiares (**Figura 1A**). En los pedigrís A y B, se encontró el *frameshift* c.35del [p.Cys12Leufs12*]²⁴, y en las familias C y D la variante *missense* c.319A>C [p.Thr107Pro]²⁴. En la familia E se identificó la variante *nonsense* c.1267C>T [p.Gln423*]²⁴, y la variante *missense* c.1075C>T [p.Arg359Trp]²⁴ en los pedigrís F y G. La familia H es portadora de la nueva variante *missense* c.806G>A [p.Gly269Asp].

Todas estas variantes se encontraron en heterocigosidad en los portadores. Son variantes que afectan a residuos conservados en diferentes dominios de la proteína tubulina β1 (**Figura 1C**). Cabe destacar que el efecto de estas variantes varió entre los

miembros de la familia: Así, en las familias A, E, F, G y H algunos portadores presentaban macrotrombocitopenia, otros mostraban solo aumento del VPM o solo trombocitopenia, y en algunos encontramos un recuento y tamaño plaquetario normales (**Figura 1A**) (**Tabla 1**). La trombocitopenia en el caso II.2 del pedigrí F (fallecido de infarto de miocardio súbito durante el estudio), que no era portador de ninguna la variante de *TUBB1* de sus familiares, se atribuyó a la ingesta habitual de alcohol y, por lo tanto, se interpretó como adquirida.

Un hallazgo interesante fue la identificación en el pedigrí I de la variante c.326G>A [p.Gly109Glu] en el exón 4 de *TUBB1*, que da lugar al cambio de aminoácido p.Gly109Glu que afecta a un residuo altamente conservado en el dominio N-terminal de la tubulina $\beta 1$ (**Figura 1C, D**). La característica singular de esta variante es que mientras que los probandos homocigotos II.1 y II.2 mostraron macrotrombocitopenia, todos los familiares heterocigotos, excepto uno, solo presentaban un VPM aumentado. Las variantes p.Thr107Pro, p.Gly109Glu y p.Gly269Asp están clasificadas como patogénicas por la mayoría de algoritmos de predicción de patogenicidad, y se estimó una conservación del 100%, del residuo mutado durante la evolución a excepción de la variante p.Arg359Trp (**Tabla Suplementaria S2**). El modelado *in silico* de la estructura de la proteína predijo que todas las variantes alterarían el plegamiento normal de la proteína. En las variantes p.Gly109Glu y p.Gly269Asp se reemplaza un residuo con carga neutra por uno con carga negativa; además la glicina es el aminoácido más flexible por lo que su sustitución puede conducir a la pérdida de un ángulo de torsión con un impacto potencialmente severo en la estructura proteica. Por su parte, las variantes p.Thr107Pro y p.Arg359Trp, introducen un residuo más hidrófobo, lo que puede causar la pérdida de enlaces de hidrógeno y/o alterar el plegamiento correcto de proteínas (**Figura Suplementaria S2**). Según la evidencia disponible (datos poblacionales, computacionales, funcionales y de segregación), y en base a los criterios ACMG (adaptados para el gen *TUBB1*) todas las variantes fueron clasificadas inicialmente como de significado incierto o VUS, excepto la variante c.1267C>T [p.Gln423*], calificada como probablemente patogénica (**Tabla Suplementaria S3**). Esta clasificación inicial se modificó posteriormente en base a los resultados de nuestro estudio. Tan solo las variantes c.1075C>T [p.Arg359Trp] y c.326G>A [p.Gly109Glu] permanecieron como VUS (**Tabla Suplementaria S3**).

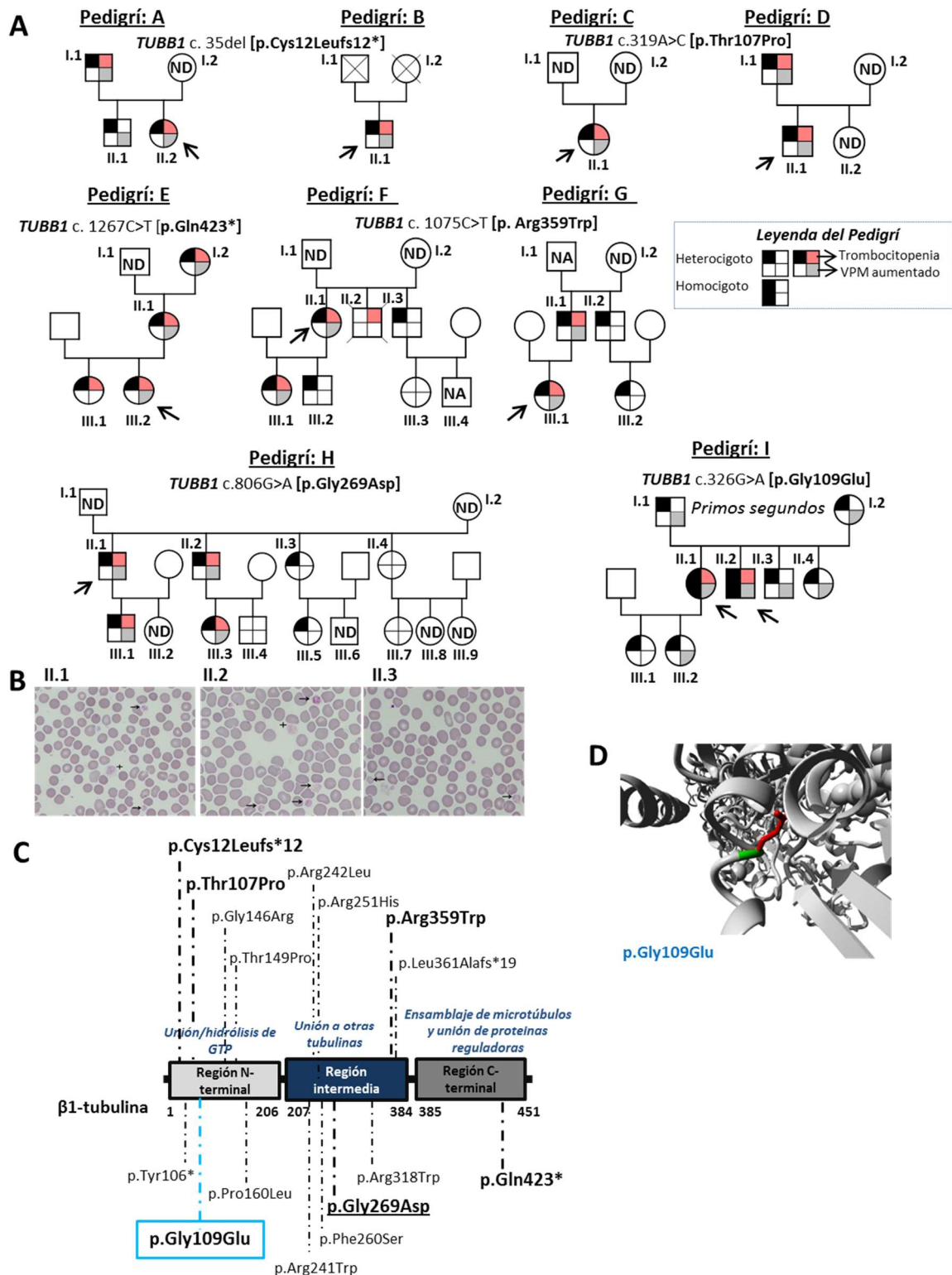


Figura 1. Pedigrís y localización de las variantes en tubulina β1. A) Pedigrís de las familias afectadas con trombocitopenia congénita. Los casos índices se indican con flechas negras. Como se indica en la leyenda, el símbolo sombreado en el cuarto superior derecho indica individuos con trombocitopenia, el símbolo sombreado en el cuarto inferior derecho denota un aumento del VPM, y el símbolo sombreado en el cuarto superior e inferior izquierdo indica individuos heterocigotos u homocigotos para la variante en *TUBB1*. ND =no disponible para el estudio; los símbolos sin etiquetar corresponden a parientes no consanguíneos no incluidos en el estudio. **B)** Frotis de sangre periférica

representativos del pedigrí I después de la tinción de May-Grünwald Giemsa (x100). Se observó un tamaño plaquetario variable con plaquetas grandes (flechas) y gigantes (cruces). **C)** Representación esquemática de la proteína tubulina $\beta 1$ con todas las variantes reportadas. Las variantes informadas en el presente estudio están resaltadas en negrita; la variante subrayada es nueva y la que está dentro del rectángulo azul es la única que se encontró en homocigosidad. **D)** Análisis estructural de la variante missense p.Gly109Glu utilizando un modelo 3D de $\beta 1$ -tubulina (software <https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>). La proteína está coloreada en gris, las cadenas laterales de los residuos nativo o wild type y mutante se muestran en verde y rojo, respectivamente. Abreviaturas: VPM, volumen plaquetario medio.

Tabla 1. Parámetros sanguíneos y datos clínicos de los miembros de las familias estudiadas.

Pedigrí		Edad	WBC × 10 ⁹ /L	RBC × 10 ¹² /L	Hb, g/dL	Hct (%)	Plaquetas × 10 ⁹ /L	VPM fL	ISTH-BAT	FPI (%)
A	I.1	75	6.57	4.97	14.3	85.5	84	nr	0	nd
	II.1	49	5.92	5.79	16.2	46.9	153	13.3	0	nd
	II.2	43	6.08	4.56	13.7	39.5	124	nr	0	nd
										nd
B	II.1	74	7.4	3.82	11.1	34.3	65	13.4	2	nd
										nd
C	II.1	21	5.19	4.64	14.2	41.1	70	14	2	nd
										nd
D	I.1	54	5.9	4.78	14.1	43	110	14.5	1	nd
	II.1	14	3.05	3.78	11.6	35.5	85	15	2	nd
E	I.2	85	6	4.93	14.6	43.2	115	15	2	nd
	II.1	51	9.13	4.24	13	38.3	116	14.5	5	nd
	III.1	21	7.6	4.94	14.2	42.2	131	12.4	3	nd
	III.2	22	8.97	4.65	12.9	38.9	123	14.1	5	nd
F	II.1	65	5.45	4.74	13.5	41.2	134	nr	8	22.70
	II.2	65	10.15	4.87	15.7	47.5	100	12.4	0	nd
	II.3	62	7.42	4.65	14.2	42.3	175	12.3	0	nd
	III.1	31	7.19	4.68	13	39.2	118	nr	4	23.40
	III.2	27	5.15	5.27	14.3	44.8	233	11.3	0	4.30
	III.3	21	10.42	4.12	12.4	37.4	214	12.2	0	8.60
G	II.1	59	2.14	4.82	14.2	44.1	82	13.3	0	nd
	II.2	60	5.34	5.49	16	49.3	153	12.7	0	nd
	III.1	36	5.74	4.89	15	46.9	69	nr	7	nd
	III.2	4	5.4	5.21	16.3	51.8	261	10.7	0	nd
H	II.1	65	5.75	4.67	14.9	42.6	82	nr	0	24.00
	II.2	58	6.02	5.39	16.6	47.2	133	13.8	0	14.00
	II.3	63	6.58	4.58	15.3	42.7	252	11.2	0	6.40
	II.4	61	5.74	4.47	15.2	42.5	202	10.8	0	4.10
	III.1	39	4.6	4.57	15.8	42.8	106	13.8	0	nd
	III.3	24	6.28	4.72	14.5	41.6	104	nr	1	nd
	III.4	27	5.78	5.34	16.5	46.6	202	11.8	0	nd
	III.5	34	5.97	5.18	16.3	43.8	229	11.3	0	nd
III.7	22	6.33	4.89	15.2	43.2	264	10.2	0	nd	
I	I.1	89	8.4	5.2	14.3	45	143	13.7	0	nd
	I.2	83	8	5.1	13.6	43.1	166	nr	0	nd
	II.1	55	5.8	5.1	14.3	45	58	nr	0	37.30
	II.2	51	10.6	7.1	16.9	53.3	57	nr	0	30.00
	II.3	53	7.2	6.3	13.8	43.1	179	13.4	0	13.20
	II.4	49	7.4	5.6	11.1	36	230	nr	0	10.30
	III.1	19	4.7	4	11.6	35.8	205	12.4	0	nd
	III.2	22	5.2	4.4	12.5	37.5	168	13.7	0	nd

nr: no registrado; **nd:** No determinado; **WBC:** glóbulos blancos, del inglés *white blood cells*; **RBC:** eritrocitos, del inglés *red blood cells*; **Hb:** hemoglobina; **Hct:** Hematocrito; **VPM:** volume plaquetario medio; **ISTH-BAT:** Herramienta de evaluación del sangrado de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia; **FPI (%):** fracción de plaquetas inmaduras o plaquetas reticuladas en sangre periférica. Los casos índice de cada pedigrí se señalan en negrita. Los casos subrayados son pacientes no portadores de variantes en la tubulina $\beta 1$. Rango normal de sujetos sanos de nuestro cohorte ($n=107$): [Plaquetas: $142-359 \times 10^9/L$] y [VPM: 9-12.8 fL]. La FPI (%) en sujetos control ($n=6$), ensayados en paralelo con nuestros pacientes: 2.30-3.30.

Evaluación del efecto deletéreo de las variantes *missense* en *TUBB1* sobre el ensamblaje de los microtúbulos

Para evaluar el efecto de las variantes *missense* en la tubulina $\beta 1$ en el ensamblaje de microtúbulos, expresamos la tubulina $\beta 1$ nativa y las mutantes en células CHO transfectadas. Como control positivo, las células CHO se transfectaron con la tubulina $\beta 1$ mutante Ser260²³. Como se muestra en la **Figura 2**, la tubulina $\beta 1$ nativa expresada en células CHO se incorporó en los microtúbulos con normalidad. Por el contrario, el mutante Pro107 de tubulina $\beta 1$ mostró un patrón difuso y alterado de la distribución citoplasmática de los microtúbulos similar al observado con el mutante Ser260. El mutante Trp359 de la tubulina $\beta 1$ se incorporó parcialmente a la red de microtúbulos pero también se expresaba difusamente en el citoplasma; los mutantes Asp269 y Glu109 dieron como resultado la acumulación aberrante de $\beta 1$ -tubulina en forma de agregado puntiformes en el citoplasma (**Figura 2**). Además, la longitud de los microtúbulos en las células CHO transfectadas con mutantes de tubulina $\beta 1$ fue significativamente más corta en comparación con la de las células transfectadas con $\beta 1$ -tubulina nativa (**Figura 2C**). Cabe mencionar que ninguno de estos mutantes afectó el ensamblaje normal de la α -tubulina en microtúbulos (**Figura 2**).

Para demostrar el efecto deletéreo de estas variantes genéticas, se abordó un estudio más extenso de fenotipo plaquetario en todos los pacientes, excepto en los probandos de los pedigríes C y D que no estuvieron disponibles para nuevos experimentos.

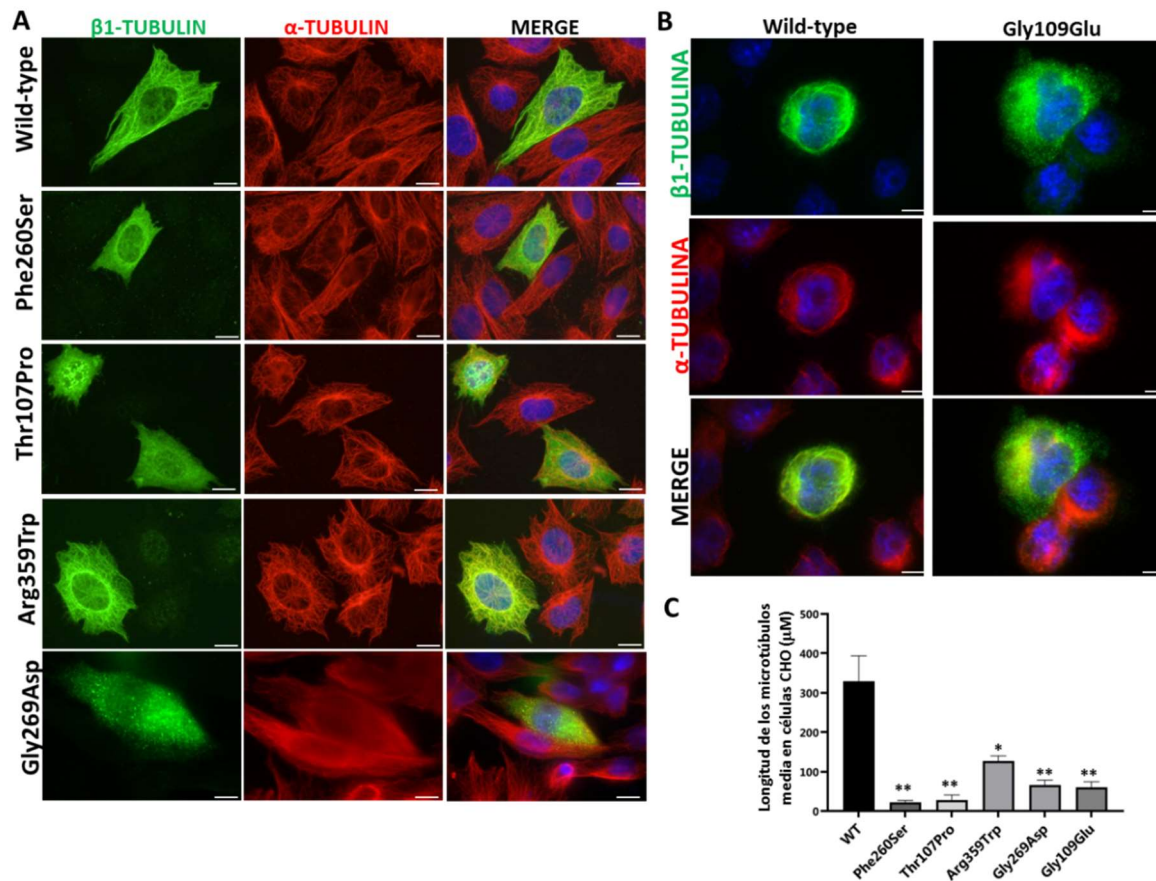


Figura 2. Efecto de las variantes missense en un modelo celular CHO. Distribución de **A)** la tubulina $\beta 1$ wild type, y las mutantes p.260Ser, p.107Pro, p.359Trp y p.269Asp, y **B)** de la mutante p.109Glu (en otro set de experimentos diferente), transfectadas en células CHO y evaluadas por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-tubulina $\beta 1$ (verde). La distribución de la tubulina α (rojo) también se evaluó en las células transfectadas. **C)** Longitud de los microtúbulos en células CHO transfectadas con la tubulina $\beta 1$ wild type y las mutantes evaluada con el software de Image J. Todos los mutantes de la tubulina $\beta 1$ presentaron una longitud de microtúbulos menor. Todas las imágenes se adquirieron con un microscopio Carl Zeiss Axio Observer. A1 fluorescence microscope (objetivo 63x). Las barras de la escala representan 20μ m. El gráfico representa media \pm SD de los valores obtenidos de al menos 10 campos distintos. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$.

Las variantes missense en la tubulina $\beta 1$ no afectan a la función plaquetaria

En los estudios mediante citometría de flujo, las plaquetas de los pacientes trombocitopénicos portadores de las variantes p.Arg359Trp, p.Gly269Asp y p.Gly109Glu mostraron unos niveles de GPs en el límite superior de la normalidad (**Figura Suplementaria S3A**), lo cual es compatible con un mayor tamaño de sus plaquetas. La unión de fibrinógeno inducida por agonistas plaquetarios, a pesar de su alta variabilidad, mostró una tendencia a estar aumentada en estos individuos, mientras que la secreción de gránulos α o δ (la expresión de superficie de CD62 y CD63, respectivamente) fue similar a la observada en plaquetas control (**Figura Suplementaria S3B, C, D**). El ensayo Impact-R, en el que se expone a una muestra de sangre a alta velocidad de flujo en un pocillo de poliestireno, mostró que la variante p.Gly109Glu no afecta de forma significativa a la adhesión y agregación plaquetaria

(Figura Suplementaria S4). Además, los portadores homocigotos y heterocigotos de la variante p.Gly109Glu presentaron una respuesta de agregación plaquetaria normal a diferentes agonistas (Figura Suplementaria S5). Los portadores no trombocitopénicos de cualquiera de estas tres variantes *missense* y los familiares no portadores, mostraron parámetros de función plaquetaria normales (datos no mostrados).

Las variantes *missense* en *TUBB1* alteran la expresión de la tubulina β 1, la organización de los microtúbulos en plaquetas, el *spreading* plaquetario, la formación de proplaquetas y la maduración de plaquetas.

Efecto de la variante c.1075 C>T [p.Arg359Trp]

En las plaquetas control en reposo, la tubulina β 1 se localizó en los microtúbulos de la banda marginal. Por el contrario, en algunas plaquetas de portadores de la variante p.Arg359Trp (pedigrí F), el anillo de tubulina β 1 estaba ligeramente desorganizado, lo que sugiere un moderado efecto deletéreo de la variante sobre el ensamblaje de los microtúbulos. Este efecto deletéreo fue más evidente en los portadores con trombocitopenia (Figura 3A). La tubulina β 1 también estaba desorganizada en las plaquetas en *spreading* de los portadores, sin mostrar una distribución normal en forma de fibras (Figura 3B). A pesar de la desorganización de la tubulina β 1, el porcentaje plaquetas en *spreading* fue normal (Figura 3C). Los estudios de inmunoblotting en lisados de plaquetas mostraron una expresión de tubulina β 1 mínimamente afectada por la variante p.Arg359Trp (Figura 3D).

Como se muestra en la Figura 3E y 3F, la formación de proplaquetas por los MKs diferenciados de células CD34⁺ de sangre periférica fue casi ausente en portadores de la variante p.Arg359Trp con trombopenia. En estos pacientes observamos unas pocas proplaquetas pequeñas y aisladas, ya que la mayoría de Mks eran pequeños y estaban formando clusters (Figura 3E). La organización de la β 1-tubulina estaba alterada, tal y como se muestra por la disminución de la longitud de los microtúbulos (Figura 3G). Por el contrario, en los portadores no trombocitopénicos y en los no portadores de esta variante, la formación de proplaquetas fue normal (Figura 3E, F, G). Finalmente, vimos un reducido número de proplaquetas circulantes de tipo *barbell* y de estructuras con forma de 8 y, un mayor número de preplaquetas, sugiriendo una alteración relevante en la maduración final de las plaquetas (Figura Suplementaria S6A).

Efecto de la variante c.806 G>A [p.Gly269Trp]

Las plaquetas en reposo de portadores de la variante p.Gly269Trp del pedigrí H, con o sin trombocitopenia, se caracterizaron por la ausencia del anillo típico de de tubulina β 1, en favor de una tubulina desorganizada por el citoplasma. Por el contrario, en los no portadores la banda marginal de la tubulina β 1 era normal (Figura 4A). El *immunoblotting* mostró una expresión moderadamente reducida de tubulina β 1 en plaquetas de los portadores de la variante p.Gly269Trp (Figura 4B).

A diferencia de los de los no portadores y controles sanos, en los cultivos de Mks de los portadores de p.Gly269Trp, la mayoría de los Mks estaban agrupados en cluster, y los Mks formando proplaquetas eran muy escasos, observándose solo unas pocas proplaquetas aisladas pequeñas (**Figura 4C, 4E**). Los MK de estos pacientes se adherían y hacían *spreading* sobre una matriz de fibrinógeno con aparente normalidad. La tubulina $\beta 1$ se incorporó en los microtúbulos de algunos MK, mientras que en otros la tubulina $\beta 1$ mostró una distribución aberrante combinada con microtúbulos más cortos, de forma similar a lo observado en plaquetas y en células CHO (**Figura 4F**). También encontramos una reducción en el número de proplaquetas de tipo barbell y en las estructuras en forma de 8, y un aumento en las preplaquetas de la sangre, de nuevo indicando un defecto en la maduración final de las plaquetas (**Figura Suplementaria S6B**).

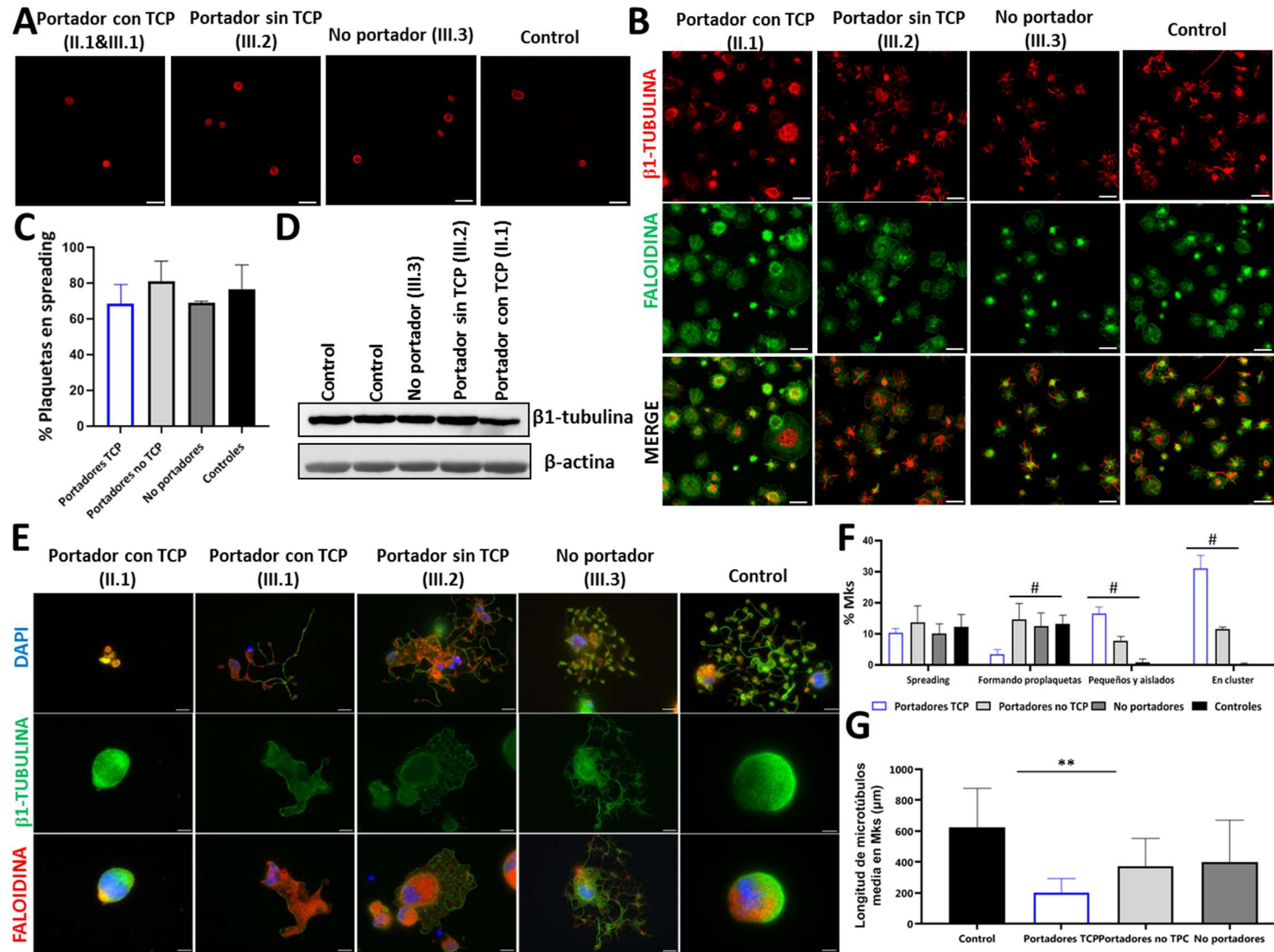


Figura 3. Efecto de la variante p.Arg359Trp en la β 1-tubulina en plaquetas y megacariocitos.

Figura 3. Efecto de la variante p.Arg359Trp en la β 1-tubulina en plaquetas y megacariocitos. Las consecuencias funcionales y estructurales de la variante p.Arg359Trp en TUBB1 se evaluaron en miembros de la familia F. El análisis de inmunofluorescencia de la tubulina β 1 se realizó en plaquetas adheridas a cubreobjetos recubiertos de una matriz de poly-L-lisina bajo las condiciones de **A)** reposo (con plasma rico en plaquetas) y **B)** spreading (con plaquetas lavadas), de portadores de la variante p.Arg359Trp con trombocitopenia (II.1 and III.1), o sin trombocitopenia (III.2), un no portador (III.3) y un control sano. Las plaquetas se tiñeron con un anticuerpo anti tubulina β 1 (rojo) y con faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (verde). Las barras de la escalas representan $5\mu\text{m}$, y el objetivo fue de 63X. **C)** El gráfico de barras muestra el porcentaje de plaquetas en spreading relativo al total de plaquetas adheridas. El gráfico representa media \pm SD de los valores obtenidos de al menos 10 campos distintos en pacientes y controles. **D)** Western-blot representativo de los niveles de tubulina β 1 en lisados de plaquetas de portadores de la variante p.Arg159Trp con y sin trombocitopenia, de un no portador y de dos controles sanos, usando la β -actina como un control de carga. **E)** Imágenes ilustrativas de Mks derivados de células CD34+ de sangre periférica de pacientes del Pedigrí F (portadores de la variante p.Arg159Trp con y sin trombocitopenia) y un control sano. Los Mks se tiñeron con un anticuerpo anti tubulina β 1(verde) y con faloidina marcada con rodamina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes se adquirieron en un microscopio Carl Zeiss Axio Observer. A1 fluorescence microscope (con un objetivo 63X). Las barras de la escala representan $5\mu\text{m}$. **F)** Clasificación de los Mks en miembros de la familia y en controles. Las células polinucleadas que se extienden con protuberancias que acaban en “tips” se consideran como Mks formando proplaquetas, mientras que las células con forma aplanada y con la actina organizada en fibras y en puntos focales de adhesión se consideraron como Mks en spreading. Algunos Mks eran pequeños y aislados, mientras que otros estaban presentes formando agregados de 2 o más Mks que se consideraron como clusters. Se analizaron como mínimo 100 células en 5 campos distintos. #= $p < 0.05$ vs. portadores con trombocitopenia. **G)** Longitud de los microtúbulos en Mks derivados de células CD34+ de controles y de portadores de la variante p.Arg159Trp evaluada con el software de ImageJ. El gráfico representa media \pm SD de los valores obtenidos de al menos 6 campos distintos. TCP: trombocitopenia. **= $p < 0.005$.

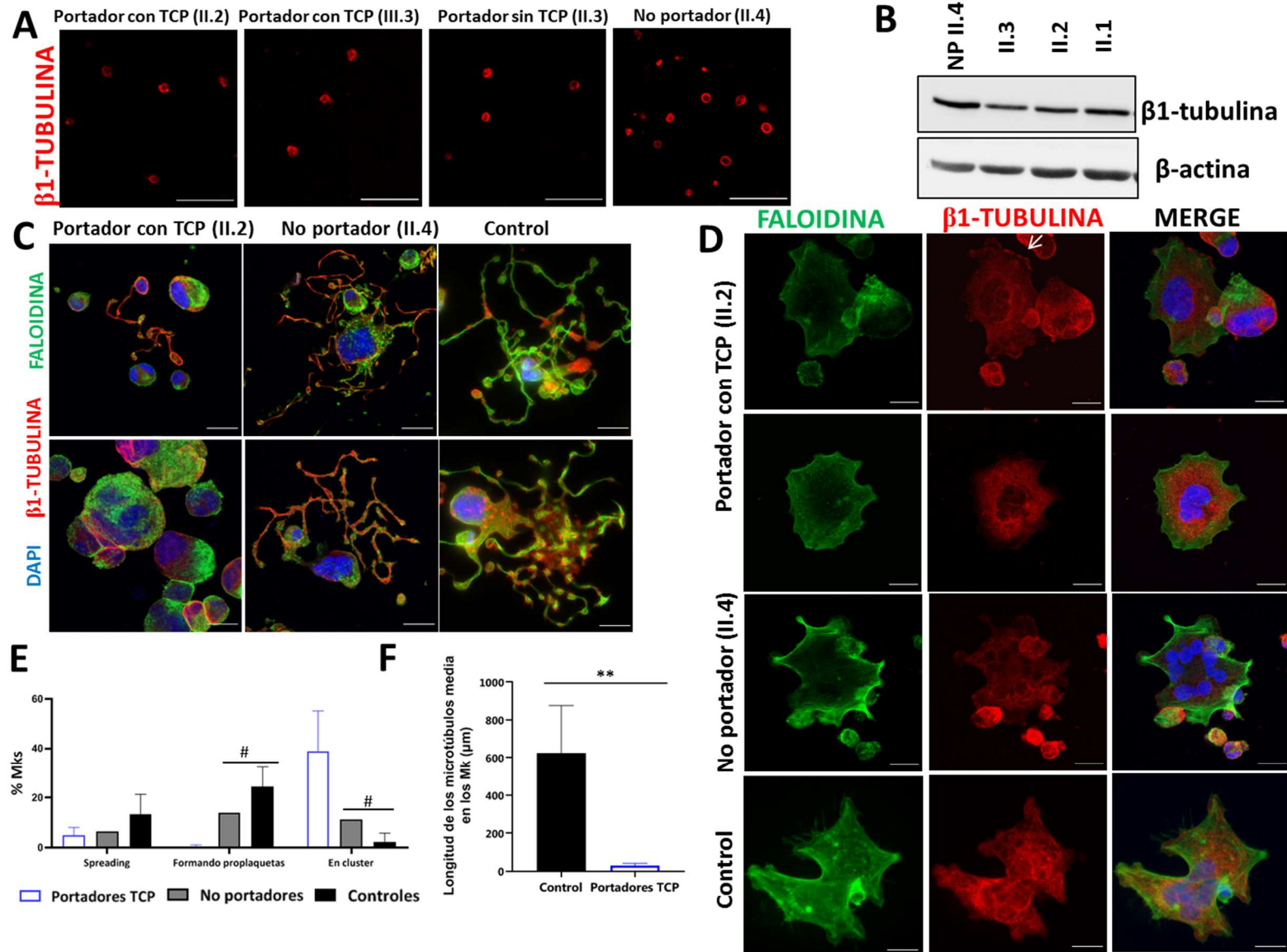


Figura 4. Efecto de la variante p.Gly269Asp en la β 1-tubulina en plaquetas y megacariocitos.

Figura 4. Efecto de la variante p.Gly269Asp en la β 1-tubulina en plaquetas y megacariocitos .Las consecuencias funcionales y estructurales de la variante p.Arg359Trp en TUBB1 se evaluaron en miembros de la familia H. **A)** El análisis de inmunofluorescencia de la tubulina β 1 se realizó en plaquetas adheridas a cubreobjetos recubiertos de una matriz de poly-L-lisina bajo condiciones de reposo (con plasma rico en plaquetas), de portadores de la variante p.Gly269Asp con trombocitopenia (II.2 and III.3), o sin trombocitopenia (II.3), un no portador (II.4). Las plaquetas se tiñeron con un anticuerpo anti tubulina β 1 (rojo). Las barras de escala representan $5\mu\text{m}$, y el objetivo fue de 63X (ampliación 3X). **B)** Western-blot representativo de los niveles de tubulina β 1 en lisados de plaquetas, usando la β -actina como un control de carga. **C)** Imágenes ilustrativas de Mks derivados de células CD34+ de sangre periférica de un portadores de la variante p.Gly269Asp con trombocitopenia (II.2), un no portador (II.4) y un control sano. **D)** Imágenes representativas de Mks en spreading. Los Mks se tiñeron con un anticuerpo anti tubulina β 1 (verde) y con faloidina marcada con rodamina (rojo). Los nucleos se tiñeron con DAPI (azul). La flecha blanca indica un Mk con la tubulina β 1 desorganizada. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP8 con el objetivo 63X (ampliación 1.5X). Las barras de la escala representan $5\mu\text{m}$. **E)** Clasificación de los Mks en miembros de la familia y en controles (como se describe en la Figura 3, # $p < 0.05$ vs. portadores trombocitopénicos). **F)** Longitud de microtúbulos en Mks derivados de células CD34+ de controles y de portadores de la variante p.Gly269Asp evaluada con el software de ImageJ. El gráfico representa media \pm SD de los valores obtenidos de al menos 10 campos distintos. NP: no portador; TCP: trombocitopenia. **= $p < 0.005$.

Efecto de la variante p.Gly109Glu

El pedigrí I es peculiar ya que solo los portadores homocigotos, y no los heterocigotos, presentaban macrotrombocitopenia. La microscopía electrónica mostró que la mayoría de las plaquetas de los portadores homocigotos de p.Gly109Glu eran redondas y grandes, con un sistema canalicular abierto ligeramente hipertrófico y un sistema de demarcación de membrana irregular (**Figura 5**). Por el contrario, en los portadores heterocigotos, la población de plaquetas era heterogénea en tamaño y forma.

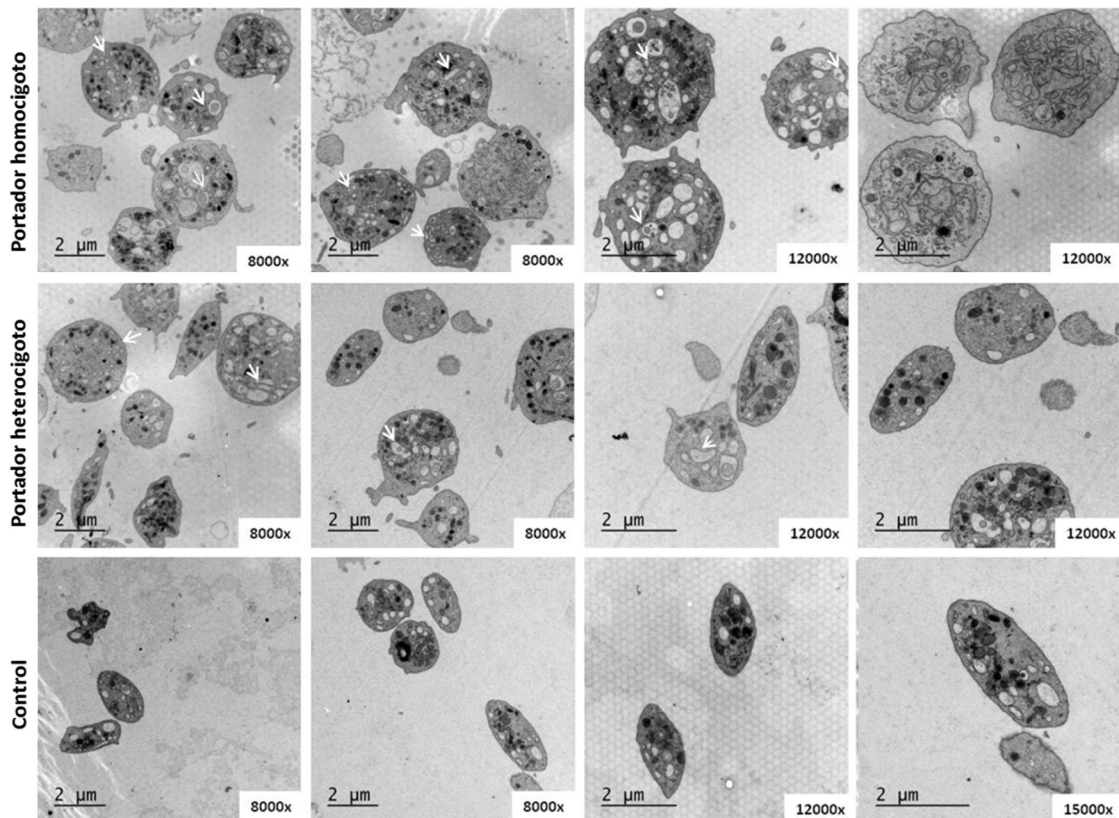


Figura 5. La variante p.Gly109Glu en la tubulina $\beta 1$ altera la ultraestructura plaquetaria. Microscopía electrónica de plaquetas de dos portadores homocigotos y un portador heterocigoto de la variante p.Gly109Glu en la tubulina $\beta 1$ y en dos portadores sanos. A diferencia de las plaquetas control, la mayoría de las plaquetas de los portadores homocigotos de p.Gly109Glu eran redondas y grandes, y mostraban un sistema canalicular abierto ligeramente hipertrófico y un sistema de demarcación de membrana irregular (flechas blancas y asteriscos, respectivamente). Se indica la ampliación usada en cada imagen (8000-15000x). Las imágenes se adquirieron en un microscopio electrónico de transmisión Philips / FEITecna12.

Los ensayos de inmunofluorescencia en plaquetas confirmaron que el efecto deletéreo de esta variante sobre el ensamblaje de microtúbulos, está determinado por la carga alélica. En los portadores homocigotos p.Gly109Glu las plaquetas en reposo carecían de la banda marginal y la $\beta 1$ -tubulina estaba dispuesta en agregados en el citoplasma. Por el contrario, la banda marginal de la tubulina $\beta 1$ era normal en las plaquetas de los portadores heterocigotos (**Figura 6A**). Además, aunque las plaquetas de los dos hermanos homocigotos mostraron un *spreading* normal (**Figura 6B**), la tubulina $\beta 1$

formó agregados en el citoplasma en lugar de disponerse en fibras como se observó en portadores y controles heterocigotos (**Figura 6C**). Adicionalmente, la β 1-tubulina no detectó mediante *immunoblotting*, con dos anticuerpos diferentes, en los lisados de plaquetas de los portadores homocigotos (**Figura 6D**). La distribución celular de otras proteínas del citoesqueleto, como actina, α -actinina, DIAPH1, filamina y MYH9, fue normal en estos pacientes (**Figura Suplementaria S7**).

Como se muestra en la **Figura 7A-7C**, los MK que forman proplaquetas eran escasos, pequeños y aparecían agrupados, con microtúbulos más cortos (**Figura 7D**). Aunque tanto en pacientes homocigotos como heterocigotos, los MKs se adhirieron y se extendieron normalmente sobre el fibrinógeno, solo en los MK de los homocigotos la distribución de la β 1-tubulina fue aberrante, acumulándose en pequeños agregados (**Figura 7B**). Además, la maduración final de las plaquetas en la sangre parecía alterada, considerando la presencia de menos proplaquetas de tipo *barbell* y estructuras en "forma de 8", y el incremento de preplaquetas (**Figura Suplementaria S6C**).

También evaluamos la distribución de la tubulina α por inmunofluorescencia. Observamos que la tubulina α y la β 1 en plaquetas en reposo de los controles y los portadores heterocigotos de la variante Glu109 se localizaban en el anillo de tubulina (**Figura Suplementaria S8A**) con una fuerte colocalización (**Figura Suplementaria S9**). Por el contrario, en las plaquetas de portadores homocigotos la banda marginal estaba compuesta principalmente solo por α -tubulina (**Figura Suplementaria S8A y S7**). En las plaquetas en condiciones de *spreading*, la α -tubulina se incorporó con normalidad a los microtúbulos en controles y en los portadores de la variante Glu109 (**Figura Suplementaria S8B**). El análisis de *immunoblotting* demostró una mínima reducción en los niveles de tubulina α en los portadores homocigotos de esta variante, mientras que la α -tubulina acetilada estaba aumentada en los portadores homocigotos y, en menor medida, en los heterocigotos (**Figura Suplementaria S8C**). El ensayo de qRT-PCR mostró una marcada reducción en los niveles de ARNm de *TUBB1* en portadores homocigotos, y un incremento en el nivel de ARNm de la β 5-tubulina (*TUBB5*), una isoforma regulada al alza en ratones β 1-Tubb1^{-/-14} (**Figura Suplementaria S8D**).

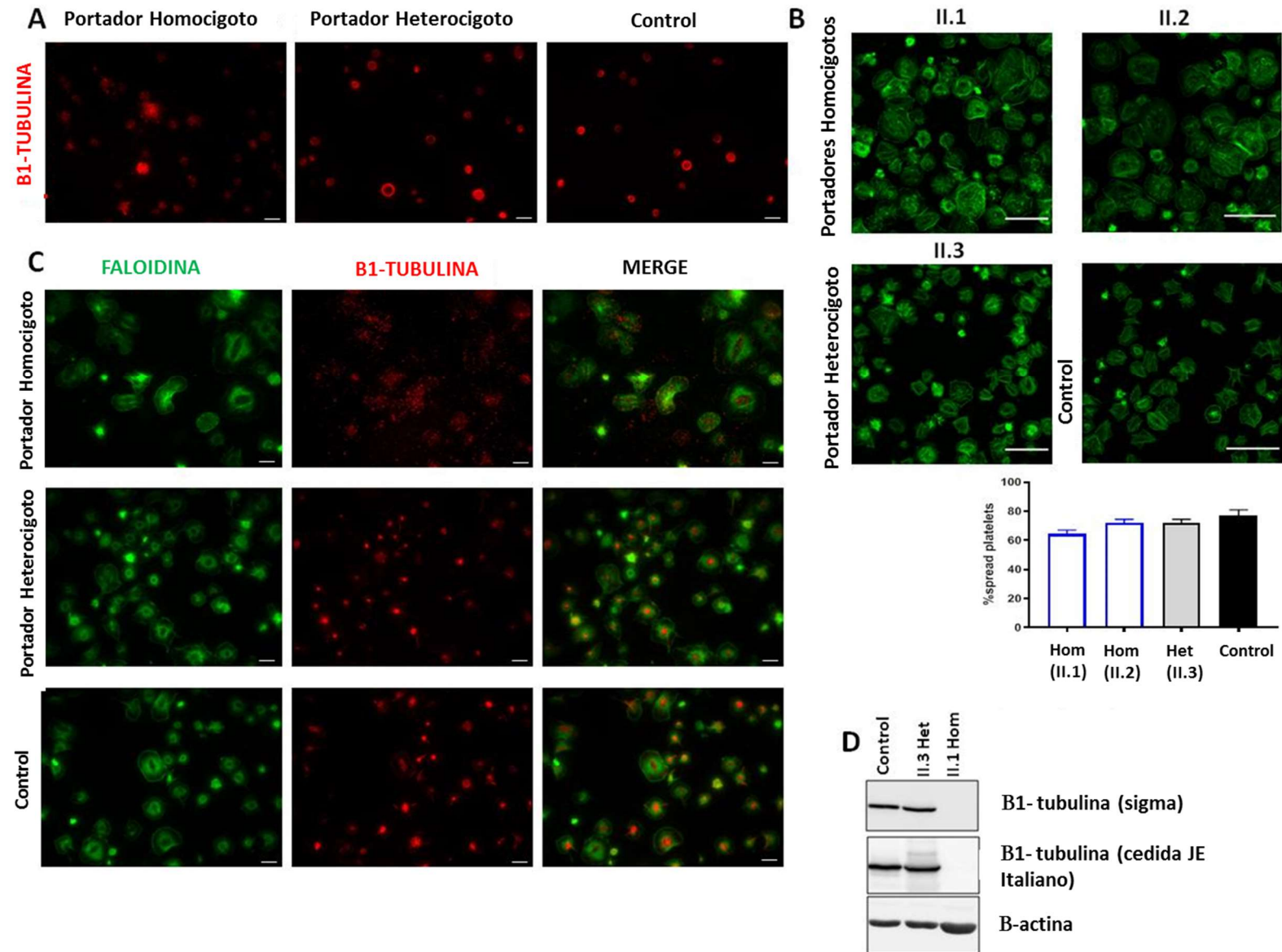


Figura 6. La variante p.Gly109Glu altera la incorporación de la tubulina $\beta 1$ en los microtúbulos con un efecto mínimo sobre el *spreading* plaquetario.

Figura 6. La variante p.Gly109Glu altera la incorporación de la tubulina $\beta 1$ en los microtúbulos con un efecto mínimo sobre el *spreading* plaquetario. *Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de la tubulina $\beta 1$ en plaquetas lavadas del paciente (Pedigrí I) y del control en A) reposo y B-C) en condiciones de spreading. Las plaquetas se tiñeron con un anticuerpo de $\beta 1$ -tubulina (rojo) y con faloidina*FITC (verde). Las imágenes se adquirieron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio Observer.A1 con un objetivo de 100X. Las barras de escala son de 5 μm . B) La capacidad de spreading de las plaquetas sobre poly-L-lisina se cuantificó y se calculó el porcentaje de plaquetas en spreading respecto del total de plaquetas adheridas. Los valores son la media \pm desviación estándar. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Leica SP8 con un objetivo de 63X (aumento de 2X). Las barras de escala son de 20 μm . D) Imágenes de inmunoblotting de los niveles de $\beta 1$ -tubulina en lisados de plaquetas de pacientes y controles, utilizando dos anticuerpos de $\beta 1$ -tubulina diferentes; se utilizó β -actina como control interno. Abreviaturas: Hom: homocigoto; Het: Heterocigoto.*

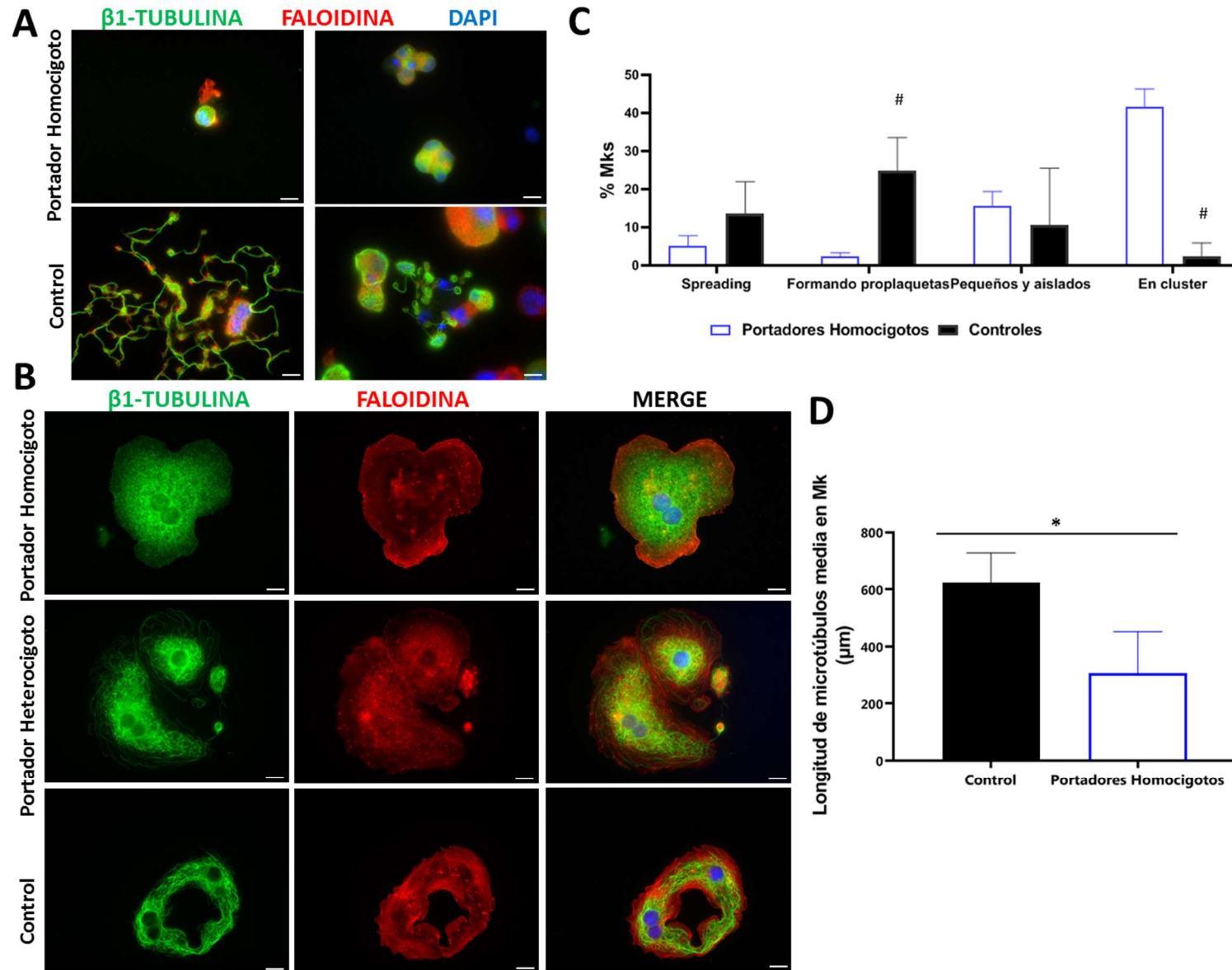


Figura 7. Efecto de la variante p.Gly109Glu en *TUBB1* en cultivos de Mks derivados de células CD34⁺ de sangre periférica.

Figura 7. Efecto de la variante p.Gly109Glu en TUBB1 en cultivos de Mks derivados de células CD34⁺ de sangre periférica. A) *Imágenes representativas de megacariocitos derivados de células CD34⁺ de sangre periférica en 2 controles y en portadores homocigotos (pedigrí I) de la nueva variante p.Gly109Glu. B)* *Imágenes detalladas de MKs en spreading. Los MK se marcaron con β 1-tubulina (verde) y faloidina marcada con rodamina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes se adquirieron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio Observer.A1 con un objetivo de 63X. Las barras de escala son de 5 μ m. C)* *Clasificación de MK (como se describe en la Figura 3; #p <0,05) en portadores homocigotos y controles. D)* *La longitud de los microtúbulos en MK de controles y portadores homocigotos de la variante p.Gly109Glu se evaluó utilizando el software ImageJ. Los valores son la media \pm desviación estándar de los valores obtenidos de al menos 6 campos de microscopía diferentes. * =p <0,05.*

4. Discusión

El presente estudio amplía el conocimiento sobre TUBB1-RT al describir la caracterización de la mayor serie hasta la fecha de familias con este trastorno, y mostrar una amplia heterogeneidad en la presentación genética y clínica de esta patología. En 8 de los 9 pedigrí estudiados encontramos portadores heterocigotos de cinco variantes en *TUBB1*; cuatro de las ellas (c.35del [p.Cys12Leufs12*], c.319A>C [p.Thr107Pro], c.1267C>T [p.Gln423*] y c.1075C>T [p.Arg359Trp]) la identificamos anteriormente²⁴, y ahora las caracterizamos funcionalmente. La variante c.806G>A [p.Gly269Asp] en *TUBB1* es nueva y se comunica por primera vez en este trabajo. En el noveno pedigrí, encontramos la variante c.326G>A [p.Gly109Glu]. Esta variante fue identificada previamente en heterocigosis por estudios de asociación de genoma completo [GWAS], como una variante genética de baja frecuencia (MAF = 0.087%) asociada con recuento bajo de plaquetas y aumento del VPM⁴⁴. Más recientemente se ha identificado en cuatro pacientes con un defecto plaquetario, reclutados en el proyecto ThromboGenomics²⁶. En este estudio identificamos por primera vez esta variante p.Gly109Glu en estado de homocigosis en un pedigrí con TUBB1-RT.

Todas las variantes, excepto la *nonsense* p.Gln423*, se clasificaron inicialmente como VUS. Los estudios funcionales y los datos de segregación descritos aquí nos permiten la reclasificación de cuatro variantes como patogénicas o probablemente patogénicas (**Tabla Suplementaria S3**). Nuestro estudio subraya la importancia de los estudios funcionales para interpretar correctamente la patogenicidad de las variantes en la *TUBB1*. La adecuada curación de variantes genéticas asociadas con enfermedades es muy relevante y actualmente es un objetivo prioritario del *Clinical Genome Resource* [ClinGen] desarrollado por los denominados *Variant Curation Expert Panels*. A diferencia de la enfermedad relacionada con RUNX1 y la Trombastenia de Glanzmann, aún no se han establecido reglas de interpretación para las variantes involucradas en TUBB1-RT^{33,34}, y es muy probable que esta curación sea abordada por un panel de expertos del ClinGen.

Hasta ahora, se ha pasado por alto la penetrancia incompleta en la patología TUBB1-RT, y este hecho solo se ha descrito muy recientemente en una familia China portadora de la variante en *TUBB1* p.Arg318Trp⁴⁵. Por el contrario, este fenómeno sí se ha descrito para variantes de *TUBB1* de alta frecuencia que se consideran modificadores del fenotipo de trombocitopenia causado por variantes en otros genes^{15,18}.

En este trabajo, y mediante estudios de segregación familiar, mostramos también una penetrancia incompleta para rasgos plaquetarios: en el caso de variantes raras en *TUBB1*. Así: i) 1 de 4 portadores de la variante p.Cys12Leufs12* (familias A y B) presentó un aumento del VPM pero un recuento plaquetario normal; ii) un portador

del cambio p.Gln423* (familia E) presentaba trombocitopenia pero un tamaño plaquetario normal; y iii) la mitad de los portadores de la variante p.Arg359Trp (familias F y G) y un tercio de los portadores de p.Gly269Asp (familia H) presentaban plaquetas normales (**Figura 1**). A diferencia de los datos previos^{26,44}, en nuestro estudio solo los portadores homocigotos de p.Gly109Glu mostraron macrotrombocitopenia, mientras que los portadores heterocigotos solo presentaron un aumento del VPM o plaquetas completamente normales. Estos datos destacan la relevancia de la carga alélica para la expresión fenotípica de este trastorno, y apoyan la noción de que la heredabilidad de TUBB1-RT puede ser más compleja que una simple herencia autosómica dominante^{21,22,46}.

El hecho de que los portadores de las variantes *missense* con trombopenia, respecto de los portadores sin trombocitopenia, presenten mayores niveles de plaquetas inmaduras (**Tabla 1**), puede respaldar que otros factores adicionales contribuyen a modular el recambio plaquetario en los pedigrís con TUBB1-RT. Debemos reconocer que una potencial limitación al determinar la FPI con analizadores hematológicos automáticos, es que las plaquetas maduras con VPM grande, o una parte de ellas, pueden clasificarse erróneamente como plaquetas inmaduras.

El impacto de las variantes en la incorporación de la tubulina $\beta 1$ en los microtúbulos y en la función plaquetaria parece ser heterogéneo. Los experimentos de transfección en células CHO y los estudios en plaquetas de pacientes mostraron que los mutantes de la $\beta 1$ -tubulina Asp269, Pro107 y Glu109, similares a p.Phe260Ser y p.Arg318Trp^{22,23}, no se incorporaron a la red microtubular, mientras que la variante p.Arg359Trp ejerció un efecto deletéreo más débil en la distribución de la tubulina $\beta 1$. La distribución anormal de tubulina es un hallazgo previamente reconocido en TUBB1-RT^{18,22,23,46} y apoya la patogenicidad de las variantes encontradas en nuestras familias.

Aunque se requieren más estudios, y en contra de lo que se describe en un análisis reciente de *spreading* plaquetario⁴⁷, encontramos que las plaquetas y MK de portadores heterocigotos de la variante p.Arg359Trp y portadores homocigotos de la variante p.Gly109Glu realizan un *spreading* normal. Ello sugiere que la $\beta 1$ -tubulina puede no ser crítica para el *spreading* plaquetario, lo que podría contradecir la hipótesis de que esta proteína es un componente clave de la maquinaria de *spreading*^{11,38}.

Los estudios de *immunoblotting* mostraron que los niveles de $\beta 1$ -tubulina en las plaquetas de los portadores heterocigotos de las variantes p.Arg359Trp, p.Gly269Asp y p.Gly109Glu se vieron mínimamente afectados. Por el contrario, la $\beta 1$ -tubulina fue casi indetectable en los lisados de plaquetas de los portadores homocigotos de la variante p.Gly109Glu. A diferencia de nuestros hallazgos, se ha descrito previamente una reducción de los niveles de la $\beta 1$ -tubulina en plaquetas de portadores heterocigotos de las variantes p.Arg318Trp y p.Phe260Ser en *TUBB1*^{22,23}, pero los mecanismos

subyacentes aún se desconocen. Aunque se ha sugerido la inestabilidad proteica de las isoformas mutantes^{22,23}, nuestros datos revelan niveles más bajos de ARNm de *TUBB1* en portadores homocigotos de la variante p.Gly109Glu, que sugieren que el defecto de la tubulina $\beta 1$, al menos en esta familia, también puede deberse a una desregulación transcripcional alterada de *TUBB1*.

Se considera que para conseguir un ensamblaje óptimo de los heterodímeros de α - y β -tubulina, es necesaria la producción coordinada de ambas isoformas de tubulinas^{48,49}. De hecho, se demostró que los portadores heterocigotos de la variante p.Phe260Ser *TUBB1* tienen una expresión plaquetaria notablemente reducida tanto de $\beta 1$ como de tubulina α . Por el contrario, los portadores homocigotos de p.Gly109Glu mostraron una expresión plaquetaria casi normal de tubulina α , mientras que los niveles de la tubulina α acetilada, un marcador de estabilidad de microtúbulos⁵⁰, y los niveles de ARNm de *TUBB* ($\beta 5$ -tubulina) estaban aumentados. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la regulación positiva de otras isoformas de la β -tubulina puede contrarrestar el defecto de la tubulina $\beta 1$. En la misma línea, hemos demostrado previamente en plaquetas neonatales que la regulación a la baja de la $\beta 1$ -tubulina se contrarresta por la *upregulación* de otras isoformas de la β -tubulina³⁸. Cabe destacar que los ratones *Tubb1*^{-/-} muestran una sobreexpresión de las tubulinas $\beta 2$ y $\beta 5$, aunque estas isoformas no son suficientes para compensar completamente la ausencia de $\beta 1$ -tubulina¹⁴. Nuestro hallazgo de una expresión y localización normal de filamina, MYH9, DIAPH1 y α -actinina en plaquetas de portadores de la variante p.Gly109Glu indica que, a pesar de los componentes del citoesqueleto están estrictamente conectados y contribuyen a mantener la dinámica celular^{51,52}, su producción no está influenciada por el defecto de la $\beta 1$ -tubulina.

El efecto deletéreo de las variantes en *TUBB1* (p.Arg359Trp, p.Gly269Asp y p.Gly109Glu) está fuertemente respaldado por el hallazgo de una alterada maduración de MK y un defecto en la formación de proplaquetas a partir de MKs diferenciados de células CD34⁺ de los portadores trombocitopénicos de estas mutaciones. Una distribución anormal de la $\beta 1$ -tubulina en los MKs junto con una formación alterada de proplaquetas, ya se ha observado previamente para otras variantes de *TUBB1*^{22,23,53,54}. Además, reportamos por primera vez que los MKs de pacientes con *TUBB1*-RT tienden a formar clusters, de forma similar a como se ha descrito recientemente en DIAPH1-RD, una TC asociada también a defectos en el citoesqueleto⁵⁵. Cabe destacar que un estudio muy reciente en ratones sobre la formación de proplaquetas *in vivo* e *in vitro*, ha sugerido que el eje $\beta 1$ -tubulina/microtúbulos juega un papel esencial en la formación de proplaquetas *in vitro*, pero es menos crítico para la liberación de plaquetas *in vivo*. Ello podría explicar porque la trombocitopenia es moderada en los pacientes con *TUBB1*-RT⁵⁶. Finalmente, observamos por primera vez un defecto en la maduración tardía de la generación de plaquetas a partir de preplaquetas. La torsión de los microtúbulos para producir estructuras con "forma de 8" es crucial para el paso

de las preplaquetas, precursores de plaquetas circulantes grandes y de forma ovalada, a proplaquetas de tipo *barbell*, que posteriormente separan sus extremos para obtener dos plaquetas maduras³⁹. Por ello, es concebible que un defecto en la β 1-tubulina pueda conducir a una maduración reducida de las proplaquetas que contribuya a la trombocitopenia.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones: primero, no podemos excluir que otras variantes, en genes no presentes en nuestro panel de HTS, o condiciones adquiridas pueden contribuir a la trombocitopenia en algunos pacientes. En segundo lugar, la formación defectuosa de proplaquetas no es una prueba suficiente de la causalidad de las variantes de *TUBB1* en sí misma, y por esta razón ampliamos estos datos con experimentos realizados con células CHO transfectadas con las diferentes variantes.

En resumen, nuestro estudio amplía el espectro de *TUBB1*-RT (resumido en la **Tabla complementaria S4**), mostrando una notable heterogeneidad en la presentación clínica, lo que sugiere que la carga alélica o la combinación con otros factores genéticos o fenotípicos pueden modular el efecto de variantes raras de *TUBB1*. Los algoritmos de predicción *in silico* no son lo suficientemente fiables al analizar las variantes de *TUBB1*, ratificando la importancia de la información clínica y la evaluación biológica para afirmar la patogenicidad de dichas variantes. Nuestros resultados pueden contribuir a aclarar el efecto de la β 1-tubulina en la función plaquetaria y en la trombopoyesis.

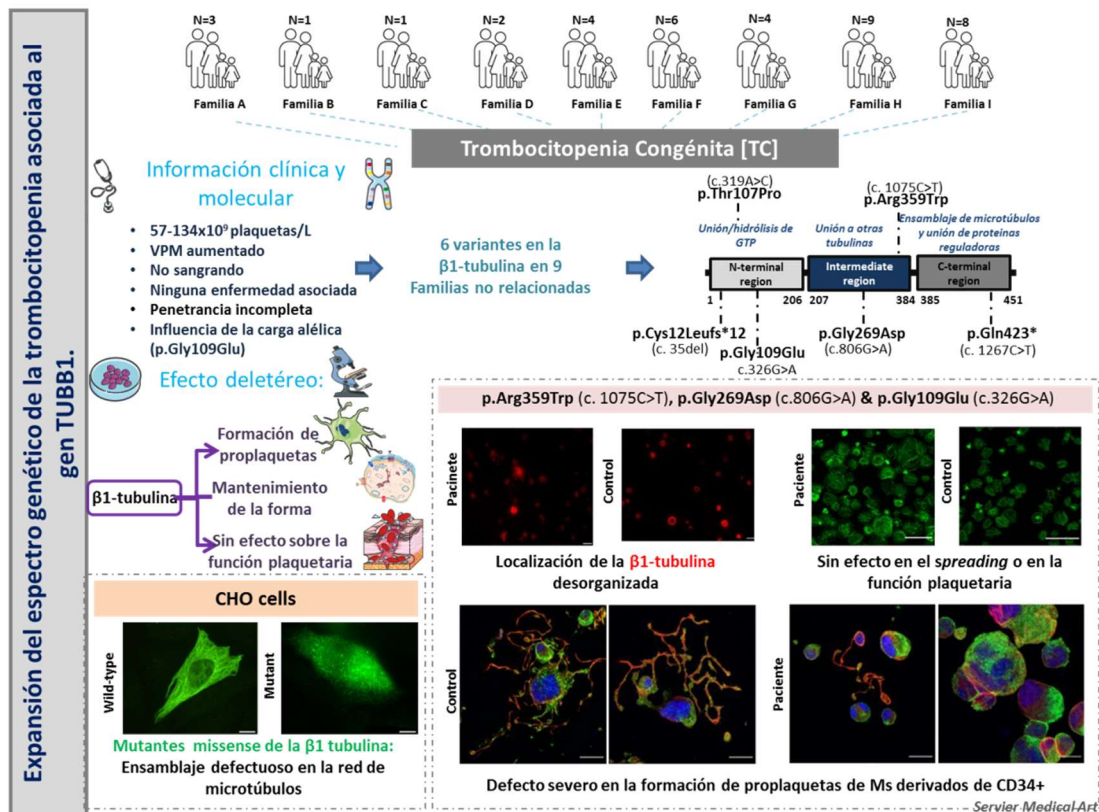


Figura 8. Resumen visual de los resultados alcanzados en el presente capítulo.

5. Referencias.

1. Bastida JM, Benito R, Lozano ML, et al. Molecular Diagnosis of Inherited Coagulation and Bleeding Disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019;45(7):695–707.
2. Savoia A. Molecular basis of inherited thrombocytopenias: An update. *Curr. Opin. Hematol.* 2016;23(5):486–492.
3. Balduini CL, Melazzini F, Pecci A. Inherited thrombocytopenias-recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets.* 2017;28(1):3–13.
4. Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: A growing list of disorders. *Hematology.* 2017;2017(1):385–399.
5. Nurden AT, Nurden P. Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica.* 2020;105(8):2004–2019.
6. Bury L, Falcinelli E, Gresele P. Learning the Ropes of Platelet Count Regulation: Inherited Thrombocytopenias. *J. Clin. Med.* 2021;10(3):.
7. Palma-Barqueros V, Revilla N, Sánchez A, et al. Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):.
8. Almazni I, Stapley R, Morgan N V. Inherited Thrombocytopenia: Update on Genes and Genetic Variants Which may be Associated With Bleeding. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019;6(June):1–9.
9. Orsini S, Noris P, Bury L, et al. Bleeding risk of surgery and its prevention in patients with inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2017;102(7):1192–1203.
10. Bury L, Megy K, Stephens JC, et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of MYH9-RD: Predicting pathogenic variants. *Hum. Mutat.* 2020;41(1):277–290.
11. Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, Rivera J, Teruel-Montoya R. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(14):1–13.
12. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood.* 2008;111(9):4605–4616.
13. Ghalloussi D, Dhenge A, Bergmeier W. New insights into cytoskeletal remodeling during platelet production. *J. Thromb. Haemost.* 2019;17(9):1430–1439.
14. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, et al. A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr. Biol.* 2001;11(8):579–586.
15. Freson K, De Vos R, Wittevrongel C, et al. The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure. *Blood.* 2005;106(7):2356–2362.
16. Navarro-Núñez L, Teruel R, Antón AI, et al. Rare homozygous status of P43 β 1-tubulin polymorphism causes alterations in platelet ultrastructure. *Thromb. Haemost.* 2011;105(5):855–863.
17. Leandro-García LJ, Leskelä S, Inglada-Pérez L, et al. Hematologic β -tubulin VI isoform exhibits genetic variability that influences paclitaxel toxicity. *Cancer Res.* 2012;72(18):4744–4752.
18. Basciano PA, Matakas J, Pecci A, et al. β -1 tubulin R307H SNP alters microtubule dynamics and affects severity of a hereditary thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(4):651–659.
19. Navarro-Núñez L, Lozano ML, Rivera J, et al. The association of the β 1-tubulin Q43P polymorphism with intracerebral hemorrhage in men. *Haematologica.* 2007;92(4):513–518.
20. Basciano PA, Bussel J, Hafeez Z, Christos PJ, Giannakakou P. The beta 1 tubulin R307H single nucleotide polymorphism is associated with treatment failures in immune thrombocytopenia (ITP). *Br. J. Haematol.* 2013;160(2):237–243.

21. Burley K, Westbury SK, Mumford AD. TUBB1 variants and human platelet traits. *Platelets*. 2018;29(2):209–211.
22. Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the β 1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood*. 2009;113(2):458–461.
23. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.* 2014;92(4):276–282.
24. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica*. 2018;103(1):148–162.
25. Johnson B, Lowe GC, Futterer J, et al. Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica*. 2016;101(10):1170–1179.
26. Downes K, Megy K, Duarte D, et al. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood*. 2019;134(23):2082–2091.
27. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(9):2063–2065.
28. Gresele P, Orsini S, Noris P, et al. Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(3):732–739.
29. Lozano ML, Cook A, Bastida JM, et al. Novel mutations in RASGRP2, which encodes CalDAG-GEFI, abrogate Rap1 activation, causing platelet dysfunction. *Blood*. 2016;128(9):1282–1289.
30. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978–1980.
31. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015;17(5):405–424.
32. Ross JE, Zhang BM, Lee K, et al. Specifications of the variant curation guidelines for ITGA2B/ITGB3: ClinGen Platelet Disorder Variant Curation Panel. *Blood Adv.* 2021;5(2):414–431.
33. Luo X, Feurstein S, Mohan S, et al. ClinGen Myeloid Malignancy Variant Curation Expert Panel recommendations for germline RUNX1 variants. *Blood Adv.* 2019;3(20):2962–2979.
34. Wu D, Luo X, Feurstein S, et al. How I curate: applying American Society of Hematology-Clinical Genome Resource Myeloid Malignancy Variant Curation Expert Panel rules for RUNX1 variant curation for germline predisposition to myeloid malignancies. *Haematologica*. 2020;105(4):870–887.
35. Hardy AT, Palma-Barqueros V, Watson SK, et al. Significant Hypo-Responsiveness to GPVI and CLEC-2 Agonists in Pre-Term and Full-Term Neonatal Platelets and following Immune Thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.* 2018;118(6):1009–1020.
36. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:213.
37. Shenkman B, Savion N, Dardik R, Tamarin I, Varon D. Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by the cone and plate(let) analyzer: role of platelet activation, fibrinogen and von Willebrand factor. *Thromb. Res.* 2000;99(4):353–361.

38. Caparrós-Pérez E, Teruel-Montoya R, Palma-Barquero V, et al. Down regulation of the Munc18b-syntaxin-11 complex and β 1-tubulin impairs secretion and spreading in neonatal platelets. *Thromb. Haemost.* 2017;117(11):2079–2091.
39. Thon JN, MacLeod H, Begonja AJ, et al. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat. Commun.* 2012;3(May 2018):852–859.
40. Bury L, Malara A, Gresele P, Balduini A. Outside-in signalling generated by a constitutively activated integrin α IIb β 3 impairs proplatelet formation in human megakaryocytes. *PLoS One.* 2012;7(4):e34449.
41. Bury L, Malara A, Momi S, et al. Mechanisms of thrombocytopenia in platelet-type von Willebrand disease. *Haematologica.* 2019;104(7):1473–1481.
42. Bury L, Zetterberg E, Leinøe EB, et al. A novel variant Glanzmann thrombasthenia due to co-inheritance of a loss- and a gain-of-function mutation of ITGB3: evidence of a dominant effect of gain-of-function mutations. *Haematologica.* 2018;103(6):e259–e263.
43. Noris P, Klersy C, Gresele P, et al. Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune thrombocytopenia: a multicentric, real life study. *Br. J. Haematol.* 2013;162(1):112–119.
44. Auer PL, Teumer A, Schick U, et al. Rare and low-frequency coding variants in CXCR2 and other genes are associated with hematological traits. *Nat. Genet.* 2014;46(6):629–634.
45. Hou Y, Shao L, Zhou H, et al. Identification of a pathogenic TUBB1 variant in a Chinese family with congenital macrothrombocytopenia through whole genome sequencing. *Platelets.* 2021;1–5.
46. Fiore M, Goulas C, Pillois X. A new mutation in TUBB1 associated with thrombocytopenia confirms that C-terminal part of β 1-tubulin plays a role in microtubule assembly. *Clin. Genet.* 2017;91(6):924–926.
47. Khan AO, Maclachlan A, Lowe GC, et al. High-throughput platelet spreading analysis: a tool for the diagnosis of platelet-based bleeding disorders. *Haematologica.* 2020;105(3):e124–e128.
48. Cleveland DW. Autoregulated instability of tubulin mRNAs: a novel eukaryotic regulatory mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 1988;13(9):339–343.
49. Gonzalez-Garay ML, Cabral F. Overexpression of an epitope- tagged β -tubulin in Chinese hamster ovary cells causes an increase in endogenous α -tubulin synthesis. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 1995;31(4):259–272.
50. Janke C, Montagnac G. Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Curr. Biol.* 2017;27(23):R1287–R1292.
51. Cerecedo D. Platelet cytoskeleton and its hemostatic role. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2013;24(8):798–808.
52. Shin EK, Park H, Noh JY, Lim KM, Chung JH. Platelet shape changes and cytoskeleton dynamics as novel therapeutic targets for anti-thrombotic drugs. *Biomol. Ther.* 2017;25(3):223–230.
53. Matsumura T, Nakamura-Ishizu A, Takaoka K, et al. TUBB1 dysfunction in inherited thrombocytopenia causes genome instability. *Br. J. Haematol.* 2019;185(5):888–902.
54. Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, et al. TUBB 1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO Mol. Med.* 2018;10(12):1–18.
55. Westbury SK, Downes K, Burney C, et al. Phenotype description and response to thrombopoietin receptor agonist in DIAPH1-related disorder. *Blood Adv.* 2018;2(18):2341–2346.
56. Bornert A, Boscher J, Pertuy F, et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica.* 2021;106(5):1368–1380.

Anexo Capítulo III: Ampliación del espectro genético de la trombocitopenia asociada al gen *TUBB1*.

1. Material y Métodos Suplementarios

Pacientes, muestras de sangre y de ADN

En el presente estudio participaron 9 familias españolas no emparentadas con sospecha de macrotrombocitopenia hereditaria reclutadas en el proyecto multicéntrico “Caracterización funcional y molecular de pacientes con Trastornos Plaquetarios Congénitos”, iniciado en 2008 con el patrocinio científico de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Este estudio se realizó por el “Grupo Español de Alteraciones Plaquetarias Congénitas” [GEAP]. Previamente hemos descrito los criterios de inclusión de pacientes con sospecha de tener un TPC¹. Hasta la fecha, se han estudiado en el proyecto 254 probandos, buscando sus potenciales alteraciones genéticas mediante un nuevo panel de genes de HTS, como se describe más abajo. Alrededor del 75% de los pacientes presentaban trombocitopenia como la principal característica clínica. En este trabajo, reportamos los pedigrís que se han reclutado en el proyecto hasta finales de 2019 en los que se ha establecido el diagnóstico de *TUBB1*-RT.

Se extrajeron muestras de sangre venosa de los pacientes y de controles sanos en paralelo, en tubos K3 EDTA al 7,5% (para hemograma, frotis de sangre, aislamiento de células CD34⁺ y cultivos de MKs, y purificación de ácidos nucleicos) y en citrato de sodio tamponado 0,105 M (para estudios de función en plaquetas). Los hemogramas completos, incluido el recuento plaquetario y el VPM se obtuvieron con un contador hematológico Sysmex® XS1000i (Sysmex España SL, Sant Just Desvern, España). En algunos pacientes, se midió la fracción de plaquetas inmaduras [%FPI] en muestras de sangre con EDTA utilizando un analizador hematológico Sysmex XE-2100 (Sysmex España). El recuento plaquetario manual se obtuvo mediante microscopía óptica utilizando una cámara de Burker, como se ha descrito anteriormente². Para medir las dimensiones de las plaquetas en frotis de sangre teñidos con May-Grünwald-Giemsa, se evaluaron 100 plaquetas y se clasificaron como normales, grandes o gigantes si el diámetro medio de las plaquetas era menor, similar o mayor, respectivamente, que el diámetro de los glóbulos rojos^{3,4}. Se aisló ADN genómico de sangre periférica utilizando el kit *DNeasy blood and tissue*, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración de ADN se cuantificó usando un fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Análisis molecular mediante un panel de HTS

El análisis del ADN de los pedigrís B, C, D y E se llevó a cabo utilizando el panel de genes HTS descrito anteriormente, utilizando una plataforma Illumina (Illumina, San

Diego, CA, EE. UU.)⁵. Los pacientes restantes se reclutaron más tarde y para ellos se utilizó un nuevo panel de genes de HTS. El diseño de los cebadores específicos para la amplificación de los 89 genes de interés incluidos en el panel se realizó con el algoritmo "*Ion Ampliseq Designer 5.4.1*", cubriendo 460,28 Kb sobre la secuencia de referencia del genoma humano GRCh37/hg19. Los 1679 amplicones superpuestos, con un rango de tamaño entre 125-375 pb, cubren todos los exones de 89 genes (**Tabla Suplementaria S1**) (incluidas 10 pb en los extremos de cada exón) y una región de 527 pb de Chr10: 27389025-27389552 del gen *ANKRD26*.

Se utilizaron 10 ng de ADN genómico (extraído de sangre con EDTA usando Qiacube (Quiagen Iberia, Madrid) para generar las librerías usando el *Ion Ampliseq Library Kit 2.0* (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA) según el protocolo del fabricante. Para la preparación de las librerías, los cebadores se agruparon en dos tubos y cada uno se amplificó en una reacción de 10 µl con *Ampliseq Library Kit 2.0* (Life Technologies) de acuerdo con el siguiente protocolo: activación a 99°C durante 2 min; seguido de 15 ciclos de 99°C durante 15s y 60°C durante 8 min. Después de la amplificación, se combinaron las dos reacciones y los cebadores se digirieron parcialmente con 2 µl de reactivo FuPa, seguido de una incubación a 50°C durante 10 min, 55°C durante 10 min y 60°C durante 20 min. Se añadieron adaptadores con código de barras Ion Xpress a cada muestra mediante incubación a 22°C durante 30 min, 68°C durante 5 min y 72°C durante 5 min. Las librerías se purificaron utilizando bolas AMPure XP (Beckman Coulter España, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España) según el fabricante. Las librerías con códigos de barras se cuantificaron utilizando el *Ion Library Taqman Quantification Kit* (Life Technologies) y se diluyeron a una concentración final de 100 pM para la preparación del template usando el *OneTouch 2 instrument* y el *Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit*. Las librerías que pasaban el control de calidad se secuenciaron en la plataforma Ion Torrent PGM (Ion Torrent-Thermo Fisher Scientific), utilizando el *Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit* (Ion Torrent) y Ion 318 Chip v2 BC (Ion Torrent). Se agruparon un máximo de 15 librerías para lograr una cobertura por amplicón de al menos 30X. El procesamiento de la señal de secuenciación, la generación de secuencias y la alineación de bases con la secuencia de referencia del genoma humano hg19 fueron procesados por el *Torrent Suite Software v.5.10.1*. La llamada y anotación de variantes se realizó utilizando una *pipeline* propia, basada en las herramientas bioinformáticas VarScan v2.3.9, SAMTools v1.3.1, ANNOVAR, Ensembl-VEP v99 y dbNFSP v4.0a.

Realizamos un análisis adicional de las variantes con DIGEVAR "*Discovering Genetic Variants*", una herramienta web desarrollada internamente para un análisis relativamente sencillo de los datos de HTS (<https://digevar.imib.es>). DIGEVAR se desarrolló en JAVA para acceder a los archivos de llamada de variantes [VCF] y permite a los usuarios autorizados realizar múltiples estrategias de filtrado de variantes que incluyen: gravedad de la variante, ubicación de la variante en el gen, frecuencia de

alelos menores [MAF], calidad de la secuencia y cobertura. Después de la selección del filtro, DIGEVAR proporciona una lista de variantes candidatas que cumplen los criterios de filtrado. Dado que DIGEVAR incorpora información de bases de datos públicas (ENSEMBL, NCBI, CLINVAR, ExAC, etc.) y del *software* de análisis de variantes (MutationTaster, Polyphen, Sift, PDB, etc.), proporciona una amplia información que incluye: frecuencia de alelos, ID de rs, transcrito, cambio de nucleótido/proteína, consecuencia de la variante en gen/proteína, filogenética, importancia de CLINVAR. Los módulos complementarios de DIGEVAR proporcionan: información de cobertura para cada región explorada en cada gen; información de la variante en bases de datos públicas (PubMed, dbSNP, etc.) e interpretación variante de acuerdo con las pautas de ACMG.

Secuenciación de Sanger

Las variantes identificadas en los casos índice por HTS, y su segregación en las familias, fueron confirmadas en los pedigrís mediante secuenciación Sanger en un secuenciador automático ABI 3130. Los pares de cebadores fueron diseñados en el sitio web ExonPrimer script (<https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>); y las secuencias de productos de PCR se analizaron utilizando el software MutationSurveyor disponible de SoftGenetics (<http://www.softgenetics.com/mutationSurveyor.php>).

	Variantes identificadas	Pareja de primers para la Secuenciación de Sanger
A&B	TUBB1 c. 35del [p.Cys12Leufs12X]	<i>TUBB1</i> -ex1F: GGACACACCCTTGGTCACAT <i>TUBB1</i> -ex1R : TGAGCCATGATTCTGCCACT
C&D	TUBB1 c.319A>C [p.Thr107Pro]	<i>TUBB1</i> -ex3F: CTGGGACGATGGACAGCATT <i>TUBB1</i> -ex4.1R: AGGGCCTCATTGTCAATGCA
E	TUBB1 c. 1267C>T [p.Gln423X]	<i>TUBB1</i> -4.2F: AACGTCAAGGTGGCTGTCTG <i>TUBB1</i> -4.2R: ACTTTGAAACAAAGGGAGCACT
F&G	TUBB1 : c. 1075C>T [p. Arg359Trp]	<i>TUBB1</i> -ex4F: CACAGTGGCCTGCATTTTCC <i>TUBB1</i> -ex4R: GCAGTGCAGAGTGGGTTTTG
H	TUBB1 c.806G>A [p.Gly269Asp]	<i>TUBB1</i> -ex4.1F: CTTCTCCCAAGGTGTCTGGAC <i>TUBB1</i> -ex4.2R: CAGCCACCTTGACGTTGTTG
I	TUBB1 : c.326G>A [p.Gly109Glu]	<i>TUBB1</i> -ex4F: CTGGGACGATGGACAGCATT <i>TUBB1</i> -ex4R: AGGGCCTCATTGTCAATGCA

Cultivo de Mks y análisis de la formación de proplaquetas

Se aislaron células madre hematopoyéticas CD34⁺ de sangre periférica mediante inmunoselección magnética con el kit *anti-CD34 MicroBeads* (Miltenyi Biotech, Bolonia, Italia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante⁶. Para la diferenciación de MKs, las células CD34⁺ se cultivaron durante 14 días en medio StemSpan suplementado con 10ng/mL de trombopoyetina humana recombinante

[TPO] y factor de células madre humanas recombinantes [SCF] 25 ng/mL durante 7 días, y solo con TPO durante los 7 días siguientes. Para evaluar la formación de proplaquetas y la extensión de MK, los MK en el día 14 de cultivo se separaron en un gradiente de suero de albúmina bovino [BSA] (3-4%), se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con 100µg/mL de fibrinógeno humano (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.) y se dejaron adherir durante 16h en presencia de 10 ng/mL de TPO. Las muestras se analizaron mediante tinción por inmunofluorescencia como se describe a continuación. La caracterización del cultivo se evaluó analizando al menos 100 células por muestra en >10 campos diferentes.

Evaluación de preplaquetas circulantes y proplaquetas de tipo *barbell*

La sangre del paciente y de control se centrifugó a 100 x g durante 20 min para obtener PRP. 10⁶ plaquetas se centrifugaron sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-L-lisina, se fijaron con PFA al 4% durante 20 min, se permeabilizaron con Triton-X al 0,1% durante 5 min, se bloquearon con BSA al 1% durante 1h, se tiñeron con un anti- Anticuerpo β1-tubulina (cedido por el profesor Joseph Italiano, Boston, EE. UU.) y luego con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.). Los núcleos se tiñeron con DAPI⁷. Las muestras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio Observer. A1 usando aceite de inmersión en el objetivo 100X.

Las preplaquetas con forma de 8 se contaron como el porcentaje de estructuras con forma de 8 respecto del total de elementos positivos para la tubulina β1 situados en el portaobjetos⁷, mientras que las proplaquetas se contaron como el porcentaje de plaquetas con un diámetro de 3-10 µm sobre el número total de elementos positivos para tubulina β1 situados en el portaobjetos. El análisis se realizó en 20 campos diferentes para cada muestra.

Agregación plaquetaria

La LTA se realizó en muestras de PRP usando un agregómetro Aggrecoorder II (Menarini Diagnostics, Florencia, Italia), como se describe en el capítulo I. Los agonistas plaquetarios empleados fueron: 25 µM TRAP, 5 and 10 µM ADP, 1.25 mg/mL ristocetina, 10 µg/ml colágeno y 1.6mM AA.

Ensayos de Impact-R

Se extrajeron muestras de sangre venosa de los pacientes disponibles y de los controles en citrato de sodio tamponado al 3,2%, y se analizaron en el analizador de placas y conos Impact-R (analizador de plaquetas Impact-R 47600, Matis Medical Inc.), como se describió originalmente⁸. Se dispensaron 130µl de sangre en un pocillo de poliestireno y se colocó un cono de teflón en la parte superior que se hizo girar (2050/s) para inducir un flujo a alta velocidad que promueve la adhesión de las

plaquetas al plástico. Los pocillos se lavaron, se tiñeron con solución de May-Grünwald, y se secaron al aire. El porcentaje de superficie de la placa cubierta con plaquetas teñidas [%SC], indica la adherencia plaquetaria, y el tamaño medio de los agregados [AS, μm^2], indica la agregación plaquetaria. Ambos parámetros se cuantificaron utilizando un microscopio de luz invertida conectado a una cámara y un software de análisis de imágenes que calcula la mediana de los valores a partir de siete imágenes de cada pocillo.

Citometría de flujo

La expresión de glicoproteínas de superficie plaquetarias y la secreción de gránulos y la activación de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ en presencia de agonistas se evaluó como se describe en el capítulo I, mediante citometría de flujo en un equipo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

Microscopía electrónica

Se usó microscopía electrónica para examinar la morfología y ultraestructura de las plaquetas de pacientes del pedigrí G. Se siguió la misma metodología que en el Capítulo II.

Ensayos de inmunofluorescencia

Los estudios de inmunofluorescencia se realizaron en plaquetas lavadas con tampón de Tyrode como se describió anteriormente⁹. Para los ensayos de *spreading*, las plaquetas lavadas ($20 \times 10^9/\text{L}$) se dejaron extender durante 30 min en un portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina a 37°C. Para la evaluación de la banda marginal, las plaquetas lavadas se colocaron en el portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se centrifugaron ($1000 \times g$, 1 min) y luego se fijaron con PFA al 4%. Después, las plaquetas se permeabilizaron y bloquearon con BSA al 0,5%/Triton X-100 al 0,1% en tampón PBS. Las células se incubaron con diferentes anticuerpos: anti- α (Santa Cruz Biotechnology, sc-5546), anti- β_1 -tubulina (Sigma, SAB1408037 y otro anticuerpo anti- β_1 -tubulina amablemente cedido por el Dr. JE Italiano (Harvard Medical School, Boston, EE. UU.). MA)^{6,10}, anti- α -actinina (Sigma, A5044), anti-MYH9 (Sigma, HPA001644), anti-DIAPH1 (Abcam, EPR1948), y faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína o rodamina, seguido del anticuerpo secundario apropiado conjugado con Alex Fluor 488 o 568 (ThermoFisher). Las imágenes de fluorescencia se registraron con un microscopio confocal Leica SP8. Para calcular el% de plaquetas en *spreading*, se analizaron 10 plaquetas de 10 campos diferentes (100 plaquetas por muestra).

La tinción de inmunofluorescencia en cultivos de MK se llevó a cabo después de la fijación como se describe anteriormente, usando faloidina marcada con rodamina para teñir la actina, un anticuerpo anti- β_1 -tubulina (cedido por el Dr. JE Italiano, Harvard

Medical School, Boston, MA) para teñir microtúbulos, y DAPI para teñir los núcleos, como se describió anteriormente^{6,10}. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio Observer.A1 (Carl Zeiss Inc, Oberkochen, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63x/1,4. La adquisición de imágenes se obtuvo utilizando el software AxioVision (Carl Zeiss Inc). Todas las células polinucleadas que extendían protuberancias con puntas terminales se consideraron MKs formadores de proplaquetas, mientras que aquellas que mostraban una forma aplanada con actina organizada en puntos focales de adhesión y fibras se consideraron como MKs en *spreading*. Se analizaron al menos 100 MKs de 5 réplicas diferentes.

El pugin *Coloc 2 Fiji*, que implementa y realiza la correlación de intensidad de píxeles a través de los métodos de Pearson y Costes, se utilizó para comparar la distribución de la intensidad de fluorescencia de la tubulina α y β 1 en las regiones de interés [ROI]. El valor de R varía de -1 (correlación lineal negativa perfecta) a 1 (correlación lineal positiva perfecta). Costes p-value= 1 indica que la probabilidad de que las imágenes aleatorias se correlacionen con imágenes reales es 0.

Expresión génica y proteica de la tubulina en plaquetas

Las plaquetas del paciente y del control se lavaron en tampón de Tyrode modificado y se prepararon lisados de plaquetas como se describió anteriormente¹¹. Las proteínas plaquetarias se separaron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF mediante el sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, SA, Alcobendas, Madrid, España). Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti- β 1-tubulina (Sigma-Aldrich Madrid, España), anti- β 1-tubulina proporcionado cedido por el Dr. JE Italiano), anti-acetil- α -tubulina (Cell Signaling, #5335), anti- α -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, sc-5546) y anti- β -actina (Sigma-Aldrich) como control interno, seguido de anticuerpos secundarios adecuados marcados con peroxidasa (GEHealthcare). Finalmente, las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (ECL prime; GEHealthcare).

Para la expresión del ARNm, se extrajo el ARN de PRP utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). La reacción de retrotranscripción se realizó con 100 ng de ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SuperScript III First Strand, Thermo Fisher Scientific). La expresión génica se cuantificó en un sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real LC480 (Roche Pharma, Basilea, Suiza) utilizando el kit Taqman Premix Ex Taq (Takara Bio Inc. Kusatsu, Japón) y una sonda comercial para *TUBB* (hs00742828_s1) y *TUBB1* (hs00917771_g1) utilizando *GAPDH* como control interno.

Modelos CHO para el estudio de las variantes *missense*

Para evaluar la patogenicidad de las variantes candidatas, establecimos modelos de células CHO. Se cultivaron células CHO (de European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Reino Unido) en IMDM suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100U/ml y estreptomycin 100µg/ml. Las células se transfectaron transitoriamente usando Turbofect (Fermentas, Thermo Fisher, Milán, Italia) con 2 µg of pcDNA3.1+/C-(K)-DYK-TUBB1-**WT**; pcDNA3.1+/C-(K)-DYK-TUBB1-**Gly269Asp** y pcDNA3.1+/C-(K)-DYK-TUBB1-**Gly109Glu** (GenScript, Leiden, Netherlands). Alternativamente, las células se transfectaron con pcDNA3.1-TUBB1-Arg359-Trp-myc; pcDNA3.1-TUBB1-Thr107Pro-myc; y con pcDNA3.1-TUBB1-Pher260Ser – myc¹² como control interno previamente descrito como patógeno.

Análisis estadístico

Todos los ensayos funcionales se realizaron con muestras de pacientes y al menos 2 controles sanos. Se realizaron comparaciones estadísticas entre diferentes tipos de pacientes y/o controles mediante la prueba T, con significancia al 95%.

2. Figuras Suplementarias

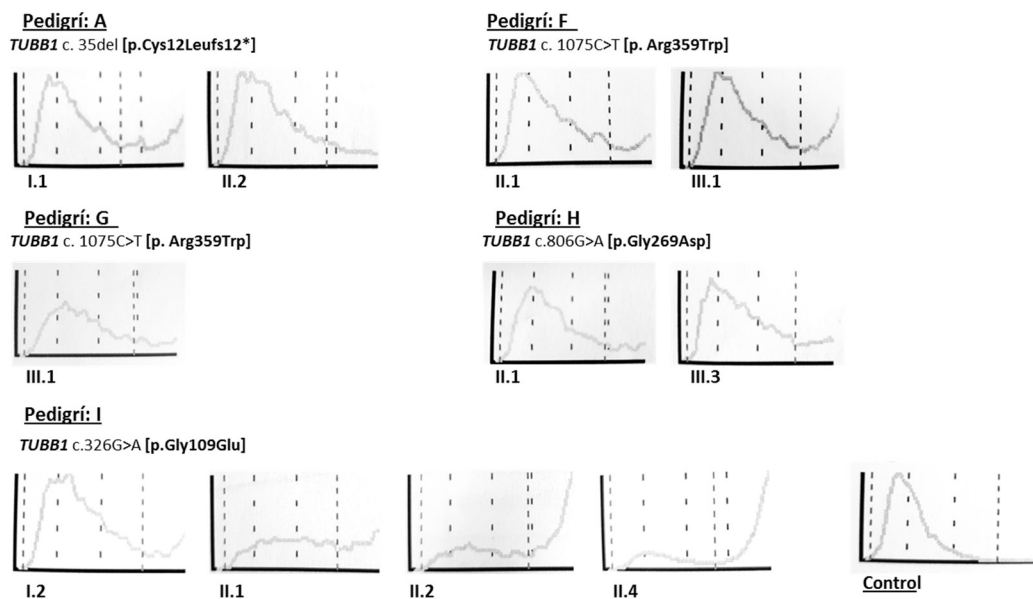


Figura Suplementaria S1. Distribución de tamaño plaquetario heterogéneo en los distintos pedigrís. Los gráficos ilustran la distribución heterogénea del tamaño de las plaquetas en sujetos en los que el contador hematológico no registró el VPM (XS1000i, Sysmex). También se muestra la distribución normal de plaquetas en un control sano.

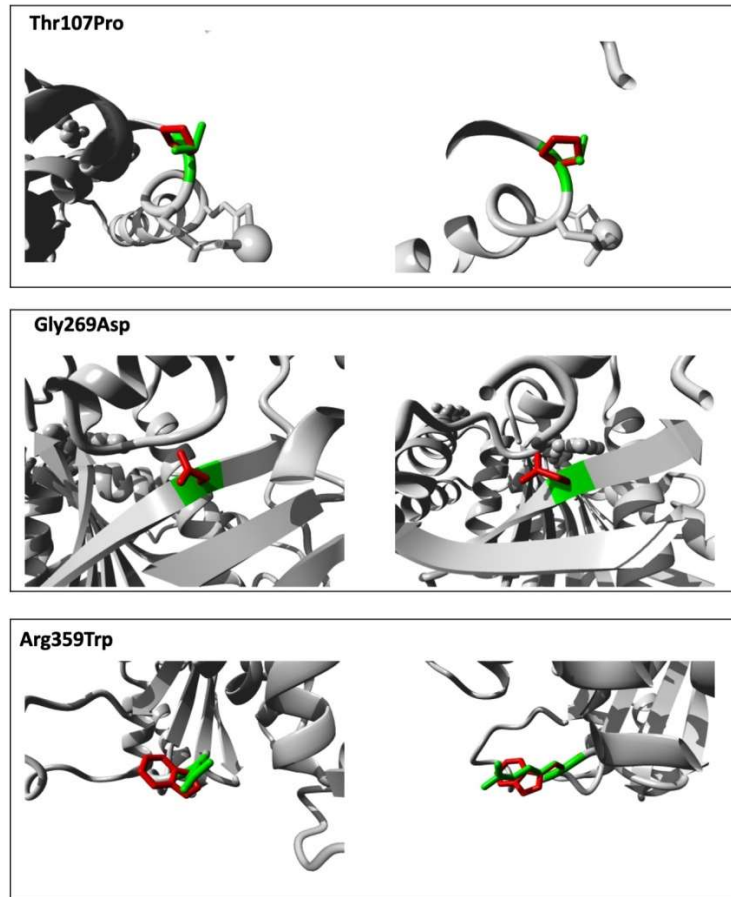


Figura Suplementaria S2. Modelado de la estructura proteica de las variantes *missense* en TUBB1 p.Thr107Pro, p.Gly269Asp y p.Arg359Trp TUBB1. La proteína está coloreada en gris, las cadenas laterales de los residuos wild type se muestran en verde, las cadenas laterales de los residuos mutantes se muestran en rojo. Las imágenes de la derecha y de la izquierda difieren solo por la perspectiva. El modelado se realizó utilizando la herramienta en línea Project HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>).

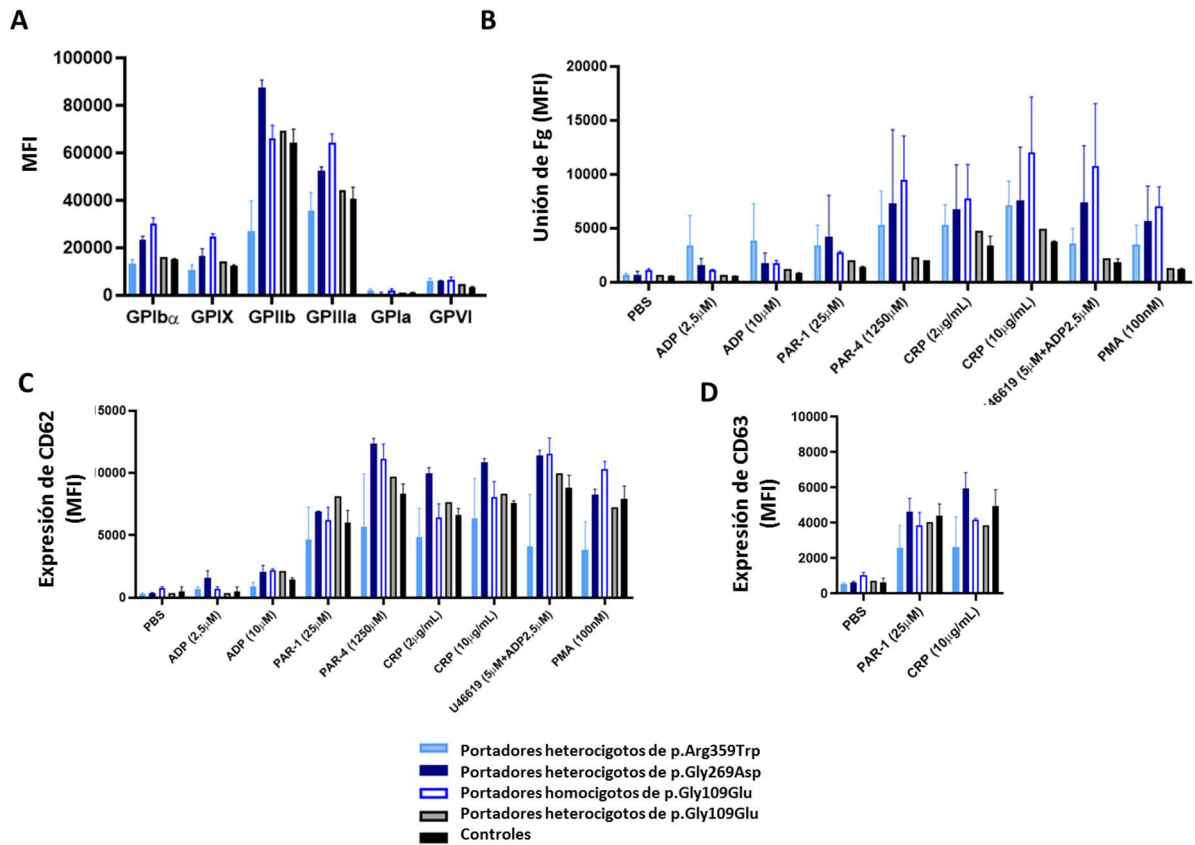


Figura Suplementaria S3. Las variantes missense p.Arg359Trp, p.Gly269Asp y p.Gly109Glu en la tubulina β 1 no alteran la función plaquetaria. A) Los perfiles de expresión de glicoproteínas se evaluaron mediante citometría de flujo en sangre total de portadores del p.Arg359Trp (n=4; pedigrí F: II.1 y III.1; pedigrí G: II.1 y III.1); portadores de p.Gly269Asp (n = 2; pedigrí H: II.1 y II.2); portadores homocigotos de p.Gly109Glu (n=2; pedigrí I:II.1 y II.2), un portador heterocigoto de p.Gly109Glu (Pedigrí I, III.2) y controles sanos (datos combinados de dos sujetos), con anticuerpos marcados con fluorescencia. B-C-D) Unión de fibrinógeno plaquetario y secreción de gránulos. Las plaquetas de pacientes y controles se estimularon en condiciones estáticas durante 30 min a temperatura ambiente con agonista en presencia de B) fibrinógeno-Alexa 488 o C) anticuerpo monoclonal anti-CD62P o D) anti-CD63. Se muestra la intensidad de fluorescencia media [MFI] \pm desviación estándar. Abreviaturas: Fg: fibrinógeno.

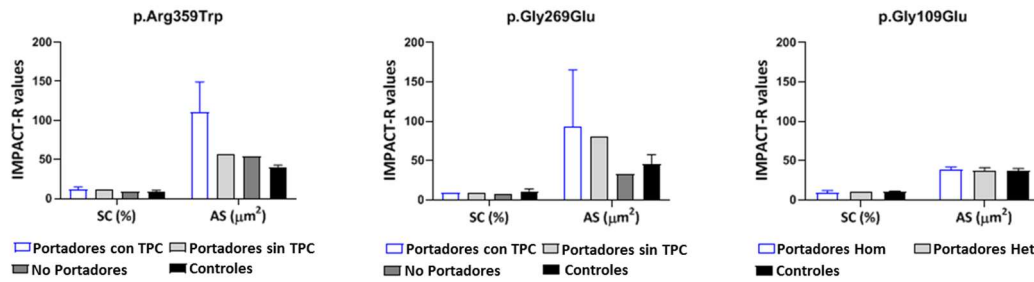


Figura Suplementaria S4. Las variantes missense p.Arg359Trp, p.Gly269Asp y p.Gly109Glu en la tubulina $\beta 1$ no alteran la capacidad de adhesión y agregación plaquetaria evaluadas en el dispositivo Impact-R. Sangre citratada de portadores y no portadores de las variantes de $\beta 1$ -tubulina p.Arg359Trp (pedigrí F: portadores con TCP II.1 y III.1; portadores sin TCP III.2; no portadores III.3), p.Gly269Asp (pedigrí H: portadores con TCP II.1 y II.2; portador sin TCP II.3; no portador II.4), y p.Gly109Glu (pedigrí I: homocigotos con TCP II.1 y II.2, heterocigotos sin TCP II.3 y II.4), y controles sanos no relacionados ($n=2$), se ensayaron con Impact-R como se describió anteriormente. En los gráficos se representa la media \pm desviación estándar de la superficie de la placa cubierta con plaquetas teñidos [% SC] que indica la adhesión de las plaquetas, y el tamaño los agregados adheridos [AS, μm^2] que indica la agregación de las plaquetas. Abreviaturas: TCP indica trombocitopenia; Hom: homocigoto; Het: Heterocigoto.

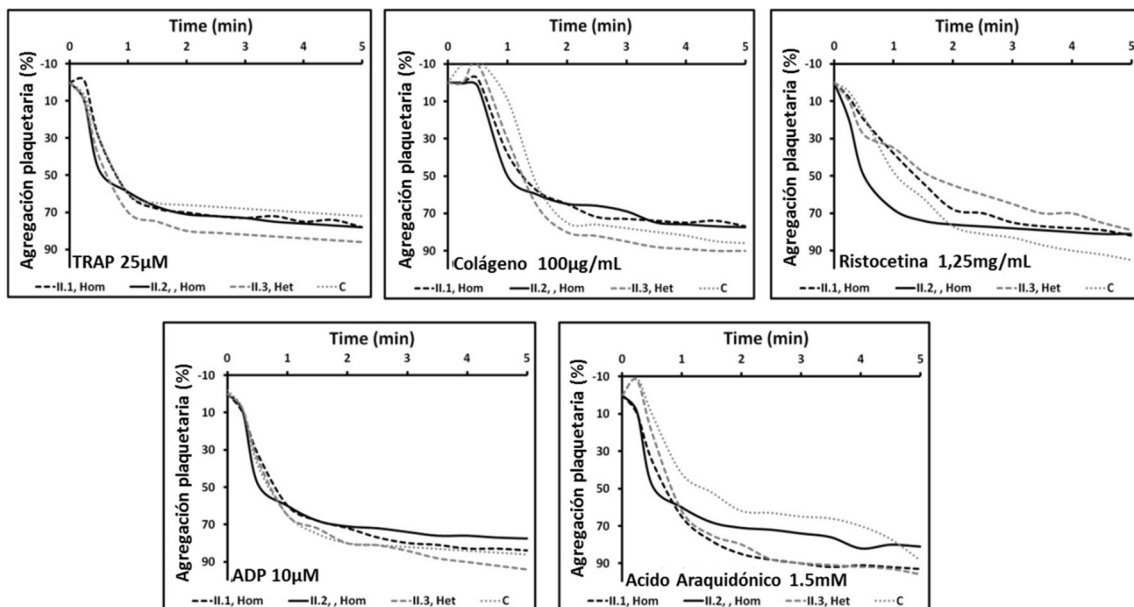


Figura Suplementaria S5. La variante nueva p.Gly109Glu en la $\beta 1$ -tubulina no afecta a la agregación plaquetaria. La agregación plaquetaria en respuesta a los agonistas indicados se indujo a 37 $^{\circ}\text{C}$ en muestras de PRP de portadores de la variante p.Gly109Glu $\beta 1$ (Hom & Het) del pedigrí I, o de sujetos control, y se registró durante 5min. Abreviaturas: Hom: homocigoto; Het: Heterocigoto; C: control.

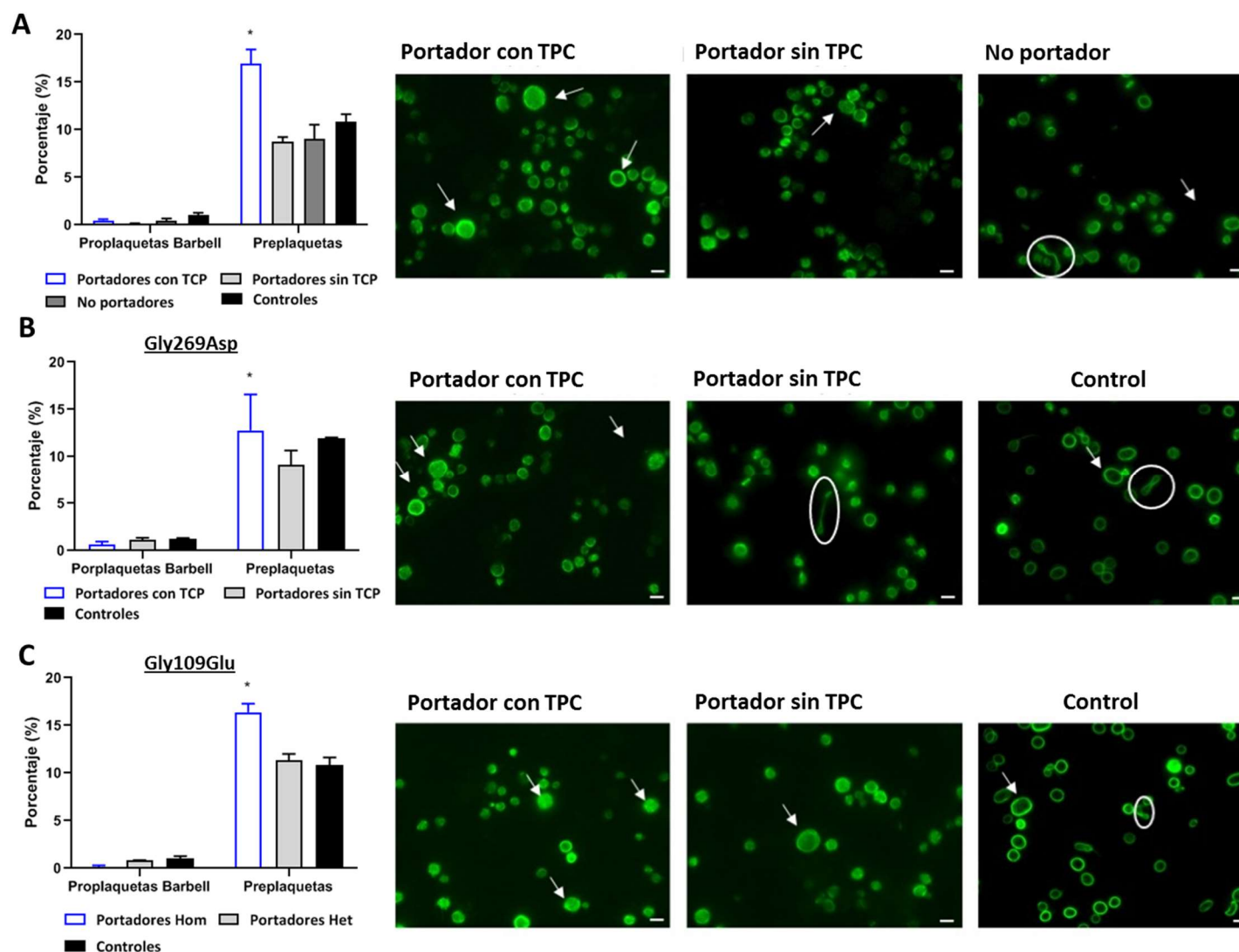


Figura Suplementaria S6. Las variantes *missense* p.Arg359Trp, p.Gly269Asp y p.Gly109Glu en la tubulina $\beta 1$ alteran la conversión de preplaquetas en plaquetas maduras. Las proplaquetas de tipo Barbell y las estructuras con forma de 8 están ausentes en la sangre periférica de portadores con trombocitopenia. Las proplaquetas barbell y las estructuras con forma de 8 están indicadas con círculos en blanco, mientras que las preplaquetas están indicadas con flechas blancas. En las plaquetas se tiñó la $\beta 1$ -tubulina (verde). Las imágenes se

adquirieron en un Carl Zeiss Axio Observer con un objetivo de 100X. Las barras de escala son de 5 μ m. Los gráficos representan media \pm desviación estándar de los valores obtenidos de al menos 10 campos de microscopía diferentes en muestras de pacientes y de control.

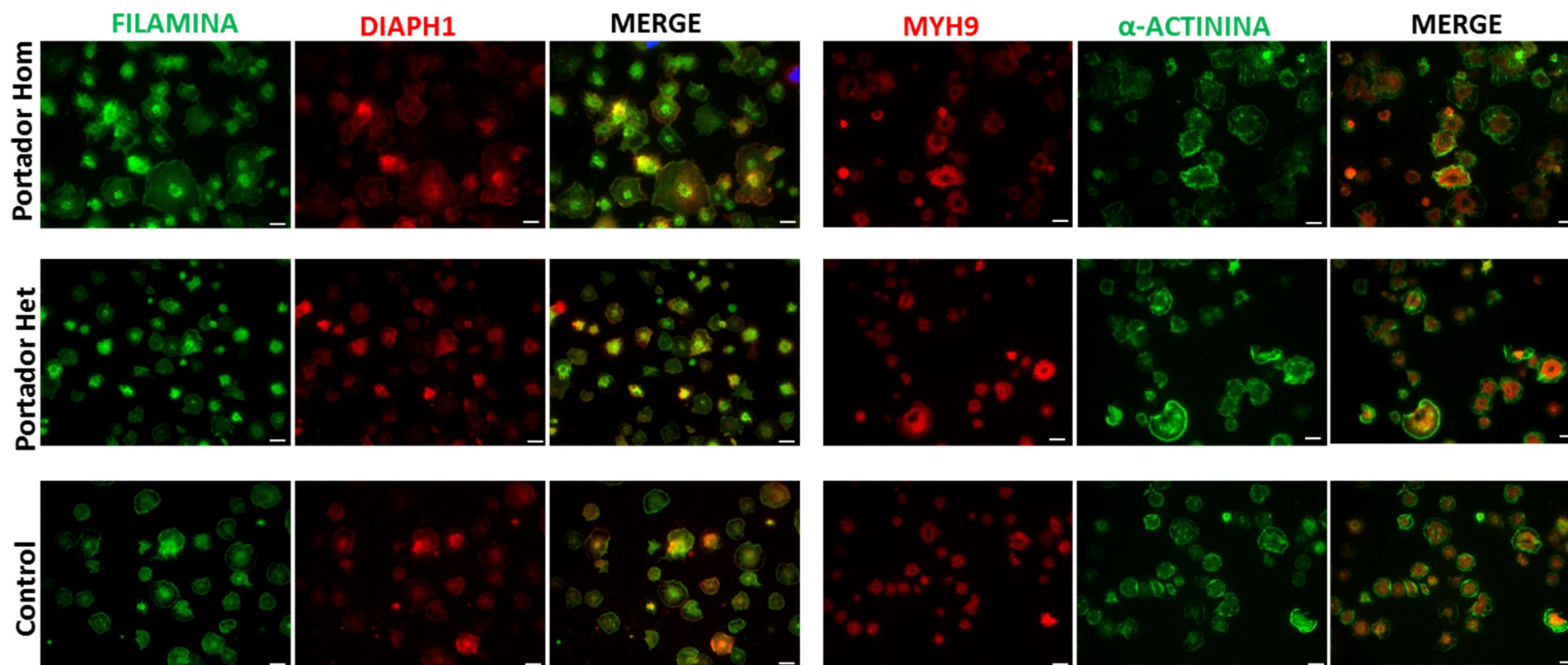


Figura Suplementaria S7. Localización de las proteínas del citoesqueleto en plaquetas en *spreading* de pacientes portadores de la variante p.Gly109Glu. Análisis de inmunofluorescencia de proteínas del citoesqueleto en plaquetas lavadas en *spreading* sobre poli-L-lisina, de portadores de la variante p.Gly109Glu en la β 1-tubulina (Pedigrí G). Las plaquetas se tiñeron con anticuerpos anti-filamina (verde) y DIAPH1 (rojo), o con anticuerpos anti-MYH9 (rojo) y α -actinina (verde). Las imágenes se adquirieron en un Carl Zeiss Axio Observer con un objetivo de 100X. Barras de la escala, 5 μ m.

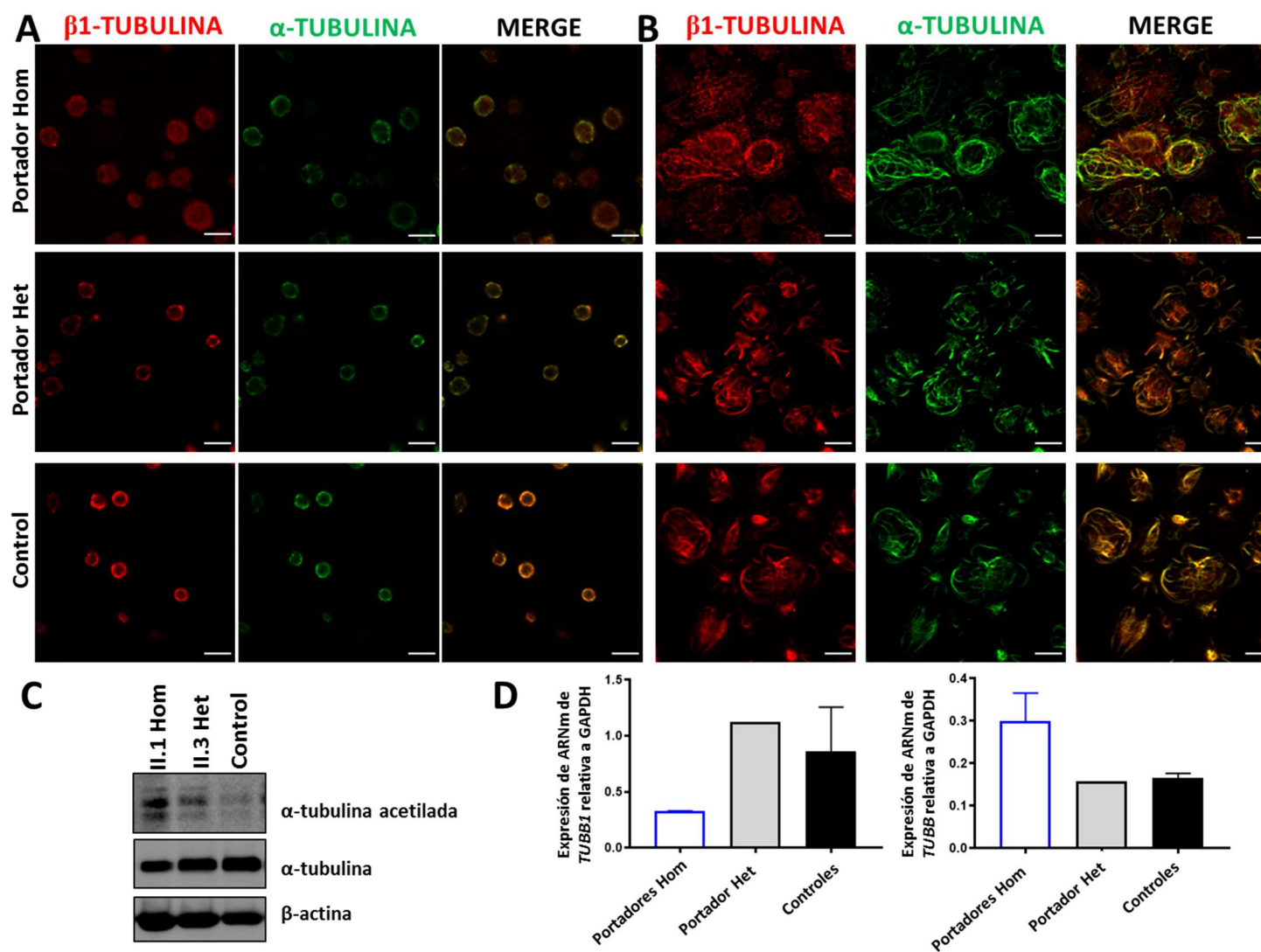


Figura Suplementaria S8. Expresión y localización de tubulinas en plaquetas de portadores de la variante p.Gly109Glu en tubulina β 1. Análisis de inmunofluorescencia de la α -tubulina en plaquetas lavadas (Pedigrí I y control) en condiciones **A)** reposo y **B)** spreading (en poli-L-lisina). Las plaquetas se marcaron con anticuerpos anti- α tubulina (verde) y anti- β 1-tubulina (rojo). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP8 con un objetivo de 63x (ampliación 5x). Las barras de escala son de 5 μ m. **C)** Western blot de los niveles de

tubulina α y tubulina α acetilada en lisados de plaquetas de pacientes (Pedigrí G) y controles; se utilizó β -actina como control de carga. **D)** Niveles de ARNm de TUBB1 y TUBB en plaquetas de pacientes homocigotos ($n=2$) y heterocigotos y de controles (n=3) medidos por qRT-PCR y normalizados con el ARNm de GAPDH.

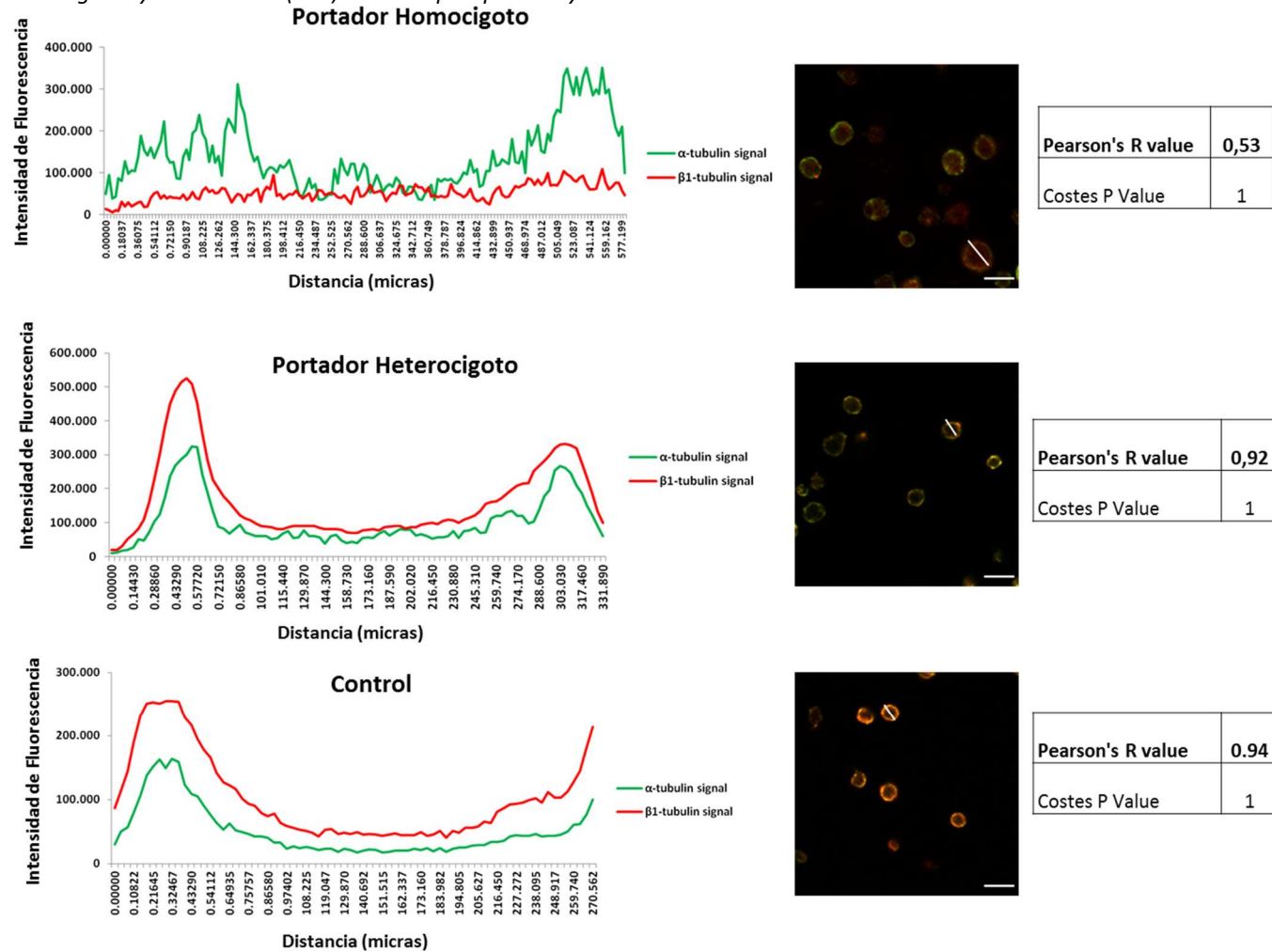


Figura Suplementaria S9. Colocalización de la tubulina α y β 1 en plaquetas en reposo de pacientes con la variante p.Gly109Glu. Superposición de las imágenes de α -tubulina (canal verde) y β 1-tubulina (canal rojo) que muestra colocalización (áreas amarillas) de las isoformas en plaquetas en reposo teñidas con anticuerpos específicos. Los gráficos representan la distribución de la intensidad de la fluorescencia de los canales verde y rojo en las regiones de interés [ROI] indicadas por las líneas blancas. La barra de escala es de 5 μ m y la lente del objetivo es de 63X (aumento de 5X).

3. Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria S1. Genes incluidos y datos de cobertura del panel de genes de HTS para el diagnóstico genético de TPC.

Gen	Cromosoma	Amplicones	Bases totales	Bases cubiertas	Bases perdidas	Cobertura general	Número Exones
MPL	chr1	14	2148	2148	0	1.000	12
RBM8A	chr1	6	645	645	0	1.000	6
USF1	chr1	10	1133	1133	0	1.000	11
LYST	chr1	76	12426	12426	0	1.000	51
GNAI3	chr1	8	1225	1225	0	1.000	8
DHCR24	chr1	11	1731	1731	0	1.000	9
RGS2	chr1	6	736	736	0	1.000	5
F13B	chr1	18	2226	2226	0	1.000	12
PLA2G4A	chr1	19	2590	2590	0	1.000	17
ANKRD26	chr10	3	527	527	0	1.000	promotor
ADRA2A	chr10	6	1418	1408	10	0.993	1
PLAU	chr10	11	1550	1433	117	0.925	11
HPS1	chr10	20	2501	2501	0	1.000	19
HPS6	chr10	10	2348	2331	17	0.993	1
PRF1	chr10	9	1708	1708	0	1.000	2
ANKRD26	chr10	47	5813	5796	17	0.997	35
MASTL	chr10	17	2880	2851	29	0.990	13
FLI1	chr11	13	1591	1591	0	1.000	12
STIM1	chr11	16	2673	2673	0	1.000	15
HPS5	chr11	26	3830	3816	14	0.996	23
FERMT3	chr11	19	2284	2284	0	1.000	15
DPAGT1	chr11	9	1407	1407	0	1.000	9
RASGRP2	chr11	18	2130	2122	8	0.996	15
ANO6	chr12	26	3536	3536	0	1.000	23
A2M	chr12	36	5145	5139	6	0.999	36
ORAI1	chr12	5	952	952	0	1.000	2
VWF	chr12	60	9462	9462	0	1.000	51
ETV6	chr12	10	1519	1519	0	1.000	8
VIPAS39	chr14	19	1862	1862	0	1.000	19
ACTN1	chr14	26	3185	3169	16	0.995	22
MAP3K9	chr14	22	3812	3812	0	1.000	16
BLOC1S6	chr15	5	619	606	13	0.979	5
VPS33B	chr15	23	2314	2314	0	1.000	24
RAB27A	chr15	5	766	766	0	1.000	5
MYO5A	chr15	45	6388	6373	15	0.998	41
PLCB2	chr15	32	4236	4131	105	0.975	34
P2RX1	chr17	16	1440	1440	0	1.000	12
GP1BA	chr17	8	1979	1725	254	0.872	1
ITGA2B	chr17	30	3720	3478	242	0.935	30
ITGB3	chr17	17	2667	2667	0	1.000	15
UNC13D	chr17	34	3913	3633	280	0.928	32

SLFN14	chr17	12	2819	2816	3	0.999	4
MYH10	chr17	48	6864	6864	0	1.000	43
SERPINF2	chr17	11	1666	1617	49	0.971	10
TBXA2R	chr19	7	1333	1165	168	0.874	4
GP6	chr19	12	2023	1799	224	0.889	10
BLOC1S3	chr19	3	629	623	6	0.990	1
STXBP2	chr19	22	2195	2005	190	0.913	21
MLPH	chr2	15	2103	2103	0	1.000	15
ABCG5	chr2	13	2216	2216	0	1.000	13
ABCG8	chr2	15	2282	2000	282	0.876	13
TUBB1	chr20	9	1436	1436	0	1.000	4
GNAS	chr20	29	4294	3882	412	0.904	17
SRC	chr20	15	1831	1831	0	1.000	11
RUNX1	chr21	12	1668	1482	186	0.888	10
GP1BB	chr22	4	661	644	17	0.974	2
HPS4	chr22	17	2413	2413	0	1.000	14
MYH9	chr22	50	6683	6683	0	1.000	40
P2RY1	chr3	5	1142	1142	0	1.000	1
P2RY12	chr3	4	1049	1049	0	1.000	1
GP5	chr3	8	1703	1684	19	0.989	1
GP9	chr3	3	554	546	8	0.986	1
NBEAL2	chr3	64	9345	8923	422	0.955	54
HPS3	chr3	21	3355	3355	0	1.000	17
MECOM	chr3	24	4086	4086	0	1.000	20
PF4	chr4	3	366	366	0	1.000	3
ITGA2	chr5	32	4146	4146	0	1.000	30
AP3B1	chr5	32	3825	3825	0	1.000	28
FYB	chr5	24	2900	2900	0	1.000	20
DIAPH1	chr5	30	4379	4168	211	0.952	28
DTNBP1	chr6	12	1357	1357	0	1.000	12
STX11	chr6	4	884	884	0	1.000	1
PLA2G7	chr6	12	1546	1546	0	1.000	11
F13A1	chr6	15	2479	2479	0	1.000	14
HOXA11	chr7	6	982	982	0	1.000	2
CYCS	chr7	2	358	280	78	0.782	2
GP4	chr7	16	1659	1659	0	1.000	13
TBXAS1	chr7	16	2023	2023	0	1.000	16
SERPINE1	chr7	8	1369	1369	0	1.000	8
GFI1B	chr9	9	1113	1113	0	1.000	6
ABCA1	chr9	50	7766	7766	0	1.000	49
PRKACG	chr9	5	1076	896	180	0.833	1
GNAQ	chr9	8	1220	1220	0	1.000	7
PTGS1	chr9	16	2059	2059	0	1.000	14
ANKRD18A	chr9	22	3299	3277	22	0.993	16
ADAMTS13	chr9	37	4864	4848	16	0.997	31
GATA1	chrX	7	1342	1342	0	1.000	5
WAS	chrX	14	1749	1724	25	0.986	12

FLNA	chrX	61	8884	8687	197	0.978	47
------	------	----	------	------	-----	-------	----

Tabla Suplementaria S2. Estudio *In silico* de la patogenicidad y conservación de las variantes.

Herramienta	Predicción			
	p.Thr107Pro	p.Gly109Glu	p.Gly269Asp	p.Arg359Trp
BayesDel addAF	Damaging	Damaging	Damaging	Tolerated
BayesDel noAF	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
DANN	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
DEOGEN2	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
EIGEN	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Benign
EIGEN PC	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic
FATHMM	Tolerated	Tolerated	Damaging	Damaging
FATHMM-MKL	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
FATHMM-XF	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
LIST-S2	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
LRT	Deleterious	Deleterious	Deleterious	Deleterious
MVP	Benign	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic
MetaLR	Damaging	Damaging	Damaging	Tolerated
MetaSVM	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
MutationAssessor	High	High	High	Medium
MutationTaster	Disease causing	Disease causing	Disease causing	Disease causing
PrimateAI	Tolerated	Tolerated	Tolerated	Tolerated
Provean	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
REVEL	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Benign
SIFT	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
SIFT4G	Damaging	Damaging	Damaging	Tolerated

Herramienta	Conservación			
	p.Thr107Pro	p.Gly109Glu	p.Gly269Asp	p.Arg359Trp
PhyloP	Conserved (score 9.301)	Conserved (score 9.828)	Conserved (score 9.867)	Conserved (score 3.942)
PhastCons	100% conserved (score 1)	100% conserved (score 1)	100% conserved (score 1)	Conserved (score 0.997)

Tabla Suplementaria S3. Clasificación de ACMG de la patogenicidad y frecuencia alélica de las variantes en la tubulina $\beta 1$.

	p.Cys12Leufs12* (rs773248042)	p.Thr107Pro (rs752079894)	p.Gln423* (rs767041023)	p.Arg359Trp (rs140943896)	p.Gly269Asp (rs1293743818)	p.Gly109Glu (rs41303899)
Veredicto actual	Significado incierto	Significado incierto	Probablemente Patogénica	Significado incierto	Significado incierto	Significado incierto
Reglas	PVS1=very strong PP4=supporting ⁵	PP3=supporting PP4=supporting ^{5,13}	PVS1= strong PP4=supporting ⁵ PS3=supporting ¹⁴	PP3=supporting BS1=strong	PM2=supporting PP3=supporting	PP3=supporting BS1=strong
Veredicto revisado	Patogénica	Probablemente Patogénica	Patogénica	Significado incierto	Patogénica	Significado incierto
Reglas	PVS1=very strong PP1=supporting PP4=supporting ⁵	PS3=strong PP1=supporting PP3=supporting PP4=supporting ^{5,13}	PVS1= strong PP1=strong PP4=supporting ⁵ PS3=supporting ¹⁴	PS3=strong PP1=supporting PP3=supporting BS1=strong	PS3=strong PP1=strong PM2=moderate PP3=supporting PP4=supporting	PS3=strong PP1=supporting PP3=supporting BS1=strong
Frecuencia alélica:						
Población general	0.0000318	0.0000477	0.0000119	0.00658	0.00000398	0.000871
Europeos (no finlandesa)	0.0000529	0.0000264	0.000	0.00573	0.000	0.00169
ClinVar Veredicto	Patogénica	-	-	Benigna Probablemente benigna	-	Conflicto en la interpretación de la patogenicidad

ACMG= American College of Medical Genetics and Genomics; Frecuencia de alelos en población general y europea no finlandesa de la base de datos del navegador gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>)(Accedido en mayo de 2021); La información general sobre variantes está disponible en la herramienta web Varsome (<https://varsome.com/>). El veredicto revisado se obtiene después de tomar en consideración los resultados de los estudios funcionales y de co-segregación llevados a cabo en el presente trabajo. Los criterios adaptados de ACMG que aplicamos fueron: **PVS1**: variante nula, “very strong” o “strong” si se encuentra en los dominios N-terminal o C-terminal de la proteína $\beta 1$ -tubulina, respectivamente; **PP3 supporting**: las predicciones computacionales in silico apoyan un efecto deletéreo sobre TUBB1 o la proteína $\beta 1$ -tubulina; **PP4 supporting**: el fenotipo del paciente o los antecedentes familiares son específicos de una enfermedad con una única etiología genética, individuos con macrotrombocitopenia leve, casi asintomática, portadores de una variante de TUBB1 se han reportado en la referencia que se indica; **PS3**: Estudios funcionales in vitro o in vivo apoyan un efecto deletéreo sobre TUBB1 o la proteína $\beta 1$ -tubulina, “strong” si los estudios en plaquetas de pacientes y/o modelos celulares corroboran la alteración de la expresión y/o función de $\beta 1$ -tubulina; **PP1**: Co-segregación de la variante con la enfermedad, es decir, macrotrombocitopenia, en miembros de la familia, “strong” si la segregación es en el probando y en ≥ 3 parientes afectados, “moderate” si la segregación en el probando más ≥ 2 parientes afectados, “supporting” si la segregación en el probando y en ≥ 1 pariente afectado; **PM2 moderate**: se encuentra en ≤ 2 alelos en todas las cohortes de población de gnomAD y no está presente en homocigosidad; **BS1 strong**: frecuencia de alelos del exoma de GnomAD $> 0,000714$, un umbral derivado de las 46 variantes informadas clínicamente en el gen TUBB1 (<https://varsome.com/>). Se muestra la interpretación actual de las variantes en ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/>; consultado en mayo de 2021).

Tabla Suplementaria S4. Resumen de los datos clínicos y de laboratorio de las variantes en *TUBB1*.

Variante, herencia y técnica molecular	Cambio de aminoácido y domino	Recuento y tamaño plaquetario	Clínica y fenotipo plaquetario	Niveles de β 1-tubulina & otras tubulinas	Microscopía de plaquetas (IF & ME)	Cultivo de Mks & formación de proplaquetas	Modelo celular transfectado	Nuevas funciones de la β 1 tubulina & patologías	Referencia
c.952C>T Dominante SS de exones	Arg318Trp Región intermedia	40-60x10 ⁹ /L. FS con plaquetas gigantes.	MTP. No alteraciones en médula ósea. GPs normal.	50% reducción en los niveles de tubulina β 1.	Tubulina β 1 presente en la banda marginal. ME sin alteraciones.	Derivados de CD34 ⁺ : Defecto en la formación de proplaquetas.	No incorporación de la tubulina β 1 en microtúbulos de células CHO.	-	15,16
c.952C>T Dominante WES	Gln423* Región C-Terminal	60x10 ⁹ /L FS con plaquetas grandes ¹⁴ . ----- 115-130x10 ⁹ /L Con plaquetas grandes (este estudio).	MTP No evaluado.	No evaluado.	IF: banda marginal de β 1-tubulin ausente ¹⁴ . ME: plaquetas grandes y redondeadas ¹⁴ .	No evaluado.	No evaluado.	-	5,14 Este estudio
c.779T>C Dominante SS de exones	Phe260Ser Región intermedia	100x10 ⁹ /L FS con plaquetas gigantes.	MTP No evaluado.	Niveles de tubulina β 1 y α reducidos.	IF: Banda marginal de tubulina β 1ausente. ME: plaquetas grandes y redondeadas con menos microtúbulos.	Células de hígado fetal murino transducidas con tubulina β 1y diferenciadas a Mks: Defecto en la formación de proplaquetas.	No incorporación de la tubulina β 1 en microtúbulos de células CHO. Núcleos alterados y niveles reducidos de tubulina α .	-	12
c.479C>T Recesivo WES en una familia con patología en el tiroides.	Pro160Leu Región N-Terminal	180-250x10 ⁹ /L. FS con plaquetas normales y algunas grandes.	Hipotiroidismo congénito. Función plaquetaria normal o incrementada (LTA/PAC1).	Niveles de tubulina β 1 reducidos y de tubulina α normales.	IF: No evaluado. ME: plaquetas grandes y redondeadas.	Derivados de CD34 ⁺ : Defecto en la formación de proplaquetas.	No incorporación de la tubulina β 1 en microtúbulos de la línea Nthy.	Participa en la diferenciación del tiroides, y en la secreción hormonal. <u>Hipotiroidismo congénito.</u>	17
c.318C>T Dominante NGS en una serie de patología del tiroides.	Tyr106* Región N-Terminal	207x10 ⁹ /L. FS con plaquetas normales y algunas grandes.	Hipotiroidismo congénito. Función plaquetaria normal o incrementada (LTA/PAC1).	Niveles de tubulina β 1 reducidos y de tubulina α normales.	IF: No evaluado. ME: No evaluado.	Derivados de CD34 ⁺ : Defecto en la formación de proplaquetas.	No evaluado.	Participa en la diferenciación del tiroides, y en la secreción hormonal. <u>Hipotiroidismo congénito.</u>	17
c.35delG Dominante NGS en una serie	Cys12Leufs*12 Región N-Terminal	220-270x10 ⁹ /L. FS con plaquetas grandes y algunas	Hipotiroidismo congénito ¹⁷ . Función	Niveles de tubulina β 1 reducidos y de	IF: No evaluado. ME: plaquetas grandes y redondeadas.	No evaluado.	No evaluado.	Participa en la diferenciación del tiroides, y en la	5,17 Este estudio

de patología del tiroides.		normales. 65-153 270x10 ⁹ /L (<i>Este estudio</i>)	plaquetaria normal o incrementada (LTA/PAC1) ¹⁷ .	tubulina α normales.				secreción hormonal. Hipotiroidismo congénito. Nuestros pacientes no presentan esta patología.	
c.445A>C Dominante WES	Thr149Pro Región N-Terminal	30-60x10 ⁹ /L.	TP y neoplasia mieloide. No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	Células de hígado fetal murino transducidas con tubulina β1y diferenciadas a Mks: Defecto en la formación de proplaquetas.	No incorporación de las tubulinas β1 y α en los microtúbulos de a) Mks derivados de células de hígado murino fetal transducidas con la tubulina β1, y b) la línea CMK11-5	Asociada a Resistencia a apoptosis y a inestabilidad genómica. Neoplasia mieloide.	18
c.752G>A Dominante WES	Arg251His Región intermedia	88x10 ⁹ /L.	TP No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	Células de hígado fetal murino transducidas con tubulina β1y diferenciadas a Mks: Defecto en la formación de proplaquetas.	No incorporación de las tubulinas β1 y α en los microtúbulos de a) Mks derivados de células de hígado murino fetal transducidas con la tubulina β1, y b) la línea CMK11-5	-	18
c.436G>A Dominante NGS	Gly146Arg Región N-Terminal	96-120x10 ⁹ /L. FS con plaquetas normales y algunas grandes.	Trombastenia de Glanzmann con MTP. Disfunción plaquetaria y ausencia de αIIbβ3	No evaluado.	IF: No evaluado. ME: plaquetas grandes y redondeadas.	No evaluado.	No evaluado.	-	19
c.726C>G Dominante WES	Phe242Leu Región intermedia	119x10 ⁹ /L.	TP Hematomas cutáneos. No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	-	20
c.721C>T Dominante WES	Arg241Trp Región intermedia	104-133x10 ⁹ /L.	Epistaxis, menorragia y hemorragia post parto. No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	-	20
c.1080_1081insG Dominante WES	Leu361Ala fs*19 Región intermedia	11x10 ⁹ /L.	TP Hematoma cutáneos. No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	-	20

c.806G>A Dominante NGS	Gly269Asp Región intermedia	82-133x10 ⁹ /L.	MTP. Expresión de GPs y función plaquetaria normal.	Niveles de tubulina β1 reducidos.	IF: Banda marginal de tubulina β1 alterada. ME: No evaluado.	Derivados de CD34 ⁺ : Defecto en la formación de proplaquetas.	No incorporación de la tubulina β1 en microtúbulos de células CHO.	-	Este estudio
c.319A>C Dominante NGS	Thr107Pro Región N-Terminal	85-110x10 ⁹ /L.	MTP. No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No evaluado.	No incorporación de la tubulina β1 en microtúbulos de células CHO.	-	5 Este estudio
c.326G>A Recesiva NGS	Gly109Glu Región N-Terminal	60 x10 ⁹ /L. FS con plaquetas normales y algunas plaquetas grandes y gigantes.	MTP. Expresión de GPs y función plaquetaria normal.	β1-tubulin no detectable y niveles normales de tubulina α, DIAPH1, filamina y actinina α.	IF: Tubulina β1-tubulin en plaquetas y Mks en reposo/spreading. ME: grandes y redondeadas con un sistema canalicular abierto e incrementado.	Derivados de CD34 ⁺ : Defecto en la formación de proplaquetas.	No incorporación de la tubulina β1 en microtúbulos de células CHO.	-	21 Este estudio
c. 1075C>T Dominante NGS	Arg359Trp Región intermedia	60 x10 ⁹ /L.	MTP. Expresión de GPs y función plaquetaria normal.	Niveles de tubulina β1 normales.	IF: banda marginal de tubulina β1 alterada. ME: no evaluada.	Derivados de CD34 ⁺ : Defecto en la formación de proplaquetas.	Alterada incorporación de la tubulina β1 en microtúbulos de células CHO.	-	5 Este estudio

SS=Secuenciación de Sanger; WES=whole exome sequencing; NGS= next generation sequencing; MTP=macrotrombocitopenia; TP=trombocitopenia; FS=frotis de sangre; IF=inmunofluorescencia; ME=microscopía electrónica; LTA=agregometría por transmisión de luz; Mks=megacariocitos; CHO= Chinese hamster ovary cells; GPs= glicoproteínas.

4. Referencias

1. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:213.
2. Momi S, Pitchford SC, Alberti PF, et al. Nitroaspirin plus clopidogrel versus aspirin plus clopidogrel against platelet thromboembolism and intimal thickening in mice. *Thromb. Haemost.* 2005;93(3):535–543.
3. Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, et al. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica.* 2003;88(5):582–592.
4. Noris P, Klersy C, Gresele P, et al. Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune thrombocytopenia: a multicentric, real life study. *Br. J. Haematol.* 2013;162(1):112–119.
5. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2018;103(1):148–162.
6. Bury L, Malara A, Momi S, et al. Mechanisms of thrombocytopenia in platelet-type von Willebrand disease. *Haematologica.* 2019;104(7):1473–1481.
7. Bury L, Malara A, Gresele P, Balduini A. Outside-in signalling generated by a constitutively activated integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ impairs proplatelet formation in human megakaryocytes. *PLoS One.* 2012;7(4):e34449.
8. Shenkman B, Savion N, Dardik R, Tamarin I, Varon D. Testing of platelet deposition on polystyrene surface under flow conditions by the cone and plate(let) analyzer: role of platelet activation, fibrinogen and von Willebrand factor. *Thromb. Res.* 2000;99(4):353–361.
9. Caparrós-Pérez E, Teruel-Montoya R, Palma-Barquero V, et al. Down regulation of the Munc18b-syntaxin-11 complex and $\beta\text{1-tubulin}$ impairs secretion and spreading in neonatal platelets. *Thromb. Haemost.* 2017;117(11):2079–2091.
10. Bury L, Zetterberg E, Leinøe EB, et al. A novel variant Glanzmann thrombasthenia due to co-inheritance of a loss- and a gain-of-function mutation of ITGB3: evidence of a dominant effect of gain-of-function mutations. *Haematologica.* 2018;103(6):e259–e263.
11. Hughes CE, Pollitt AY, Mori J, et al. CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood.* 2010;115(14):2947–2955.
12. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.* 2014;92(4):276–282.
13. Jiang M SG, Yin J, Wang X, Yu Z RC. Refractory Thrombocytopenia with TUBB1 Variants: Clinical Features and Responses to Eltrombopag Treatment [abstract PB 1442]. *Res Pr. Thromb Haemost.* 2020;
14. Fiore M, Goulas C, Pillois X. A new mutation in TUBB1 associated with thrombocytopenia confirms that C-terminal part of $\beta\text{1-tubulin}$ plays a role in microtubule assembly. *Clin. Genet.* 2017;91(6):924–926.
15. Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the $\beta\text{1-tubulin}$ gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood.* 2009;113(2):458–461.
16. Hou Y, Shao L, Zhou H, et al. Identification of a pathogenic TUBB1 variant in a Chinese family with congenital macrothrombocytopenia through whole genome sequencing. *Platelets.* 2021;1–5.
17. Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, et al. TUBB 1 mutations cause thyroid dysgenesis

- associated with abnormal platelet physiology . *EMBO Mol. Med.* 2018;10(12):1–18.
18. Matsumura T, Nakamura-Ishizu A, Takaoka K, et al. TUBB1 dysfunction in inherited thrombocytopenia causes genome instability. *Br. J. Haematol.* 2019;185(5):888–902.
 19. Guillet B, Bayart S, Pillois X, et al. A Glanzmann thrombasthenia family associated with a TUBB1-related macrothrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.* 2019;17(12):2211–2215.
 20. Johnson B, Lowe GC, Futterer J, et al. Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica.* 2016;101(10):1170–1179.
 21. Downes K, Megy K, Duarte D, et al. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood.* 2019;134(23):2082–2091.

Capítulo IV

Ampliación del espectro genético del desorden RUNX1-RD y comprensión de su presentación clínica a través del perfil transcriptómico de pacientes con RUNX1-RD.

Capítulo IV: Ampliación del espectro genético del desorden RUNX1-RD y comprensión de su presentación clínica a través del perfil transcriptómico de pacientes con RUNX1-RD.

1. Introducción

Las Trombocitopenias Congénitas [TC] son un grupo genéticamente heterogéneo de trastornos raros que se caracterizan principalmente por una reducción del recuento de plaquetas, a veces acompañada de diátesis hemorrágica¹. Hasta la fecha, se han identificado más de 40 formas de TC como resultado de alteraciones genéticas en al menos 50 genes^{1,2}. El descubrimiento de nuevas formas de TC ha revelado nuevos genes causantes de enfermedades y ha arrojado luz sobre el mecanismo molecular que controla la megacariopoyesis y la trombopoyesis. Así, las TC pueden actualmente clasificarse atendiendo al mecanismo de patogenicidad que subyace, con variantes moleculares que afectan a genes implicados en las diferentes etapas de la biogénesis plaquetaria, es decir la diferenciación de Mks, la maduración de Mks, la formación de pro-plaquetas y la liberación de plaquetas al torrente sanguíneo^{1,3}.

Tradicionalmente, el diagnóstico y la investigación de las TC asintomáticas no ha sido un objetivo prioritario de los hematólogos, ya que generalmente se pensaba que esta información carecía de relevancia en el manejo clínico del paciente. Sin embargo, el descubrimiento de nuevas formas de TC cuya repercusión clínica puede incluir un riesgo alto de desarrollo de patologías más graves como aplasia medular, insuficiencia renal o neoplasias hematológicas⁴, ha reforzado la trascendencia del diagnóstico precoz de los TC y de un adecuado seguimiento clínico de estos pacientes⁵. El diagnóstico temprano es particularmente relevante en el subgrupo de TC causadas por mutaciones en factores de transcripción, como *RUNX1*, *FLI1*, *GATA-1*, *GFI1B* y *ETV6*, que controlan las primeras etapas de maduración de megacariocitos. Cada uno de estos factores de transcripción funciona, en coordinación con otros, como activador o represor de la expresión de múltiples genes hematológicos. Por ello, mutaciones en estas proteínas pueden predisponer a desarrollar neoplasias mieloides o linfoides, un fenómeno que se describió por primera vez para la TC causada por mutaciones en *RUNX1*⁶.

RUNX1 (factor de transcripción relacionado con Runt-1), también conocido como *core binding factor α2* (CBFα2) o *acute myeloid leukaemia 1* [AML1], es uno de los tres miembros de la familia RUNX en mamíferos. *RUNX1*, codificado por el gen *RUNX1*, es un factor transcripcional clave que controla la expresión de múltiples genes a través de su dimerización con CBFβ^{7,8}. Durante la embriogénesis, *RUNX1* regula la hematopoyesis humana definitiva y la alteración bialélica de *RUNX1* produce letalidad

embrionaria debido a hemorragias intracraneales⁹. En la hematopoyesis del adulto, *RUNX1* también es crucial para la maduración y diferenciación de los linajes mieloide (megacariocítico y eritroide) y linfoide^{6,8,10}. Se han caracterizado tres isoformas principales (1A, 1B y 1C), siendo la isoforma 1C (480 aminoácidos) la que se expresa predominantemente en las células hematopoyéticas¹¹. En el contexto clínico, el gen *RUNX1* se ha convertido en uno de los genes mutados con mayor frecuencia en una variedad de neoplasias hematológicas. Por un lado, las mutaciones somáticas en *RUNX1* se identifican en varios tipos de cánceres como la leucemia mieloide aguda [LMA], la leucemia linfobásica aguda [LLA] y los síndromes mielodisplásicos [SMD]. Por otro lado, las mutaciones de la línea germinal en *RUNX1* causan un trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia mieloide aguda [FPD/AML] (OMIM # 601399). FPD/AML es un trastorno autosómico dominante caracterizado por trombocitopenia moderada con VPM normal, disfunción plaquetaria variable y riesgo de desarrollar neoplasias hematológicas malignas, principalmente LMA y SMD en el 30% de los pacientes^{8,10,12}. En la genética de FPD/AML, la mayoría de las variantes causan una pérdida de función o un efecto dominante-negativo. Dada la alta predisposición a sufrir un cáncer hematológico, su diagnóstico molecular precoz es crucial para un mejor manejo y seguimiento clínico de los pacientes.

Como en la mayoría de TC, el diagnóstico de la enfermedad relacionada con *RUNX1* está difícilmente guiado por el fenotipo del enfermo, haciendo que el análisis genético sea determinante. En este sentido, la aparición y el uso cada vez más frecuente de las técnicas de HTS, ha facilitado mucho el diagnóstico genético de las TC^{13,14}. Hasta la fecha, se han identificado más de 100 mutaciones de la línea germinal en *RUNX1* asociadas con trombocitopenia y predisposición a neoplasias hematológicas malignas¹⁵. Pese a la mayor facilidad en la detección de variantes en *RUNX1* con el uso de HTS, un aspecto que continúa siendo difícil y crítico es la adecuada valoración de la patogenicidad de las variantes nuevas de *RUNX1*. Para un diagnóstico molecular definitivo y fiable de enfermedad relacionada con *RUNX1*, es necesario demostrar el efecto deletéreo de las variantes candidatas nuevas. Está bien reconocido que sobrestimar la patogenicidad de variantes moleculares nuevas, en *RUNX1* y otros genes, podría ser incluso más negativo para el manejo clínico y la calidad de vida de los pacientes afectados que la falta de un diagnóstico^{16,17}. Además, la identificación de nuevas mutaciones potencialmente asociadas al cáncer, tiene importantes consideraciones éticas. Informar al paciente de que es portador de una mutación que predispone al desarrollo de leucemia, puede tener un fuerte impacto psicológico negativo en el enfermo que puede no es compensado por un potencial beneficio del manejo clínico¹⁷.

En el presente estudio, hemos investigado el efecto deletéreo de tres variantes nuevas (c.802C>T [p.Gln.268*], c.586A>G [p.Thr196Ala] y c.476A>G; [p.Asn159Ser] en *RUNX1* identificadas con mediante HTS de un panel de genes, en tres familias españolas no

emparentadas con TC. Aunque confirmar la patogenicidad de las variantes de *RUNX1* constituye un auténtico desafío, aquí postulamos que el análisis de transcriptoma plaquetario podría convertirse en una herramienta útil y coste-efectiva para la identificación de variantes deletéreas de *RUNX1*. La caracterización completa de estas variantes nuevas en *RUNX1* contribuye a la ampliación del espectro genético de este tipo de TC.

2. Materiales y Métodos

Pacientes, muestras de sangre y purificación de ADN

En el presente estudio participaron 3 familias españolas no emparentadas con sospecha de trombocitopenia congénita reclutadas en el proyecto multicéntrico “Caracterización funcional y molecular de pacientes con trastornos plaquetarios hereditarios”, que cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia y con el patrocinio científico de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Se extrajeron muestras de sangre venosa de los pacientes, y de controles sanos estudiados en paralelo, en tubos de K3 EDTA al 7,5% (para hemograma, frotis de sangre, purificación de ácido nucleico y, aislamiento de células CD34⁺ y cultivos de MK) y en tubos de citrato de sodio tamponado 0,105 M (para estudios de función plaquetaria). Los hemogramas de estas muestras, se realizaron en un contador hematológico Sysmex® XS1000i (Sysmex España SL, Sant Just Desvern, España). El ADN genómico se aisló de las muestras de sangre periférica utilizando el kit *DNeasy blood and tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración de ADN se cuantificó usando un fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Estudios de función plaquetaria

La expresión de GPs de superficie plaquetaria, la unión de fibrinógeno inducida por agonistas y la secreción de gránulos α y δ (CD62 y CD63, respectivamente) se evaluaron mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo detallado en el Capítulo I^{18,19}. La LTA se realizó en muestras de PRP usando un agregómetro Aggrecoorder II (Menarini Diagnostics, Florencia, Italia), como se describe en el Capítulo I²⁰. Los agonistas plaquetarios empleados fueron: 25 μ M PAR1p (también conocido como TRAP), 5 μ M ADP, 2-5 μ g/mL CRP, 2-10 μ g/mL colágeno y 1.25 mg/mL ristocetina.

Análisis molecular con un panel de genes de HTS

El análisis del ADN de los pacientes de las familias A y C se llevó a cabo utilizando HTS de un panel de genes detallado en el **Capítulo III**. Los pacientes de la familia B fueron reclutados antes y para su estudio molecular usamos un panel de genes descrito previamente y una plataforma Illumina (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Esos paneles

incluyen 70 a 90 genes implicados en TPC. En ambos casos, la selección y anotación de variantes moleculares se realizó utilizando una pipeline propia, basada en las herramientas informáticas VarScan v2.3.9, SAMTools v1.3.1, ANNOVAR, Ensembl-VEP v99 y dbNFSP v4.0a. También hicimos un análisis adicional de las variantes utilizando DIGEVAR “Discovering Genetic Variants”, una herramienta web desarrollada por nosotros para el análisis de datos de HTS (<https://digevar.imib.es>), que se describe en el Capítulo III.

Secuenciación de Sanger

La confirmación de las variantes identificadas por HTS en los casos índice y su segregación en las familias, se realizó mediante secuenciación Sanger en un secuenciador automático ABI 3130. Los *primers* u oligonucleótidos cebadores de las PCRs se diseñaron usando la plataforma web ExonPrimer (<https://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>); Las secuencias de los productos de PCR se analizaron con el software MutationSurveyor disponible en SoftGenetics (<http://www.softgenetics.com/mutationSurveyor.php>).

Evaluación de gránulos densos

El contenido de los gránulos densos se evaluó mediante microscopía electrónica utilizando el método conocido como “*Whole Mount*”. Brevemente, se colocó una gota de PRP sobre rejillas ultrafinas de carbon níquel (ref, casa comercial). Después de 15-30s, las rejillas se lavaron y se secaron al aire. Las rejillas, sin ninguna otra manipulación, se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL. Los gránulos densos se distinguen en estas preparaciones como puntos intensamente negros debido a su alto contenido de calcio. El promedio de gránulos densos por plaqueta se determinó evaluando al menos 10 plaquetas en 10 campos diferentes. El análisis estadístico con la prueba T se realizó utilizando el software GraphPad Prism V7.00 (California, Estados Unidos), estableciendo la diferencia con significación estadística en un valor de $p \leq 0.05$ (*).

Purificación de plaquetas ultrapuras

Obtuvimos plaquetas ultrapuras a partir de muestras de sangre de de sujetos sanos ($n = 5$) y de los pacientes (P1, P2 y P3), usando un protocolo previamente²¹. Brevemente, las muestras de sangre se centrifugaron (140 x g, 10 min) para obtener un PRP que se sometió a leucodeplección mediante filtración (PL1BE, Haemonetics, Braintree, MA), seguido de separación celular magnética usando Dynabeads para CD45 y CD235 (Miltenyi Biotec, Madrid, España). Los eritrocitos contaminantes se lisaron mediante un choque hipotónico de 1 min con solución salina al 0,2%. Las suspensiones de plaquetas inmunodeplecionadas de CD45 y CD235, se separaron en dos alícuotas, se

centrifugaron a 6.000 x g y los pellets resultantes se almacenaron a -80°C hasta el aislamiento de ARN y proteína.

El ARN total se aisló de plaquetas ultrapuras con el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se midió con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y la integridad del ARN se evaluó con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La contaminación residual de leucocitos en estas preparaciones de plaquetas ultrapuras fue descartada en evaluaciones previas del procedimiento ²¹.

Microarray

Las muestras de ARN plaquetario de los 3 probandos (P1, P2 y P3) y controles (n= 5) se enviaron al Servicio central de Biología Molecular de la Universidad de Murcia (Murcia, España). Para cada muestra se sintetizó ss-cDNA a partir de 5ng de ARN total utilizando el *GeneChip WT Pico Reagent kit* (Affymetrix ThermoFisher Scientific, P/N 703262). Las moléculas de ss-cDNA fueron fragmentadas y etiquetadas en el extremo terminal. 5,5 µg del ss-DNA fragmentado y biotinilado se incluyeron en la mezcla de hibridación, *GeneChip Hybridization, Wash and Stain* (Affymetrix ThermoFisher Scientific, P/N 900720) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las preparaciones resultantes se hibridaron con el [®] Clariom D human Array (Affymetrix, ThermoFisher Scientific, P / N 902922) con más de 540.000 transcritos y 6.765.000 sondas que proporcionan una cobertura del transcriptoma completo.

Datos del microarray, análisis de rutas biológicas y de enriquecimiento de genes

El potencial efecto deletéreo de las variantes en *RUNX1* identificadas en los pacientes, se evaluó a través de la comparación del perfil del transcriptómico de pacientes y controles. Para eso, los datos del microarray se procesaron usando el *Affymetrix Expression Comand Console* (Affymetrix) y el análisis de datos se realizó con RMA (Robust Multiarray Average) permitiendo que los valores de intensidad crudos se corrijan, se transformen en log2 y se normalicen para obtener un valor de intensidad individual para cada conjunto de sondas.

Tras esto, las señales de RMA normalizadas de nuestros pacientes individuales (P1, P2 y P3) se compararon con la mediana de las señales RMA de los controles (n=5) considerando 15 genes previamente reconocidos como diana de *RUNX1*²²⁻²⁶, y 100 genes descritos previamente como infraexpresados en un paciente con *RUNX1-RD*²⁷. Utilizamos el software R para realizar un análisis de componentes principales [PCA] y un análisis de cluster jerárquico informativos de la distribución y agrupamiento de las muestras. Para ello, las señales de intensidad del array de todos los pacientes y controles se evaluaron considerando los mencionados 15 genes diana o los 100 genes

regulados negativamente. Después de confirmar el diagnóstico de RUNX1-RD en los pacientes P1 y P2, el nivel de expresión génica de las 15 dianas se representó en un *heatmap* (niveles más bajos en verde y niveles más altos en rojo).

Para obtener las listas de genes supra e infraexpresados entre los pacientes RUNX1 (P1 y P2) y los controles (n=5), se realizó un análisis estadístico ANOVA (prueba T) con el *software TAC* (Transcriptome Analysis Console 3.0, Affymetrix, ThermoFisher Scientific). El punto de corte aplicado a los resultados de ANOVA fue un *fold change* > 2 en la expresión génica y un nivel de significación de $p < 0,05$. Para identificar posibles vías biológicas que pueden presentar diferencias funcionales en la patología de *RUNX1*, aplicamos el análisis de *software Partek Genomics Suite* y *Partek Pathways* (Partek Incorporated, St. Louis, EE. UU.), que está vinculado a la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes), a la lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0,05$). Las rutas biológicas alteradas obtenidas en este análisis se ordenaron según el valor de *enrichment score*. Mostramos también la posición de la vía alterada en la lista global, el p-value del enriquecimiento, los genes y el porcentaje de genes alterados. Finalmente, realizamos un análisis de enriquecimiento de genes aplicando la anotación de *GO biological process* (<http://geneontology.org>) a la lista de 120 genes infraexpresados en nuestros pacientes.

Validación de los datos del microarray

Los datos derivados del microarray se validaron de forma preliminar en 3 genes, en las mismas muestras de ARN incluidas en el microarray, mediante qRT-PCR. En la reacción de retro-transcripción se usaron 150 ng de ARN total de cada muestra, siguiendo las instrucciones del fabricante (SuperScript III First Strand, Thermo Fisher Scientific). Se realizó la PCR cuantitativa en un LC480 Real Time PCR system (Roche Pharma, Basel, Switzerland) usando el kit Taqman Premix Ex Taq (Takara Bio Inc.) y sondas comerciales para *MYH9*, *MYL9*, *ALOX12* y *ACTB* como control interno.

Cultivos de megacariocitos

Aislamos células madre hematopoyéticas CD34⁺ de sangre periférica mediante inmunoselección magnética con anti-CD34 MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bolonia, Italia). Para la diferenciación de MKs, las células CD34⁺ se cultivaron durante 14 días en medio StemSpan suplementado con 10 ng/mL de TPO y 25 ng/mL de SCF durante 7 días, seguido de otros 7 días con solo TPO.

3. Resultados

Pacientes

En este estudio hemos caracterizado 3 pacientes de 3 familias españolas no emparentadas con sospecha clínica de TC (**Figura 1A**) (**Tabla 1**). Los probandos

presentaban antecedentes de trombocitopenia leve desde el nacimiento ($93-128 \times 10^9$ plaquetas/L) con VPM normal (10,4-10,9 fl) y sangrado moderado (ISTH-BAT= 5-9). El probando de la familia 1 (P1) es una chica de 27 años con hematomas musculares frecuentes después de n traumatismos leves y sangrado gingival recurrente. La enferma sufrió un hematoma espinal espontáneo localizado en D2-D4 que requirió cirugía descompresiva, así como un tumor nodular relacionado con el contenido sanguíneo en el masetero derecho. El probando de la familia 2 (P2) es una mujer de 45 años que sufre diátesis hemorrágica desde el nacimiento. Su madre y dos hermanos también presentaron trombocitopenia. Un hermano trombocitopénico murió después de desarrollar SMD y una de las hijas de la enferma murió a causa de una LMA. En la familia 3, el caso índice (P3) es una mujer de 48 años que presenta epistaxis, hematomas musculares postraumáticos y sangrado de la cavidad oral. En uno de sus partos tuvo hemorragias severas que se trataron con transfusiones de plaquetas. Una hermana de la paciente presentaba cáncer de mama.

El resto de parámetros sanguíneos, el número y la morfología de glóbulos blancos y rojos, y los parámetros bioquímicos y de coagulación sanguínea se encontraban en el rango normal. Los enfermos no tenían antecedentes clínicos de disfunción orgánica/tisular relevante, inmunitaria o cognitiva.

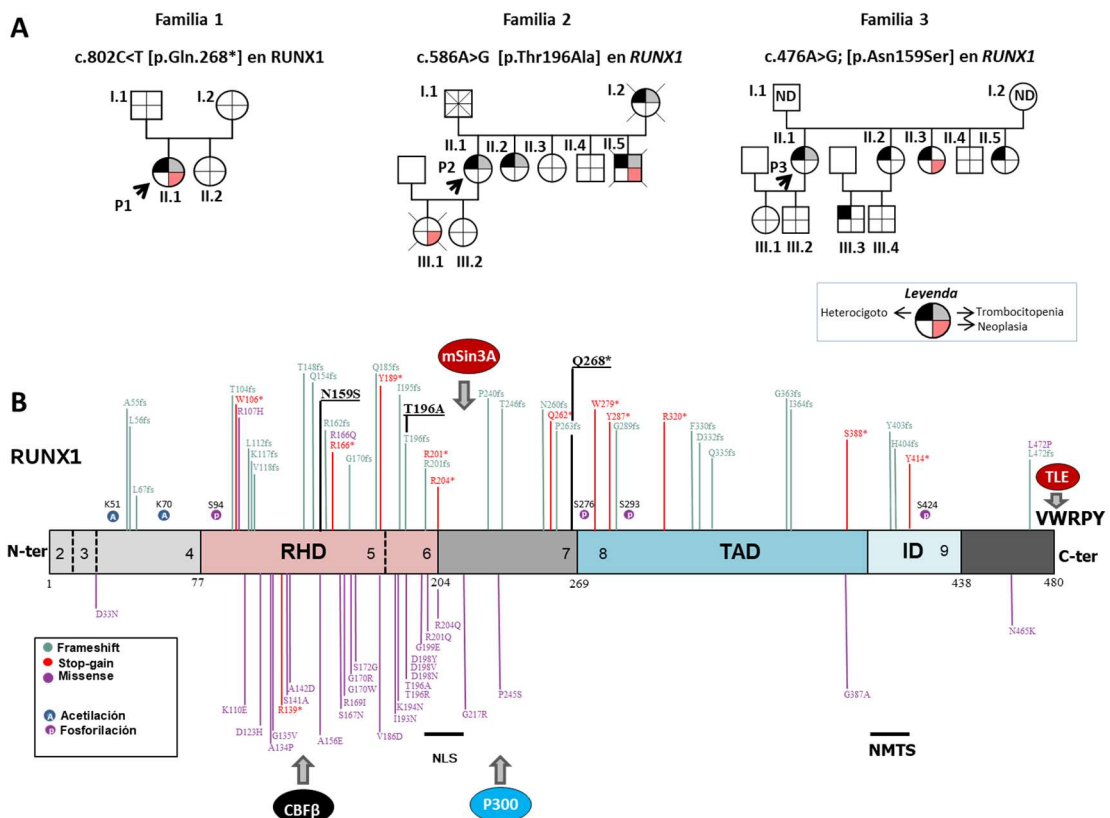


Figura 1. Familias con trombocitopenia moderada estudiadas y localización en RUNX1 de las variantes moleculares conocidas hasta la fecha. A) Pedigrí de los probandos afectados con trombocitopenia hereditaria. Los casos índices se identifican con flechas negras. Como se indica en la

leyenda de la figura, en el símbolo de cada sujeto el cuarto superior derecho sombreado indica presencia de trombocitopenia, el cuarto inferior derecho sombreado denota antecedentes de neoplasia, y el cuarto superior izquierdo sombreado indica heterocigoto para la variante RUNX1. ND= no disponible para el estudio; los símbolos sin etiquetar corresponden a familiares no incluidos en el estudio. **B)** Representación esquemática de la proteína RUNX1 con todas las variantes previamente descritas. Las variantes reportadas en el presente estudio están resaltadas en negrita y subrayadas.

Tabla 1. Parámetros sanguíneos y datos clínicos de los miembros de las familias estudiadas.

Pedigrí		Edad	WBC × 10 ⁹ /L	RBC × 10 ¹² /L	Hb, g/dL	Hct (%)	Platelets × 10 ⁹ /L	MPV, fL	ISTH-BAT
A	I.1	68	5.44	5.12	15	43.8	184	12.2	0
	I.2	59	8.47	4.27	14.5	42.9	240	11.5	0
	II.1	ND	3.32	4.12	12.2	36.5	108	10.9	5
	II.2	35	6.14	4.40	13.9	41.5	265	11.5	0
B	II.1	45	4.44	4.43	15	43.2	93	10.6	5
	II.2	51	4.9	4.61	13.7	42	91	8.6	ND
	II.3	60	5	4.28	13.7	40.7	166	10	ND
	II.4	53	6	4.63	12.6	38	171	8.5	ND
	II.5	55	3.3	3.82	13.7	39.5	63	7.8	ND
	III.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	III.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C	II.1	48	4.29	4.77	14.4	42.8	128	11.6	9
	II.2	50	5.71	4.53	13.8	42.8	258	11.2	ND
	II.3	49	7.38	4.73	14.7	43.1	187	11.5	ND
	II.4	52	8.34	4.96	15.4	45.3	280	10.4	ND
	II.5	53	5.23	4.60	14.2	43.6	155	10.4	ND
	III.1	20	4.82	4.00	12.6	37.1	185	10.1	ND
	III.2	ND	4.50	4.79	13.4	38.6	241	10.6	ND
	III.3	ND	ND	ND	ND	ND	173	ND	ND
	III.4	ND	ND	ND	ND	ND	219	ND	ND

WBC: white blood cells (leucocitos); **RBC:** red blood cells (hematías); **Hb:** hemoglobina; **Hct:** Hematocrito; **VPM:** Volumen plaquetario medio; **ISTH-BAT:** escalada de valoración del sangrado de la ISTH; **ND:** no disponible. Los casos índices se resaltan en negrita. Rango normal de sujetos sanos (n=107): [Plaquetas: 142-359 × 10⁹/L] y [VPM: 9-12.8 fL].

Estudios de función plaquetaria

Basándonos en su historial clínico hemorrágico, planteamos la hipótesis de que los pacientes presentaban un TPC. La expresión de las principales GPs plaquetarias fue similar entre los probandos y los controles sanos, excepto para la GPI α (**Figura 2A**). Cabe destacar que los probandos P1 y P2, pero no P3, mostraron una reducción moderada en los niveles de GPI α (**Figura 2A**). La unión de fibrinógeno a las plaquetas de los pacientes estaba marcadamente reducida tras estimulación con dosis bajas y altas de CRP, ligeramente disminuida estimulando con PAR1p o con PMA, y normal si el agonista era ADP (**Figura 2B**). Además, en comparación con los controles paralelos, las plaquetas de P2 y P3, pero no las de P1, mostraron una alterada secreción de gránulos α , evaluada mediante la expresión de CD62, tras la estimulación con CRP (**Figura 2C**). Asimismo, las plaquetas de todos los probandos presentaron una

reducción en la secreción de gránulos δ (medida por la expresión de CD63) tras la estimulación con CRP o PAR1p. (**Figura 2D**).

En consonancia con el defecto en la unión del fibrinógeno y la secreción de gránulos δ , en los pacientes P1 y P2, la respuesta de agregación plaquetaria inducida por colágeno y CRP, y en menor medida con ADP, estaban disminuidas. Las plaquetas del probando P2 también mostraron, una discreta reducción en la agregación plaquetaria en respuesta a PAR1p y ristocetina. Finalmente, en contraste con los resultados de la citometría de flujo, la respuesta de agregación plaquetaria en P3 estaba alterada mínimamente en comparación con los controles paralelos (C1 y C2) (**Figura 2E**).

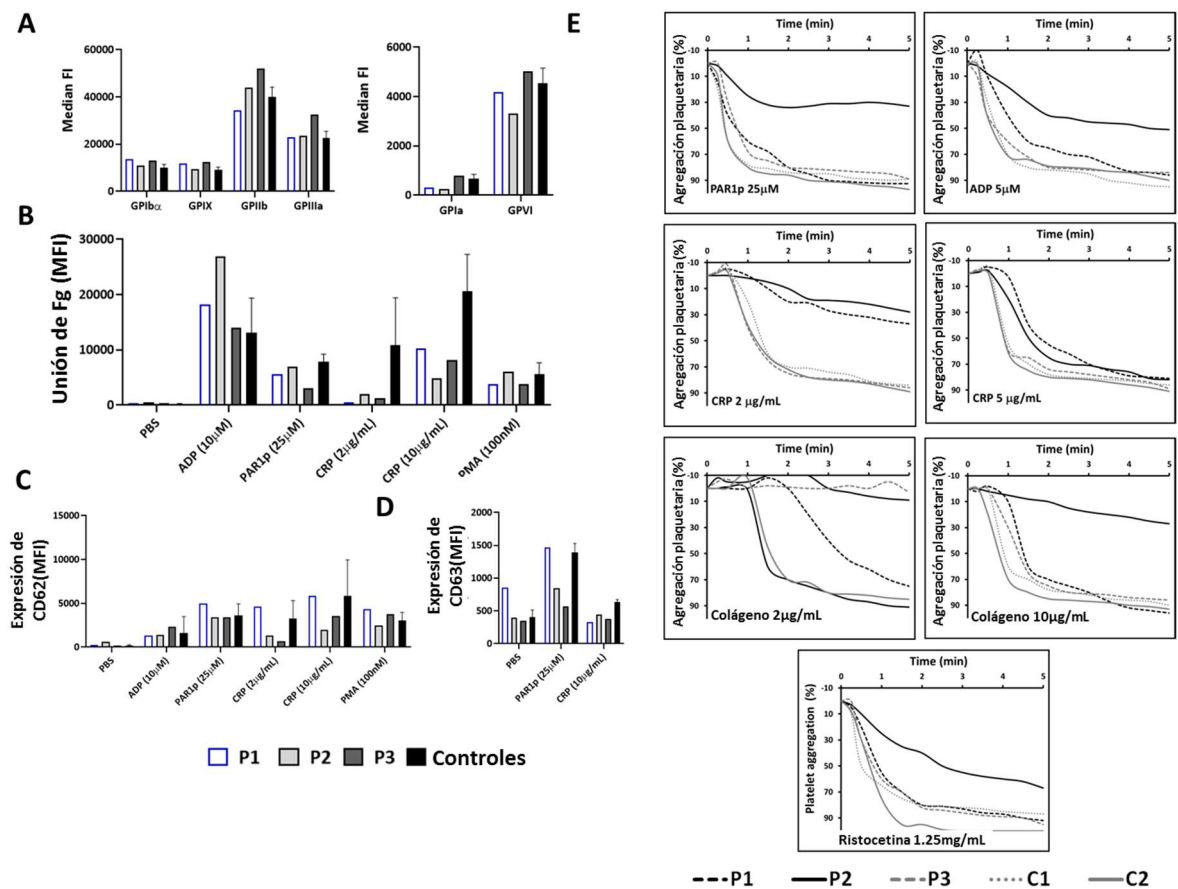


Figura 2. Disfunción plaquetaria en los probandos con trombocitopenia. A) Expresión de GPs, evaluada mediante citometría de flujo en sangre total, en los pacientes P1 (portador de la variante p.Gln.268 *), P2 (portador de la variante p.Thr196Ala), P3 (portador de la variante p.Asn159Ser) y en controles paralelos sanos (datos combinados de dos sujetos). B-C-D) Unión de fibrinógeno y secreción de gránulos. Las plaquetas de pacientes y controles se estimularon con agonistas, durante 30 min en condiciones estáticas, en presencia de B) fibrinógeno-Alexa 488 o los anticuerpos monoclonales C) anti-CD62P o D) anti-CD63, se fijaron y se evaluaron mediante citometría de flujo. Se muestra en la figura la mediana de intensidad de fluorescencia [MFI]. E) Perfil de agregación plaquetaria en PRP de los pacientes y sujetos control (C1 y C2), en respuesta a los agonistas indicados.

Identificación de variantes raras en RUNX1 mediante HTS

Con el objetivo de identificar el defecto genético subyacente que explica la trombocitopenia y la disfunción plaquetaria en los probandos, el ADN de los pacientes fue analizado por HTS de un panel de genes. Se identificaron tres variantes nuevas en el gen *RUNX1* (NM_001754.5). La secuenciación de Sanger confirmó la presencia de estas variantes en los probandos y también en varios familiares. Estas variantes estaban presentes en heterocigosis en todos los casos. Se trata de variantes que afectan a residuos altamente conservados, situados en diferentes dominios de la proteína RUNX1 (**Figura 1B**).

La proteína RUNX1 dispone de distintos dominios con diversas funciones. En particular, la isoforma C de RUNX1 que se expresa predominantemente en plaquetas^{10,28} es una proteína formada por 480 aminoácidos que contiene dos grandes dominios, el dominio Runt-Homology [RHD] y el dominio TAD de transactivación (**Figura 1B**)¹². El RHD es un dominio de 128 aminoácidos, conservado evolutivamente entre las especies y todas las proteínas RUNX, que es fundamental para la función transcripcional de RUNX1 porque media tanto la unión del ADN, como la heterodimerización con el CBFβ. CBFβ mejora significativamente la capacidad de unión de RUNX1 al ADN y también protege a RUNX1 de la degradación mediada por el complejo ubiquitina-proteasoma. El dominio TAD consta de dominios activadores e inhibidores que se unen a varias proteínas activadoras y represoras²⁸. De hecho, se ha descrito una serie de proteínas reguladoras, como los activadores p300, ERK y los inhibidores TLE, que interactúan con RUNX1 mediando la modificación postraduccional y regulando la expresión génica específica del linaje²⁹. La unión de p300 aumenta la actividad transcripcional de RUNX1 y p300 también acetila Lys51 y Lys70 dando como resultado una mayor actividad de unión al ADN. ERK fosforila a RUNX1 en los residuos Ser276 y Ser293 potenciando su actividad transcripcional. Por el contrario, RUNX1 también puede funcionar como represor transcripcional al reclutar correpresores transcripcionales, como mSin3A y TLE^{7,29}. TLE se une a RUNX1 a través del motivo C-terminal VWRPY. Finalmente, RUNX1 también muestra un dominio regulador negativo para heterodimerización [ID]²⁹; una señal de localización nuclear [NLS] que es crucial para la localización de RUNX1 en el núcleo, y una señal de focalización de matriz nuclear [NMTS] para la organización nuclear^{29,30}.

En el probando P1, identificamos la variante *de novo* c.802C>T [p.Gln.268*] en el exón 7 ubicado antes del dominio TAD. En el caso índice P2, la variante nueva c.586A>G [p.Thr196Ala] en el exón 6, que afecta al dominio RHD y segrega con la trombocitopenia en la familia. Finalmente, en el paciente P3 identificamos el cambio c.476A>G; [p.Asn159Ser] en el exón 5 que también se encuentra en el dominio RHD y que no segrega con la trombocitopenia (**Figura 1B**).

Atendiendo a los criterios del ACMG, y sin tener en cuenta los datos actuales, la variante p.Gln.268* se clasificó como patogénica y las variantes p.Thr196Ala y p.Asn159Ser como probablemente patogénicas. Todos los análisis computacionales *in silico* mencionados en la plataforma Varsome (<https://varsome.com/>)³¹ predicen un efecto deletéreo de estas variantes. Estas variantes y no están incluidas en la base de datos de gnomad (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

Gránulos densos en plaquetas de los pacientes

Dado que se ha descrito previamente una menor contenido de gránulos δ en las plaquetas de algunos pacientes con mutaciones *RUNX1*^{26,32,33}, evaluamos este aspecto en nuestros probandos mediante un ensayo de microscopía electrónica *Whole Mount*. Como se muestra en la **Figura 3**, el promedio de gránulos δ por plaqueta en P2 y P3 (5,5 y 5/plaqueta respectivamente) es similar al estimado en controles paralelos sanos (4,5/plaqueta). Cabe destacar que en el caso P1 (2,82/plaqueta; p.valor= 0,03) pudimos observar una deficiencia estadísticamente significativa en δ -gránulos.

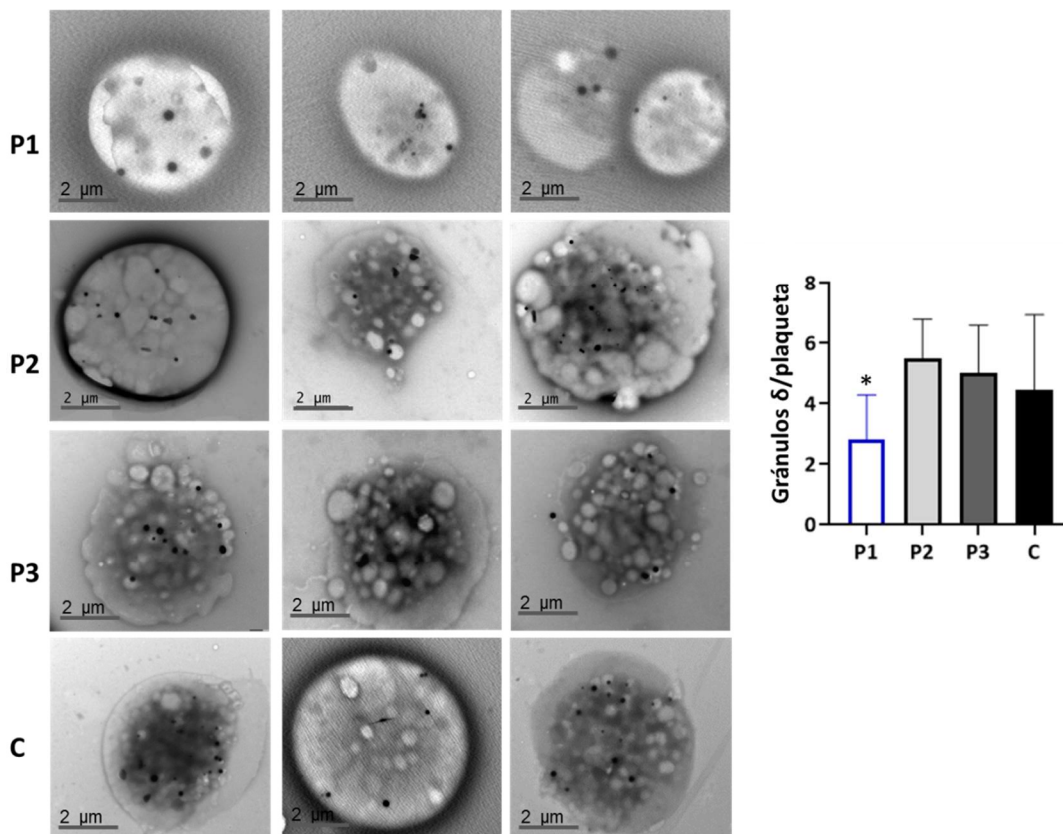


Figura 3. Contenido de gránulos δ en plaquetas de portadores de las variantes en *RUNX1* p.Gln.268*, p.Thr196Ala and p.Asn159Ser. El contenido de gránulos densos, identificados como puntos negros, se evaluó mediante microscopía electrónica utilizando montajes de plaquetas no fijadas de los probandos P1, P2 y P3, y de controles sanos ($n=3$). Las rejillas se visualizaron en un microscopio electrónico JEOL. El contenido de gránulos densos/plaqueta se estimó evaluando al menos plaquetas de 10 campos diferentes. (*) p -valor ≤ 0.05 . Abreviatura: C: Controles

Evaluación del efecto deletéreo de las variantes a través del perfil transcriptómico de los pacientes

Dado que *RUNX1* es un factor de transcripción hematopoyético relevante que regula la expresión de un amplio repertorio de genes hematopoyéticos, nuestro objetivo fue determinar el potencial efecto deletéreo de las variantes de *RUNX1* identificadas en nuestros probandos, comparando el transcriptoma plaquetario individual de nuestros pacientes con el perfil medio de 5 controles sanos mediante el uso de señales de intensidad normalizados (valores RMA). Este análisis de transcriptomas considerando 15 genes dianas de *RUNX1* (incluyendo *MYL9*, *MYH9*, *ALOX12*, *TREML1* e *ITGA2*)²²⁻²⁶, mostró que el porcentaje de estos genes con expresión alterada en los pacientes, vs. controles, fue del 73,3% y 66,7% en P1 y P2, respectivamente, y solo 6,7% en P3 (**Figura 4A**). Así, en los casos P1 y P2, aquellos con mayor número de genes alterados, se observó un defecto de expresión en 11 de los 15 genes diana *RUNX1* analizados (**Figura Suplementaria S1**).

Para confirmar que el perfil de expresión génica plaquetaria de nuestros pacientes es compatible con el esperado en un paciente con una alteración en *RUNX1*, reanalizamos el perfil transcriptómico de nuestro paciente, vs. controles, considerando ahora 100 genes previamente descritos como infraexpresados en un paciente portador de una delección de 13 nucleótidos en *RUNX1* que provoca un desplazamiento del marco de lectura con aparición de un codón stop prematuro y pérdida de 87 aminoácidos en el dominio RHD²⁷. En esta nueva comparación, nuestros casos mostraron una menor expresión en el 74,7%, 67,7% y 7,1% (P1, P2 y P3, respectivamente) de los 100 genes (**Figura 4B**).

El análisis de componentes principales de las señales de intensidad del array para las 15 dianas o para los 100 genes descritos, agrupó todos los controles y el caso P3 separados de los casos P1 y P2 (**Figura 4C-D**). De manera similar, un análisis de cluster jerárquico, que también utiliza los valores de RMA y representa la distribución de las muestras en un dendograma, mostró un cluster formado por los pacientes P1 y P2 y otro separado que incluye los controles y el probando P3 (**Figura 4E-F**). En la **Figura 4G** se muestra un *heatmap* que incluye el perfil de expresión génica de los 5 controles y los probandos (P1 y P2) para los 15 genes dianas. Se muestran en verde los genes con expresión relativamente más baja y en rojo aquellos genes con expresión relativamente más alta. Como se aprecia en la figura, P1 y P2 mostraron un comportamiento similar en términos de nivel de expresión génica, que es opuesto al observado en los controles.

El perfil del transcriptoma de los casos P1 y P2, junto con la trombocitopenia con VPM normal, apoyan el diagnóstico de *RUNX1*-RD en estos pacientes. Por el contrario, el perfil de expresión génica del paciente con la variante p.Asn159Ser no respalda la

patogenicidad de esta variante, que además ni siquiera se segrega con la trombocitopenia dentro del pedigrí.

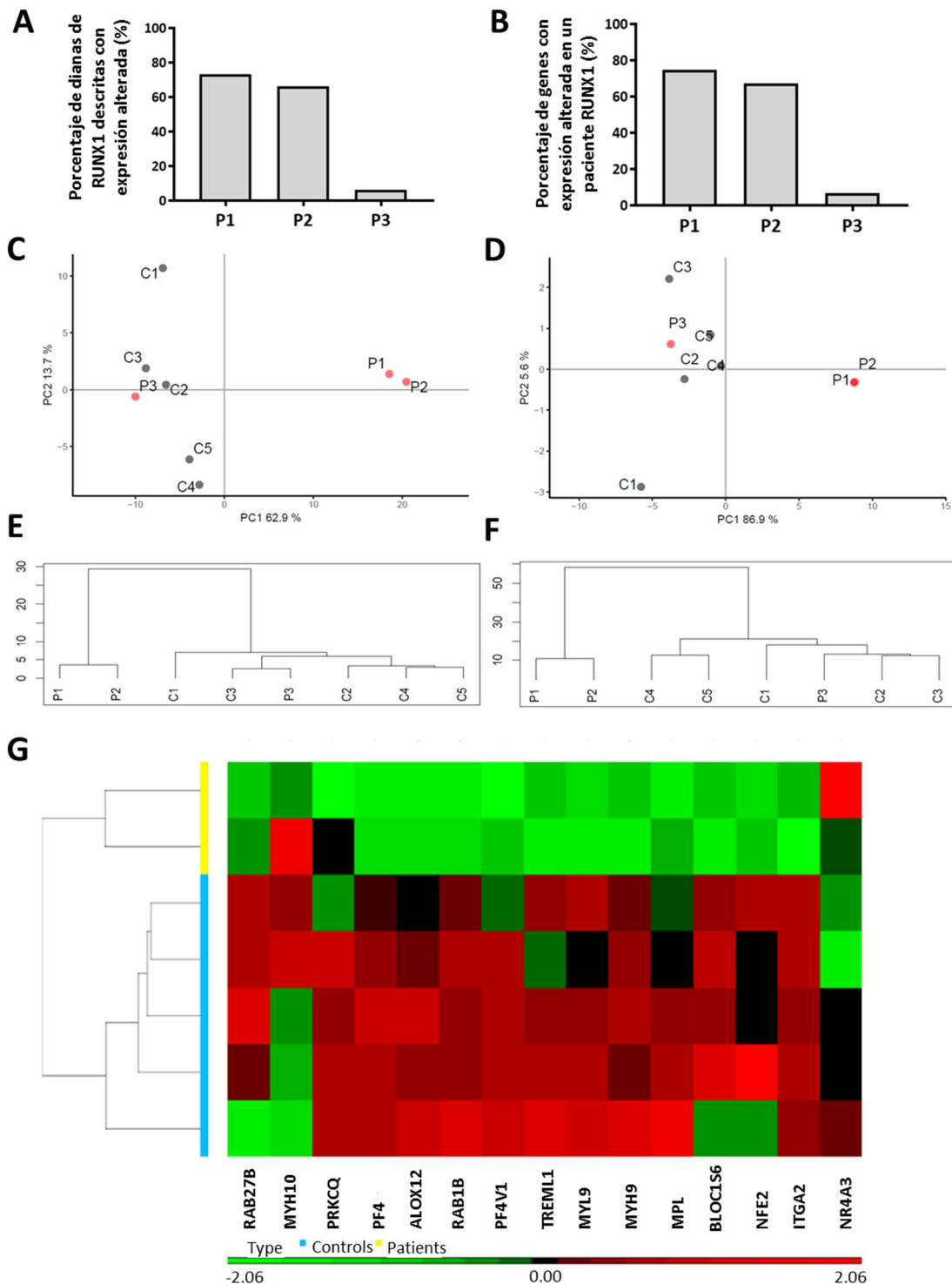


Figura 4. Perfil transcriptómico de los pacientes con variantes en RUNX1. El transcriptoma plaquetario de los pacientes P1, P2, P3 y controles sanos (n=5) se analizó en un GeneChip Clariom D Array. **A-B)** Las señales RMA normalizadas (Robust Multi-array Average) de nuestros pacientes individuales (P1, P2 y P3) se compararon con la media de las señales RMA de los controles considerando **A)** 15 dianas de RUNX1 descritas y **B)** 100 genes descritos como

infraexpresados en un solo pacientes con RUNX1-RD. Los gráficos muestran el porcentaje de esos genes con expresión alterada en los pacientes. **C-D)** Muestran el análisis de componentes principales realizado con el software R, en el que se incluye el valor de RMA para **C)** 15 genes dianas de RUNX1 o para **D)** 100 genes infraexpresados en un paciente con RUNX1-RD. **E-F)** Se realizó un análisis de clusters jerárquico con el software R, en el que se incluye el valor de RMA para **E)** 15 genes dianas de RUNX1 o para **F)** 100 genes infraexpresados en un paciente con RUNX1-RD. **G)** Muestra un heatmap que incluye el perfil de expresión génica de los 5 controles y los probandos (P1 y P2) para las 15 dianas RUNX1 descritas (genes downregulados en verde y upregulados en rojo).

Genes diferentemente expresados en pacientes con RUNX1-RD

Tras confirmar la patogenicidad de las variantes y el diagnóstico de RUNX1-RD en los probandos P1 y P2, nuestro objetivo fue identificar genes con una expresión diferente en pacientes y controles sanos. Filtramos la lista de genes diferentemente expresados entre los dos pacientes y los controles considerando un valor $p < 0.05$ y un *Fold-change* < -2 o > 2 . Encontramos 3157 genes diferentemente expresados en pacientes y controles, de los cuales 1368 estaban supraexpresados y 1789 infraexpresados en pacientes.

En este estudio nos centramos principalmente en los genes infraexpresados en nuestros pacientes, ya que la mayoría de dianas de RUNX1 descritas hasta ahora son genes cuya activación transcripcional depende de la actividad de RUNX. Pero en la **Tabla Suplementaria S1** también mostramos los 50 genes más supraexpresados en nuestros pacientes. Sorprendentemente, entre los genes *upregulados* destacan: i) un grupo de genes que codifican proteínas de origen eritroide (*CA1*, *ALAS2*, *HBA1*, *HBA2*, *SLC25A37*, *SLC4A1*, *FEHC*, *GYPA*, *EPB42* y *GYPC*); ii) genes que codifican transportadores de membrana (*SLC25A30*, *SLC10A7*, *SCLT1*); y iii) genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis, modificación y degradación de proteínas, como las proteínas ribosomales (*RPS21*, *RPL27* y *RPL34*), *UGGT2*, *RSBN1L* y *RNF217*. De acuerdo con este último grupo, encontramos en esta lista el gen *TBPL1* cuya proteína está relacionada con la transcripción de proteínas ribosomales. Es de destacar que el gen más sobreexpresado de la lista es *CA1* (*Fold change* 140.04 vs. controles) que codifica la anhidrasa carbónica (pertenece a la familia de las anhidrasas carbónicas que participan en la acidificación extracelular). Otro gen upregulado interesante es *LXN* (*Fold change* 17.34 vs. controles), que codifica la proteína latexina reconocida recientemente como un nuevo supresor tumoral en neoplasias hematológicas³⁴.

Centrándonos en los genes infraexpresados en nuestros pacientes, en la **Tabla 2** se muestran los 120 genes más infraexpresados en nuestros pacientes. Atendiendo al su significado biológico, clasificamos estos genes en 5 grupos principales: i) genes implicados en la estructura u organización citoesqueleto; ii) genes que participan en la transducción de señales; iii) genes relacionados con la interacción y regulación del ADN; iv) genes implicados en la dinámica del ciclo celular; v) genes que alguna vez se

han asociado con procesos tumorales (**Figura 5**). Los genes que participan de la organización del citoesqueleto representan el 18,3% de los genes infraexpresados e incluyen dianas de RUNX1 previamente descritas, como *MYL9* y *MYH9*, pero también genes nuevos como *FLNA*, *ATG1*, *COTL1* o *TUBA1B*. Cabe destacar que en este subgrupo existe una alta prevalencia de genes que asociados al citoesqueleto de actina como *ATG1*, *ABLIM1*, *ABLIM3*, *TPM1*, *TPM4* o *WASF3* (**Figura 5**).

Por otro lado, identificamos un subgrupo de genes implicados en la señalización plaquetaria (40% de los genes infraexpresados) que incluye dianas previamente reconocidas de RUNX1 como *ALOX12* o *ITGA2*, así como genes nuevos como *PRKCB*, *PTGS1*, *GNAZ*, *PTPRJ*, o genes de GTPasas como *RAB6B*, *RAB8B* y *RAB1B*, en cuya regulación transcripcional podría interferir RUNX1. Entre estos genes de señalización también podemos encontrar genes que codifican proteínas implicadas en la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (*ITGB3BP*, *CD151* y *FERMT3*); receptores de plaquetas (*GP1BB*, *P2RY12* y *CD36*); factores de transcripción hematopoyéticos (*GFI1B*, *USF2*); proteínas de coagulación (*F11R*, *F13A1*); y proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos o el tráfico de vesículas, como *PANX1*, *HSD17B3*, *TMEM189* o *CAPB5* (**Figura 5**).

Finalmente, en la lista de genes de los 120 genes infraexpresados, aparece un subgrupo de genes relacionados con: i) el ciclo celular (*SEPW1*, *PPP2R2D* y *UBE2E3*); ii) la regulación del ADN (*BEND2*, *HIST1H2BD*, *HIST2H4B*, *MTTL22* y *ZSWIM7*); iii) genes asociados, al menos ocasionalmente, a neoplasias o que se hayan considerado supresores de tumores como *SAV1*, *GFI1B*, *TPM1*, *FLII*; en conjunto representan el 31,3% de los 120 genes infraexpresados (**Figura 5**).

Tabla 2. Los 120 genes más infraexpresados en dos pacientes con trombocitopenia portadores de las variantes p.Gln268* y p.Thr196Ala.

<u>GEN</u>	<u>Descripción</u>	Fold Change	P-value
ITGB3BP	<i>integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)</i>	-358,5	2,67E-05
MYL9	<i>myosin light chain 9</i>	-266,19	1,64E-05
VEPH1	<i>ventricular zone expressed PH domain containing 1</i>	-88,51	2,39E-09
ABLIM1	<i>actin binding LIM protein 1</i>	-54,34	1,67E-05
CARD16	<i>caspase recruitment domain family, member 16</i>	-44,92	5,48E-05
CABP5	<i>calcium binding protein 5</i>	-43,37	6,12E-06
THBS1	<i>thrombospondin 1</i>	-39,42	0,0281
BEND2	<i>BEN domain containing 2</i>	-36,03	0,0001
ZSWIM7	<i>zinc finger, SWIM-type containing 7</i>	-34,97	4,39E-05
NDUFA4	<i>NDUFA4, mitochondrial complex associated</i>	-34	0,0017
FERMT3	<i>fermitin family member 3</i>	-33,1	0,0023
FLNA	<i>filamin A, alpha</i>	-29,41	0,0148
SEPW1	<i>selenoprotein W, 1</i>	-28,29	1,68E-05
F11R	<i>F11 receptor</i>	-28,24	0,0003

MCEMP1	<i>mast cell-expressed membrane protein 1</i>	-28,09	4,46E-05
BTN3A2	<i>butyrophilin, subfamily 3, member A2</i>	-26,3	7,30E-06
ACTG1	<i>actin gamma 1</i>	-23,67	0,0014
COTL1	<i>coactosin-like F-actin binding protein 1</i>	-21,58	0,0007
GP1BB	<i>SEPT5</i>	-21,58	0,0098
PYGB	<i>phosphorylase, glycogen</i>	-19,92	0,0013
MCUR1	<i>mitochondrial calcium uniporter regulator 1</i>	-19,34	4,23E-06
MYH9	<i>myosin, heavy chain 9, non-muscle</i>	-18,93	0,0002
PCSK6	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 6</i>	-18,62	0,0192
METTL22	<i>methyltransferase like 22</i>	-18,52	0,0006
UBC	<i>ubiquitin C</i>	-18,17	0,0001
AMD1	<i>adenosylmethionine decarboxylase 1</i>	-18,16	0,0050
HRASLS	<i>HRAS-like suppressor</i>	-18,06	0,0003
MMRN1	<i>multimerin 1</i>	-15,56	0,0001
ALOX12	<i>arachidonate 12-lipoxygenase</i>	-14,35	0,0001
ITGAE	<i>integrin alpha E</i>	-13,93	0,0010
MTMR12	<i>myotubularin related protein 12</i>	-13,14	4,40E-07
MFAP3L	<i>microfibrillar associated protein 3 like</i>	-13,08	4,26E-06
ST3GAL6	<i>ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6</i>	-13,02	0,0011
WASF3	<i>WAS protein family, member 3</i>	-12,95	0,0007
OSTM1	<i>osteopetrosis associated transmembrane protein 1</i>	-12,64	0,0020
RAB6B	<i>RAB6B, member RAS oncogene family</i>	-12,53	0,0007
MGST3	<i>microsomal glutathione S-transferase 3</i>	-12,27	0,0015
FXYD5	<i>FXYD domain containing ion transport regulator 5</i>	-12,02	0,0013
SAV1	<i>salvador family WW domain containing protein 1</i>	-11,86	0,0287
TPM1	<i>tropomyosin 1 (alpha)</i>	-11,55	3,08E-05
TAF10	<i>TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 30kDa</i>	-11,06	0,0002
ABLIM3	<i>actin binding LIM protein family, member 3</i>	-10,96	0,0083
GFI1B	<i>growth factor independent 1B transcription repressor</i>	-10,74	0,0001
ORMDL3	<i>ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3</i>	-10,36	0,0005
USF2	<i>upstream transcription factor 2, c-fos interacting</i>	-10,11	0,0472
MTMR10	<i>myotubularin related protein 10</i>	-10,04	0,0006
TMEM230	<i>transmembrane protein 230</i>	-9,67	0,0044
DAAM1	<i>dishevelled associated activator of morphogenesis 1</i>	-9,66	9,63E-05
ANKRD28	<i>ankyrin repeat domain 28</i>	-9,66	0,0208
SLC24A3	<i>solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3</i>	-9,62	0,0014
MFF	<i>mitochondrial fission factor</i>	-9,49	0,0002
BANK1	<i>B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1</i>	-9,44	0,0078
EMD	<i>emerin</i>	-9,39	0,0060
ETFA	<i>electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide</i>	-9,18	0,0021
CD36	<i>CD36 molecule (thrombospondin receptor)</i>	-9,17	0,0035
HLA-C	<i>major histocompatibility complex, class I, C</i>	-9,08	0,0072
VCL	<i>vinculin</i>	-9,08	1,98E-05

CDC42BPB	<i>CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)</i>	-9,05	0,0005
CDC14B	<i>cell division cycle 14B</i>	-9,04	0,0007
HLA-B	<i>major histocompatibility complex, class I, B</i>	-8,99	0,0159
WRB	<i>tryptophan rich basic protein</i>	-8,84	0,0278
PLEKHO1	<i>pleckstrin homology domain containing, family O member 1</i>	-8,83	0,0003
CDYL	<i>chromodomain protein, Y-like</i>	-8,7	0,0028
UBE2Q1	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 1</i>	-8,6	1,27E-05
ARPP19	<i>cAMP-regulated phosphoprotein 19kDa</i>	-8,56	0,0002
POLR2G	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G</i>	-8,48	5,44E-05
TSPAN13	<i>tetraspanin 13</i>	-8,44	0,0022
DSE	<i>dermatan sulfate epimerase</i>	-8,37	0,0005
HLA-F	<i>major histocompatibility complex, class I, F</i>	-8,21	0,0089
HIST1H2BF	<i>histone cluster 1, H2bf</i>	-8,2	0,0143
CELF2	<i>CUGBP, Elav-like family member 2</i>	-8,17	0,0056
TTC7B	<i>tetratricopeptide repeat domain 7B</i>	-8,07	0,0040
PDE5A	<i>phosphodiesterase 5A, cGMP-specific</i>	-8,05	0,0088
CD151	<i>CD151 molecule (Raph blood group)</i>	-7,94	0,0452
SCP2	<i>sterol carrier protein 2</i>	-7,93	0,0151
WDR1	<i>WD repeat domain 1</i>	-7,8	0,0028
NTAN1	<i>N-terminal asparagine amidase</i>	-7,8	0,0021
STK38	<i>serine/threonine kinase 38</i>	-7,67	7,06E-05
FLII	<i>flightless I actin binding protein</i>	-7,64	0,0024
DYNLL2	<i>dynein, light chain, LC8-type 2</i>	-7,62	4,23E-06
HIST1H2BD	<i>histone cluster 1, H2bd</i>	-7,62	0,0040
TPM4	<i>tropomyosin 4</i>	-7,55	0,0007
LTBP1	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	-7,54	0,0004
PRKCB	<i>protein kinase C, beta</i>	-7,5	0,0004
UBE2E3	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3</i>	-7,44	8,31E-05
CAST	<i>calpastatin</i>	-7,4	0,0020
CCND3	<i>cyclin D3</i>	-7,33	0,0073
CNN1	<i>calponin 1, basic, smooth muscle</i>	-7,31	0,0498
OSTF1	<i>osteoclast stimulating factor 1</i>	-7,18	3,71E-05
P2RY12	<i>purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12</i>	-7,16	0,0026
ENO1	<i>enolase 1, (alpha)</i>	-7,13	0,0010
HIST2H4B	<i>HIST2H4A</i>	-7,11	0,0096
PTGS1	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	-7,09	0,0063
RAB8B	<i>RAB8B, member RAS oncogene family</i>	-7,05	0,0023
CAST	<i>calpastatin</i>	-7,03	0,0005
CD84	<i>CD84 molecule</i>	-6,98	0,0005
F13A1	<i>coagulation factor XIII, A1 polypeptide</i>	-6,97	0,0001
PTPRJ	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, J</i>	-6,94	7,89E-07
PGRMC1	<i>progesterone receptor membrane component 1</i>	-6,92	0,0088
BET1	<i>Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein</i>	-6,88	0,0440

SLC10A3	<i>solute carrier family 10, member 3</i>	-6,87	0,0234
TUBA1B	<i>tubulin, alpha 1b</i>	-6,86	0,0001
HSD17B3	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3</i>	-6,83	8,89E-05
SKA2	<i>spindle and kinetochore associated complex subunit 2</i>	-6,83	0,0087
LIPA	<i>lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase</i>	-6,81	0,0002
PANX1	<i>pannexin 1</i>	-6,81	0,0014
GNAZ	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide</i>	-6,78	0,0004
TSPAN33	<i>tetraspanin 33</i>	-6,77	0,0061
TMEM189	<i>transmembrane protein 189</i>	-6,68	0,0120
IDS	<i>iduronate 2-sulfatase</i>	-6,64	0,0036
MAP1B	<i>microtubule associated protein 1B</i>	-6,56	0,0091
SEMA4D	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D</i>	-6,54	0,0006
ARL6IP5	<i>ADP-ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 5</i>	-6,49	0,0030
HSBP1	<i>heat shock factor binding protein 1</i>	-6,42	0,0423
CD28	<i>CD28 molecule</i>	-6,39	0,0167
SCYL2	<i>SCY1-like, kinase-like 2</i>	-6,37	0,0018
RAB1B	<i>RAB1B, member RAS oncogene family</i>	-6,34	0,0006
PPP2R2D	<i>protein phosphatase 2, regulatory subunit B, delta</i>	-6,27	0,0005
ITGA2	<i>integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)</i>	-6,18	0,0001
RTN1	<i>reticulon 1</i>	-6,14	0,0004

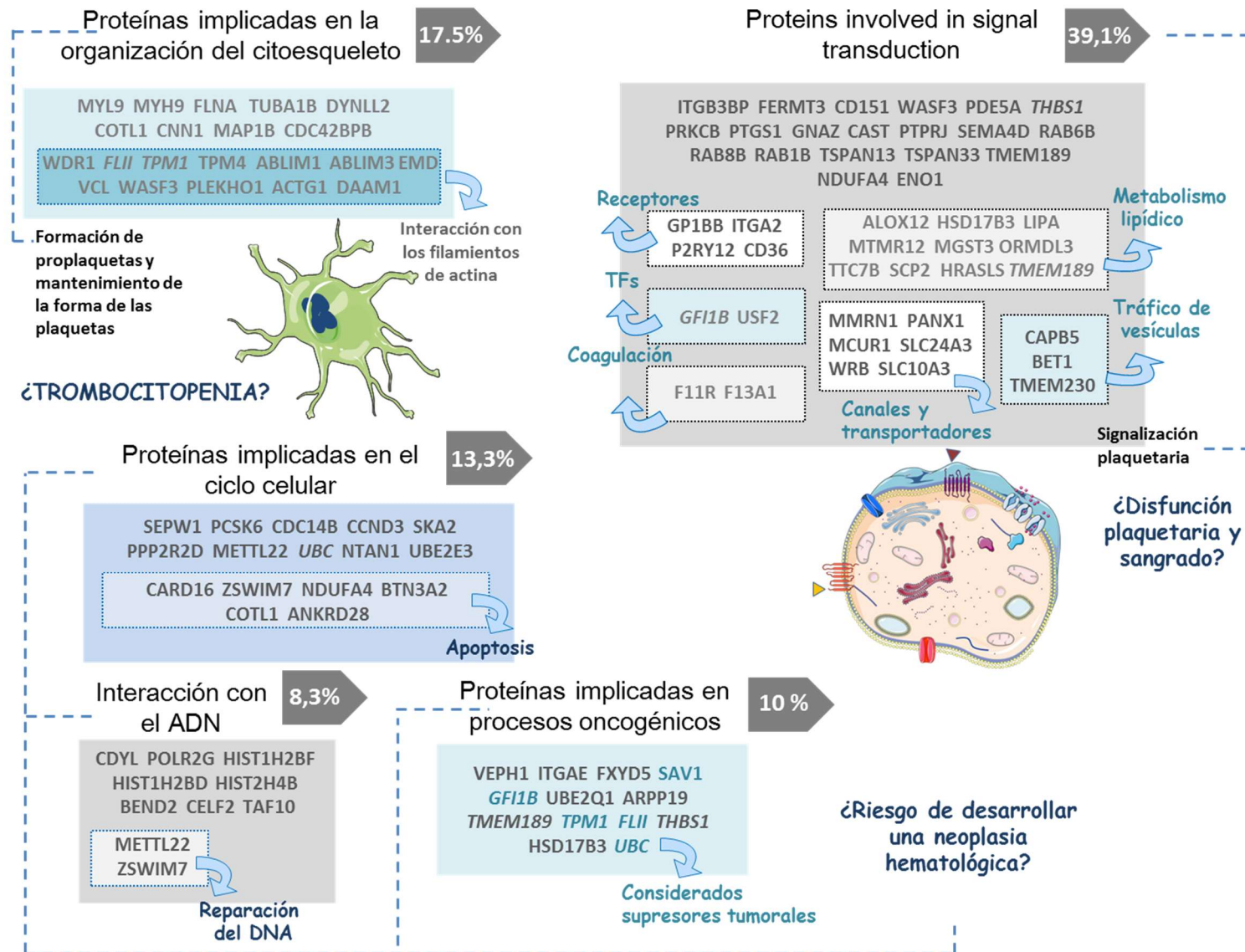


Figura 5. Clasificación funcional de los 120 genes infraexpresados en portadores de las variantes en *RUNX1* p.Gln.268* y p.Thr196Ala. El análisis del transcriptoma de plaquetas de los pacientes P1 y P2 y los controles sanos (n = 5) se evaluó utilizando muestras de ARN de plaquetas ultrapuras en un GeneChip Clariom D Array. Para obtener una lista de

genes regulados negativamente entre pacientes RUNX1 (P1 y P2) y controles (n = 5), se hizo un análisis estadístico ANOVA con el software TAC (Affymetrix Transcriptome Analysis Console 3.0, Affymetrix, Inc). El punto de corte aplicado a los resultados de ANOVA fue un cambio > 2 veces en la expresión génica a un nivel de significación de $p < 0,05$. La importancia biológica de estos genes los clasificó en 5 grupos principales: i) genes implicados en la estructura u organización del citoesqueleto; ii) en transducción de señales; iii) en la interacción y regulación del ADN; iv) en la dinámica del ciclo celular; y finalmente v) genes que alguna vez se han asociado con procesos tumorales.

Validación del microarray

Para confirmar de forma preliminar los resultados obtenidos con el análisis de microarray, evaluamos el nivel de expresión de ARNm de los genes *MYH9*, *MYL9* y *ALOX12* mediante qRT-PCR. Usamos el mismo conjunto de muestras empleadas en el microarray, es decir los pacientes P1 y P2, y los controles (n=5). Para la validación, también incluimos la muestra de ARN de P3. En consonancia con los resultados del array, confirmamos una reducción en el nivel de expresión de esos genes en P1 y P2, en comparación con los controles. Además, como cabía esperar, en el caso P3 la expresión de estos genes fue similar a la observada en los controles (**Figura 6**).

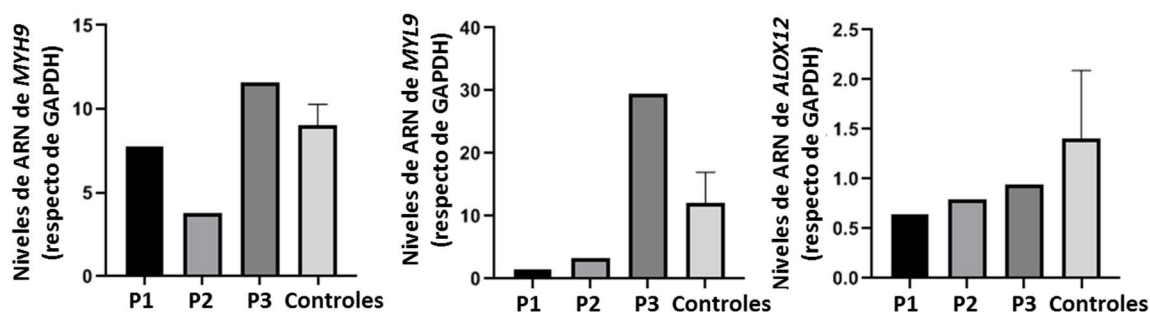


Figura 6. Genes validados mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Los experimentos de qRT-PCR se evaluaron en el mismo conjunto de muestras utilizadas para el análisis del transcriptoma (pacientes (P1 y P2) y los controles (n = 5), usando un dispositivo LC480 Real Time PCR system (Roche Pharma, Basel, Switzerland). Para ello, se empleó el kit Taqman Premix Ex Taq (Takara Bio Inc.) y sondas comerciales para *MYL9*, *MYH9*, *ALOX12* y *ACTB* como control interno.

Análisis de rutas biológicas y estudio de enriquecimiento génico

Aplicamos el análisis *Partek Genomics Suite* y *Partek Pathway* vinculado a la base de datos KEGG, a la lista de genes expresados diferencialmente (con un valor $p < 0.05$) entre pacientes (P1 y P2) y controles, para identificar rutas biológicas que pueden exhibir alteraciones importantes. En la **Tabla 3** se enumeran las rutas biológicas que están alteradas en estos pacientes, clasificadas en función del *enrichment score*. La ruta más alterada es la relacionada con la regulación del citoesqueleto de actina (**Tabla 3**) (**Figura complementaria S2A**). Además, encontramos que otras rutas relevantes también estaban alteradas, aunque en menor medida, como la ruta del ciclo celular o de la apoptosis.

Alternativamente, realizamos un análisis de enriquecimiento génico a la lista de 120 genes infraexpresados. En consonancia con los resultados previos, encontramos que la mayoría de estos genes se encuentran enriquecidos en procesos celulares como procesos basados en filamentos de actina, secreción, activación celular y ciclo celular, validando así el análisis de rutas biológicas (**Figura Suplementaria S2B**).

Mks derivados de células CD34⁺ aisladas de sangre periférica

Dada la implicación que tienen las dianas descritas de RUNX1 en el proceso de megacariopoyesis, evaluamos en un cultivo *in vitro* de Mks derivados de células CD34⁺ de sangre periférica del paciente *RUNX1* (P1) y un control paralelo. Como se muestra en la **Figura 7**, el cultivo de Mks de P1 mostró, en comparación con el control, una importante disminución en el número de progenitores de MK y/o en su proliferación. Además, solo en el cultivo de control se observaron células maduras y de mayor tamaño, sugiriendo también un bloqueo en la maduración de MK en el paciente. Desafortunadamente, dada la menor densidad celular en el cultivo del paciente al final del cultivo (día 14), no pudimos evaluar la formación de proplaquetas.

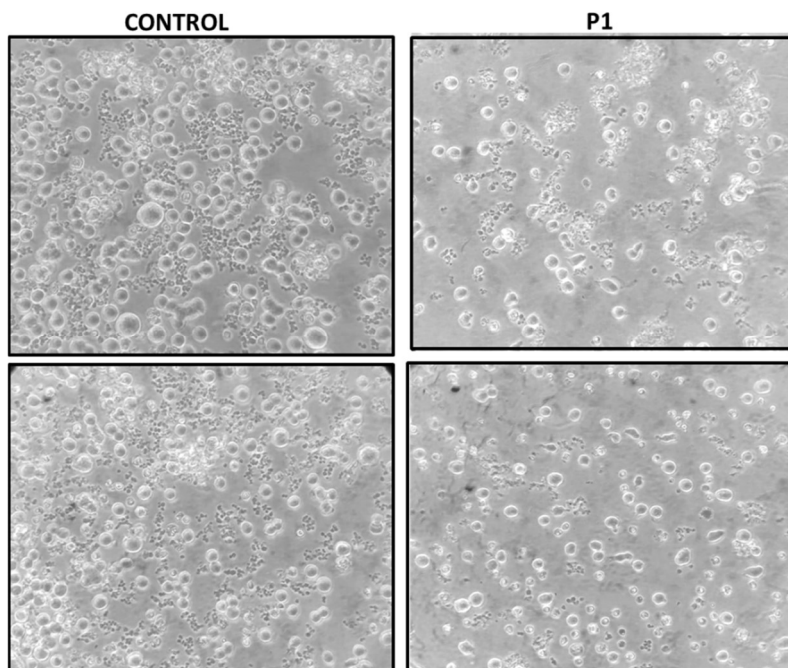


Figura 7. La variante p.Gln.268* en *RUNX1* altera la maduración y proliferación de Mks derivados de células CD34⁺. Imágenes representativas de cultivos de Mks derivados de células CD34⁺ del paciente P1 (portador de la variante p.Gln268 *) y de un control paralelo. Para la diferenciación de MK, las CD34⁺ se cultivaron durante 10-11 días en medio StemSpan suplementado con 10ng/mL de TPO y 25 ng/ml de SCF, seguido de 7 días con solo TPO. Las imágenes fueron adquiridas con Microscopio óptico invertido. Ampliación 20X.

Tabla 3. Rutas biológicas alteradas en los pacientes portadores de las variantes en *RUNX1* p.Gln.268* y p.Thr196Ala.

Posición	Nombre de la ruta	Enrichment score	Enrichment p-value	% genes	Genes
1	Regulación del citoesqueleto de actina	10.147	3.92e-05	18.69	EGF, MSN, PFN1, TMSB4X, VCL, MYL9, PPP1CC, ITGA2, ARPC4, ARHGEF6, VAV3, TMSBAY, ACTG1, FGFR1, ITGAE, VAV2, MYLK, ARGEF4, MOS, PIP4K2A, ARPC1A, PIP5K1C, CFL1, SRC, ARPC5, DIAPH1, ITGA11, GNA12, ACTB, PPP1R12C, MYH9, DIAPH3, ITGA10, PDGFA, MYLK4, PIK3CG, LIMK1, IQGAP2, CHRM3, ITGA8
7	Ciclo celular	4.0667	0.02	16.13	CCNE1, CDC14B, ANAPC11, CDKN2A, ORC6, PKMYT1, ANAPC5, YWHAQ, TGFB2, CCNB3, YWHAH, FZR1, BUB1B, MCM2, E2F2, CDK7, YWHAG, CDC6, CCND3, E2F1
9	Rechazo de injerto	4.038	0.02	22.86	HLA-DRB5, HLA-C, HLA-DQA1, HLA-F, HLA-G, CD28, HLA-E, HLA-B
10	Apoptosis	3.97	0.02	17.44	PRKA2RB, ENDOG, CASP8, PPP3CA, PPP3R1, PRKAR1B, CYCS, AIFM1, IL1RAP, PRKX, IKBKG, PIK3CG, IRAK2, IL3RA, RIPK1
15	Moléculas de adhesión celular (CAMs)	3.47	0.03	15.00	HLA-DRB5, F11R, HLA-C, HLA-DQA1, SDC4, NCAM2, CDH4, LRRC4, HLA-F, CD226, HLA-G, CD28, PTPRF, HLA-E, PECAM1, SELP, CLDN10, HLA-B, NRCAM, LRRC4B, ITGA8

*Posición de la ruta en la lista total de rutas alteradas.

Inmunofluorescencia en frotis de sangre

Dado que una alteración en un factor de transcripción puede causar afectar a la transcripción de un gran número de dianas, evaluamos en frotis de sangre de los pacientes, la presencia de marcadores plaquetarios relevantes previamente³⁵. Así, ambos pacientes (P1 y P2) mostraron una ligera alteración en marcadores de gránulos α como vWF, trombospondina y P-selectina. Por el contrario, el contenido de gránulos δ , evaluado con los marcadores Lamp2 y CD63, pareció inalterado en ambos pacientes. Cabe destacar que en el paciente P1 también observamos que las proteínas del citoesqueleto β 1 y α -tubulina estaban parcialmente desorganizadas, y más relevante, que alrededor del 10-20% de las plaquetas expresan CD34 (*datos no disponibles*).

4. Discusión

Las mutaciones de la línea germinal monoalélica en *RUNX1* dan como resultado un trastorno plaquetario familiar con predisposición a la leucemia mielógena aguda (FPD/AML) caracterizada por anomalías en el número y la función de las plaquetas y asociadas con sangrado variable y predisposición a desarrollar neoplasias hematológicas malignas. Aunque se considera una enfermedad rara, la FPD/AML se diagnostica con una frecuencia creciente debido al cribado genético masivo con HTS de grandes series de pacientes con TC de etiología desconocida. Hasta la fecha, se han reportado más de 100 variantes genéticas de *RUNX1* en familias que presentan FPD/AML^{15,36}. Ampliar el espectro genético de *RUNX1*-RD demostrando e interpretando correctamente la patogenicidad de nuevas variantes constituye un importante reto que facilitaría el diagnóstico precoz de futuros pacientes.

En este estudio se caracterizaron 3 variantes nuevas en *RUNX1* identificadas en pacientes no emparentados reclutados por su historial clínico de trombocitopenia leve ($\approx 10^5/\mu\text{L}$) y sangrado moderado. De acuerdo con la herencia autosómica dominante de *RUNX1*-ID¹², se identificaron las siguientes variantes en heterocigosis: en P1 la variante *de novo* c.802C>T [p.Gln.268*], en P2 c.586A>G [p.Thr196Ala], y en P3 c.476A>G [p.Asn159Ser]. Las variantes p.Gln268* y p.Asn159Ser las describimos previamente pero sin abordar su caracterización funcional¹³. Por su parte, la variante p.Thr196Ala se ha descrito anteriormente en una familia aislada¹⁴. También se ha reportado otra mutación que afecta al mismo residuo (p.Thr196fs) en una familia con FPD/AML^{15,37}.

Nuestro estudio ensalza el valor del transcriptoma plaquetario para evaluar el efecto patogénico de nuevas variantes de *RUNX1* identificadas en pacientes con trombocitopenia. En este estudio, comparamos el perfil del transcriptoma plaquetario de estos pacientes individuales con el perfil de controles sanos, considerando primero 15 genes ya descritos como dianas de *RUNX1*²²⁻²⁶ y después 100 genes infraexpresados en un paciente portador de una deleción en *RUNX1*²⁷. Nuestros datos transcriptómicos avalan fuertemente el efecto deletéreo de las nuevas variantes p.Gln268* y

p.Thr196Ala. Hasta el 70% de esos genes están alterados en los pacientes portadores de estas mutaciones (casos P1 y P2) en comparación con controles. Por el contrario, en el caso de la variante p.Asn159Ser (caso P3), solo en esta alterada la expresión de un 7% de esos genes, lo que sugiere la falta de patogenicidad de esta variante, que además no se segrega con la trombocitopenia en la familia. Interesantemente, el análisis de agrupamiento basado en el transcriptoma de las plaquetas, agrupó los casos P1 y P2 de forma separada a P3 y los controles.

Los ensayos realizados en este estudio no pueden determinar el mecanismo de patogenicidad de las variantes p.Gln268* y p.Thr196Ala. Los dos principales mecanismos asumidos en RUNX1-RD son la haploinsuficiencia o un efecto dominante-negativo, estando el último altamente relacionado con el desarrollo de neoplasias^{29,33,38}. La delección de genes completos, alteraciones de *splicing*, las mutaciones *nonsense* y *frameshift* en la región N-terminal de *RUNX1* pueden dar lugar a haploinsuficiencia; por el contrario, las mutaciones *missense* en el dominio RHD, y las mutaciones *nonsense* y *frameshift* en la región C-terminal pueden generar mutantes de *RUNX1* con un efecto dominante-negativo^{29,33,38}. De manera similar a las variantes p.Arg201* o p.Arg204*³⁸, para la variante p.Gln268* el mecanismo esperado es un efecto dominante negativo por la pérdida de los dominios TAD e ID que da como resultado una proteína *RUNX1* disfuncional con mayor capacidad para dimerizar y secuestrar a CBF β . Además, la variante *missense* p.Thr196Ala afecta al dominio RHD (implicado en la unión al ADN y en la heterodimerización con CBF β), donde se localizan la mayoría de las variantes patogénicas¹². Aunque para este cambio de aminoácido el mecanismo no es tan obvio, también predcimos un efecto dominante negativo basado en la asignación de las variantes p.Arg166Gln y p.Arg201Gln^{33,38} y en el perfil de expresión génica similar con la variante sin sentido p.Gln268*.

Los estudios que han evaluado la función plaquetaria en pacientes con variantes de la línea germinal *RUNX1* son aún limitados y no definen un perfil claro de disfunción plaquetaria^{26,39-42}. Se han descrito varias alteraciones en rasgos plaquetarios, solas o en combinación, entre las que se incluye un defecto en la agregación, la secreción de gránulos, la activación de α IIb β 3, la fosforilación de plekstrina y en la producción de 12-HETE^{22,43,44}. En concordancia con la reciente descripción de *ITGA2* como una nueva diana de *RUNX1*²⁴, en nuestros pacientes P1 y P2, pero no P3, encontramos niveles reducidos de GPIa. La activación reducida de la integrina α IIb β 3 se ha reportado previamente en un paciente *RUNX1*, que también mostraba una alterada respuesta de agregación a múltiples agonistas³⁹. Nuestro paciente P2 mostró una agregación plaquetaria defectuosa con todos los agonistas testados, incluido el CRP. Sin embargo, en la paciente P1 el defecto de agregación no fue generalizado y se presentó principalmente en respuesta a CRP y colágeno, y en menor medida con ADP. De forma similar, otros autores mostraron que el defecto de agregación es variable en pacientes con patología de *RUNX1*, y que parece depender del agonista siendo común

para colágeno y epinefrina^{26,40,41}. Previamente, se ha demostrado en estos pacientes una alterada capacidad de activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, valorada mediante la unión de PAC1 o fibrinógeno en respuesta a ADP y trombina²⁶. Nuestros pacientes muestran una severa reducción en la unión de fibrinógeno tras estimulación con CRP, y en el caso de P1 también con PAR1 y PMA. En un reciente estudio hemos observado la alteración funcional del eje PMA-PKC en ratones portadores de la variante p.Leu56Ser de *RUNX1*⁴⁵, lo que apoya que la proteína quinasa C theta (PKC- θ) es diana de *RUNX1*⁴⁴. Finalmente, la alteración en los gránulos α y δ es un rasgo frecuente, aunque no siempre constante, que se observa en los pacientes con *RUNX1*^{26,32,38,42}. Aunque solo el paciente P1 presentó una reducción significativa en el número de gránulos δ , ambos pacientes P1 y P2 presentaron una reducida secreción de gránulos δ . En contraste, *Michaud et al.*³⁸ demostraron un reducido contenido de gránulos δ en este tipo de pacientes. Con respecto a los gránulos α , solo P2 mostró una secreción alterada de P-selectina; sin embargo, de manera similar a un paciente *RUNX1*²⁴, nuestros pacientes mostraron una ligera alteración en el contenido de gránulos α , evaluados por tinción inmunofluorescente en frotis sanguíneos de los marcadores vWF, trombospondina e incluso P-selectina. De hecho, *G. Jalagadugula et al.*²⁹ describieron una disminución del contenido de vWF en pacientes con *RUNX1* causada por una regulación a la baja de los genes implicados en el tráfico de proteínas RE-Golgi, en lugar de la regulación directa del gen vWF por *RUNX1*. Finalmente, un hallazgo relevante en este proyecto es la observación de expresión de CD34 en plaquetas de un paciente con variantes en *RUNX1*. Anteriormente, solo el estudio de *Marneth et al.*⁴² ha observado este fenómeno en las plaquetas de dos familias con trombocitopenia asociada a mutaciones en *RUNX1*. Este dato sugiere, una maduración defectuosa de Mks en estos enfermos o que el propio *RUNX1* puede estar involucrado en el silenciamiento de CD34 durante la megacariopoyesis normal.

En general, estos resultados reflejan la gran variabilidad en las anomalías plaquetarias entre los pacientes con *RUNX1*, confirman el predominio de un defecto en la respuesta del colágeno^{24,26} y postulan por primera vez que la señalización de CRP-GPVI es otra ruta alterada en esta patología. De hecho, *Glembostsky et al.*²⁴ mostraron que la ausencia de agregación con colágeno, que está mediada principalmente por GPVI, puede estar contribuida por otro mecanismo aparte de la disminución de $\alpha\text{2}\beta\text{1}$. Además, nuestros hallazgos apoyan que en *RUNX1*-IT, como en *GFI1*-IT, una proporción variable de plaquetas puede expresar CD34.

En cuanto a la trombocitopenia, nuestro objetivo fue estudiar la megacariopoyesis en el paciente P1 disponible. Al igual que *D. Bluteau et al.*⁴⁶, confirmamos un defecto en la proliferación y maduración de los megacariocitos del paciente. Lamentablemente, la falta de viabilidad de las células no permitió confirmar el defecto en la formación de proplaquetas ya descrito en esta patología.

La extensa lista de anomalías plaquetarias refleja que la haploinsuficiencia de RUNX1 es compleja y surge por múltiples mecanismos mediados por varios genes modulados por el factor de transcripción RUNX1. Más allá de su aplicación en el diagnóstico, utilizamos el perfil de expresión plaquetaria para obtener información sobre los genes diana que controlan el fenotipo de los pacientes con RUNX1, caracterizados por trombocitopenia, disfunción plaquetaria y predisposición a neoplasias hematológicas. Así, presentamos por primera vez una lista de genes *upregulados* en estos pacientes, que está compuesta por genes relacionados con el metabolismo proteico o de origen eritroide, reflejando una alta similitud transcriptómica de las plaquetas RUNX1, probablemente más inmaduras, con las plaquetas neonatales²¹. Es de destacar que el gen más sobreexpresado es el que codifica la anhidrasa carbónica I [CAI]. Sorprendentemente, se ha demostrado un aumento específico de la actividad del CAI en pacientes con leucemia mieloide crónica y metaplasia mieloide agnogénica, lo que sugiere un posible papel del CAI en la progresión de los trastornos mieloides a través del pH extracelular ácido^{47,48}. También observamos una upregulación del gen que codifica la latexina, que se ha descrito como un nuevo supresor de tumores en neoplasias hematológicas, ausente o disminuido significativamente en células primarias de pacientes con LMA y en líneas celulares de leucemia³⁴. La latexina actúa de forma endógena en las células madre hematopoyéticas regulando negativamente la proliferación (aumentando la apoptosis y disminuyendo la autorrenovación)⁴⁹, lo que es compatible con un defecto en la diferenciación a megacariocitos de las células CD34⁺. Su upregulación en el contexto de RUNX1 es desconcertante y necesitamos más estudios para determinar su importancia biológica. Otros genes interesantes con aumento de expresión fueron el IFITM3, cuya alta expresión se ha asociado a un pronóstico adverso en la LMA⁵⁰, y SHIP-1, también denominado INPP5D, que es un regulador negativo de la función de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ⁵¹ y de la secreción de gránulos densos mediada por GPVI⁵².

Los mecanismos subyacentes a la trombocitopenia, la disfunción plaquetaria y la predisposición a neoplasias hematológicas en el FPD/AML siguen siendo desconocidos. Cabe destacar que los 120 genes infraexpresados en estos pacientes pueden incluirse en 3 grupos funcionales, cada uno de los cuales podría explicar las diferentes características descritas en RUNX-1-RD. En primer lugar, la trombocitopenia es una característica importante de la haploinsuficiencia de RUNX1 y se ha explicado con un defecto de la megacariopoyesis y la producción de proplaquetas por la desregulación de dos genes de citoesqueleto (*MYH9* y *MYL9*)^{46,53} y del gen *MPL* que codifica el receptor de trombopoyetina⁵⁴. Sin embargo, nuestro análisis del transcriptoma respalda el concepto de que el mecanismo de la trombocitopenia es más complejo y está causado por la alteración combinada de un conjunto de genes de citoesqueleto controlados por RUNX1. Observamos un defecto en genes ya descritos, pero también alteración de otros genes diana relevantes, de los cuales cerca del 50% están involucrados en la organización de los filamentos de actina. Esta lista de genes incluye,

entre otros, *FLNA*, *TPM4* y *FLII*, que son donde se han identificado mutaciones asociadas a trombocitopenia congénita⁵⁵⁻⁵⁷. Aunque la β 1-tubulina es la principal isoforma de tubulina involucrada en TC, también observamos una expresión reducida de *TUBA1B* consistente con una organización alterada de α -tubulina en las plaquetas de nuestros pacientes. El papel fundamental del citoesqueleto de actina en la producción y función de las plaquetas ha sido bien ilustrado en trastornos en humanos y ratones y esto constituye una alteración clave en las plaquetas de pacientes con RUNX1. La implicación de los filamentos de actina en la biogénesis plaquetaria sigue siendo clara, debido a que las variantes genéticas en *ACTB* causan una trombocitopenia sindrómica⁵⁸. Curiosamente, y compatible con nuestros hallazgos para FPD/AML, se ha descrito que en pacientes con leucemia mieloide crónica, las células mieloides diferenciadas presentan defectos en varias funciones dependientes de la actina⁵⁹. Así, destacamos un subgrupo de genes implicados en el citoesqueleto de actina infraexpresados, como *ABLIM1*, *ABLIM3*, *EMD*, *VCL* y *ACTG1* cuyo papel en la función o formación plaquetaria en RUNX1-RD requiere de más estudios. Más allá de su contribución en la biogénesis plaquetaria, también informamos de la regulación a la baja de genes de proteínas del citoesqueleto con un papel predominante en la función plaquetaria, como *WDR1* y *COTL1*^{60,61}.

En concordancia con la disfunción plaquetaria presente en RUNX1-RD, identificamos un grupo de genes infraexpresados que codifican proteínas involucradas en la transducción de señales, que incluye factores de transcripción, receptores plaquetarios, proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos y el tráfico de vesículas. Con respecto a los factores de transcripción, además de NF-E2²⁶, añadimos dos nuevos factores de transcripción hematopoyética, *GFI1B* y *USF2*, que también podrían estar regulados por RUNX1. La expresión aberrante de CD34 en plaquetas maduras, se ha asociado solo con trastornos hemorrágicos monogénicos causados por mutaciones en los factores de transcripción GFI⁶² y recientemente en RUNX1⁴². Estos hallazgos nos llevan a proponer que *GFI1B* es una nueva diana de *RUNX1*, de modo que su infraexpresión podría explicar la presencia de CD34 en las plaquetas de los pacientes RUNX1. Esta observación podría justificar la similitud entre GFI1B-RD y RUNX1-RD. En apoyo de esta observación, se ha descrito recientemente la expresión de CD34 en plaquetas de un paciente con una delección en CBF β ⁶³. Así, sugerimos que la pérdida de función en el complejo RUNX1-CBF β , altera la expresión de GFI1B y determina la aparición de CD34 en plaquetas.

Una alteración importante en los pacientes con RUNX1 es la activación de α IIb β 3 por mecanismos aún desconocidos. Nuestro estudio mostró una reducida expresión de tres genes implicados en la activación de esta integrina: *ITGB3BP*, *FERMT3* y *CD151* que codifican para β 3-endonexina⁶⁴, kidlin-3⁶⁵ y el miembro de la familia de la tetraspanina CD151⁶⁶ respectivamente. La expresión defectuosa de la β 3-endonexina, que participa en el cambio conformal de la integrina α IIb β 3, ya ha sido reportada

previamente²⁷ en un paciente. Además, nuestro estudio también muestra la alteración de genes implicados en el metabolismo lipídico, que median la producción de metabolitos que podrían estar implicados en la respuesta plaquetaria a agonistas como *ALOX12* (previamente descrito) y otros como *LIPA*, *ORMDL3*, *TMEM189* y *HRASLS*. La alterada respuesta al colágeno de los pacientes *RUNX1* se ha explicado parcialmente por la downregulación de GPIa y del receptor ITIM TLT-1²⁴. Aquí, sugerimos otro gen potencialmente contribuyente en este defecto, que es *PANX1*, el cual codifica un canal de ATP plaquetario cuya inhibición afecta severamente la agregación plaquetaria inducida por colágeno y la formación de coágulos *in vivo*^{67,68}. Finalmente, otro hallazgo novedoso en nuestro estudio es la identificación de un eje CRP-GPVI alterado que podría explicar principalmente la respuesta defectuosa del colágeno de las plaquetas *RUNX1*. Sugerimos que la alteración en esta señalización ITAM es el resultado de dos genes regulados negativamente en nuestros pacientes: *SEMA4D* y *PTPRJ*. Sema4D se expresa en plaquetas y amplifica la activación plaquetaria al promover la activación de la tirosina quinasa, Syk, aguas abajo del receptor de colágeno, GPVI/FcRγ. Los ratones que carecen de *sema4D* exhiben una oclusión arterial retardada después de una lesión vascular *in vivo*, y sus plaquetas presentan respuestas disminuidas al colágeno^{69,70}. Centrándonos en *PTPRJ*, se ha descrito una nueva forma de trombocitopenia hereditaria caracterizada por sangrado espontáneo, plaquetas de pequeño tamaño y respuesta plaquetaria alterada a colágeno y convulxina, agonistas de GPVI, debido a la activación reducida de Syk^{71,72}.

La transformación de FPD/AML en mielodisplasia es la cuestión clínicamente más relevante en esta patología y, lamentablemente, el mecanismo que controla su debut es poco conocido. Las mutaciones heterocigotas de *RUNX1* por sí solas no son suficientes para el desarrollo de leucemias; se ha reportado que una segunda mutación en *RUNX1*, *CDC25C*, modificadores epigenéticos, factores de *splicing* y supresores tumorales son el mecanismo que contribuye al desarrollo de la neoplasia⁸. Además, *Bluteau et.al.*²⁵ proponen que la regulación a la baja de *NR4A3* puede conducir directamente al desarrollo de una neoplasia mieloide y podría representar una potencial diana terapéutica. Nosotros encontramos una expresión reducida en genes que están involucrados en el ciclo celular, en la reparación o interacción del ADN o que se ha relacionado con eventos oncogénico. Estos genes podrían arrojar luz sobre nuevos genes regulados por *RUNX1* y podrían representar potenciales biomarcadores o dianas terapéuticas. La expresión reducida de *THBS1* y su receptor *CD36* en pacientes con *RUNX1* se postula como un eje interesante que requiere más estudios. El contenido de trombospondina-1 está reducida en las plaquetas de los pacientes *RUNX1* y en los pacientes aquí descritos²⁶. La trombospondina-1 es sintetizada por megacariocitos, células endoteliales, fibroblastos y algunas células tumorales, que se encuentran en los gránulos α de las plaquetas y la matriz extracelular, y se considerado un inhibidor angiogénico que además induce la apoptosis en las células de leucemia megacariocítica a través de la señalización de *CD36* y caspasa-3⁷³.

Para concluir, este estudio expande el repertorio genético de RUNX1-RD y refleja claramente que el fenotipo plaquetario, los estudios de segregación familiar y el transcriptoma plaquetario apoyan la patogenicidad de las variantes de RUNX1 p.Gln268* y p.Thr196Ala, pero no de la de p.Asn159Ser. El análisis del transcriptoma de plaquetas aparece como una herramienta útil en la caracterización patogénica de nuevas variantes moleculares que afectan a factores de transcripción en pacientes con TC, como RUNX1, y puede ayudar a identificar nuevos genes diana de estos factores de transcripción. Por lo tanto, identificamos tres grupos principales de genes downregulados que podrían explicar las características clínicas del FPD/AML: trombocitopenia, disfunción plaquetaria y predisposición a neoplasias hematológicas. Interesantemente, informamos de la alteración en el citoesqueleto de actina; la infraexpresión de GFI1B como mecanismo para la expresión de CD34 en plaquetas de estos pacientes y una señalización reducida de CRP-GPVI como el mecanismo principal que contribuye a la respuesta alterada al colágeno en estos pacientes.

5. Referencias

1. Almazni I, Stapley R, Morgan N V. Inherited Thrombocytopenia: Update on Genes and Genetic Variants Which may be Associated With Bleeding. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019;6(June):1–9.
2. Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: A growing list of disorders. *Hematology.* 2017;2017(1):385–399.
3. Johnson B, Fletcher SJ, Morgan N V. Inherited thrombocytopenia: novel insights into megakaryocyte maturation, proplatelet formation and platelet lifespan. *Platelets.* 2016;27(6):519–525.
4. Melazzini F, Zaninetti C, Balduini CL. Bleeding is not the main clinical issue in many patients with inherited thrombocytopaenias. *Haemophilia.* 2017;23(5):673–681.
5. Bastida JM, Benito R, Lozano ML, et al. Molecular Diagnosis of Inherited Coagulation and Bleeding Disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019;45(7):695–707.
6. Nurden AT, Nurden P. Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica.* 2020;105(8):2004–2019.
7. Kurokawa M. AML1/Runx1 as a versatile regulator of hematopoiesis: Regulation of its function and a role in adult hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* 2006;
8. Yokota A, Huo L, Lan F, Wu J, Huang G. The Clinical, Molecular, and Mechanistic Basis of RUNX1 Mutations Identified in Hematological Malignancies. *Mol. Cells.* 2020;
9. Wang Q, Stacy T, Binder M, et al. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;
10. Schlegelberger B, Heller PG. RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin. Hematol.* 2017;
11. Martinez M, Hinojosa M, Trombly D, et al. Transcriptional auto-regulation of RUNX1 P1 promoter. *PLoS One.* 2016;
12. Morgan N V., Daly ME. Gene of the issue: RUNX1 mutations and inherited bleeding. *Platelets.* 2017;
13. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2018;103(1):148–162.
14. Johnson B, Lowe GC, Futterer J, et al. Whole exome sequencing identifies genetic

- variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica*. 2016;101(10):1170–1179.
15. Brown AL, Arts P, Carmichael CL, et al. RUNX1-mutated families show phenotype heterogeneity and a somatic mutation profile unique to germline predisposed AML. *Blood Adv*. 2020;
 16. Lentaigne C, Freson K, Laffan MA, Turro E, Ouwehand WH. Inherited platelet disorders: Toward DNA-based diagnosis. *Blood*. 2016;
 17. Greinacher A, Eekels JJM. Diagnosis of hereditary platelet disorders in the era of next-generation sequencing: “primum non nocere.” *J. Thromb. Haemost.* 2019;
 18. Lozano ML, Cook A, Bastida JM, et al. Novel mutations in RASGRP2, which encodes CalDAG-GEFI, abrogate Rap1 activation, causing platelet dysfunction. *Blood*. 2016;128(9):1282–1289.
 19. Hardy AT, Palma-Barqueros V, Watson SK, et al. Significant Hypo-Responsiveness to GPVI and CLEC-2 Agonists in Pre-Term and Full-Term Neonatal Platelets and following Immune Thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.* 2018;118(6):1009–1020.
 20. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J. Rare Dis*. 2014;9:213.
 21. Caparrós-Pérez E, Teruel-Montoya R, López-Andreo MJ, et al. Comprehensive comparison of neonate and adult human platelet transcriptomes. *PLoS One*. 2017;
 22. Songdej N, Rao AK. Hematopoietic transcription factor mutations: Important players in inherited platelet defects. *Blood*. 2017;
 23. Jalagadugula G, Goldfinger LE, Mao G, Lambert MP, Rao AK. Defective RAB1B-related megakaryocytic ER-to-Golgi transport in RUNX1 haplodeficiency: Impact on von Willebrand factor. *Blood Adv*. 2018;
 24. Glembotsky AC, Sliwa D, Bluteau D, et al. Downregulation of TREM-like transcript-1 and collagen receptor $\alpha 2$ subunit, two novel RUNX1-targets, contributes to platelet dysfunction in familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2019;
 25. Bluteau D, Gilles L, Hilpert M, et al. Down-regulation of the RUNX1-target gene NR4A3 contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;
 26. Glembotsky AC, Bluteau D, Espasandin YR, et al. Mechanisms underlying platelet function defect in a pedigree with familial platelet disorder with a predisposition to acute myelogenous leukemia: Potential role for candidate RUNX1 targets. *J. Thromb. Haemost.* 2014;
 27. Sun L, Gorospe JR, Hoffman EP, Rao AK. Decreased platelet expression of myosin regulatory light chain polypeptide (MYL9) and other genes with platelet dysfunction and CBFA2/RUNX1 mutation: Insights from platelet expression profiling. *J. Thromb. Haemost.* 2007;
 28. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*. 2017;
 29. Koh CP, Wang CQ, Ng CEL, et al. RUNX1 meets MLL: Epigenetic regulation of hematopoiesis by two leukemia genes. *Leukemia*. 2013;
 30. Uchino R. Domain analyses of the Runx1 transcription factor responsible for modulating T-cell receptor- β /CD4 and interleukin-4/interferon- γ expression in CD4+ peripheral T lymphocytes. *Immunology*. 2009;
 31. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978–1980.
 32. Stockley J, Morgan N V., Bem D, et al. Enrichment of FLI1 and RUNX1 mutations in families with excessive bleeding and platelet dense granule secretion defects. *Blood*. 2013;
 33. Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, et al. Haematological spectrum and genotype-

- phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J. Rare Dis.* 2016;
34. Liu Y, Howard D, Rector K, et al. Latexin Is Down-Regulated in Hematopoietic Malignancies and Restoration of Expression Inhibits Lymphoma Growth. *PLoS One.* 2012;
 35. Greinacher A, Pecci A, Kunishima S, et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2017;
 36. Duployez N, Fenwarth L. Controversies about germline RUNX1 missense variants. *Leuk. Lymphoma.* 2020;
 37. Langabeer SE, Owen CJ, McCarron SL, et al. A novel RUNX1 mutation in a kindred with familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukaemia: Male predominance of affected individuals. *Eur. J. Haematol.* 2010;
 38. Michaud J, Wu F, Osato M, et al. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: Implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood.* 2002;
 39. Gabbeta J, Yang X, Sun L, et al. Abnormal inside-out signal transduction-dependent activation of glycoprotein IIb-IIIa in a patient with impaired pleckstrin phosphorylation. *Blood.* 1996;
 40. Downton S, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li F. Studies of a familial platelet disorder. *Blood.* 1985;
 41. Gerrard JM, Israels ED, Bishop AJ, et al. Inherited platelet-storage pool deficiency associated with a high incidence of acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1991;
 42. Marneth AE, Van Heerde WL, Hebeda KM, et al. Platelet CD34 expression and a/d-granule abnormalities in GFI1B- and RUNX1-related familial bleeding disorders. *Blood.* 2017;
 43. Kaur G, Jalagadugula G, Mao G, Rao AK. RUNX1/core binding factor A2 regulates platelet 12-lipoxygenase gene (ALOX12): Studies in human RUNX1 haplodeficiency. *Blood.* 2010;
 44. Jalagadugula G, Mao G, Kaur G, Dhanasekaran DN, Rao AK. Platelet protein kinase C- θ deficiency with human RUNX1 mutation: PRKCQ is a transcriptional target of RUNX1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;
 45. Marín-Quílez A, García-Tuñón I, Fernández-Infante C, et al. Characterization of the Platelet Phenotype Caused by a Germline RUNX1 Variant in a CRISPR/Cas9-Generated Murine Model. *Thromb. Haemost.* 2021;
 46. Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, et al. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood.* 2012;
 47. Bonapace G, Iuliano F, Molica S, Peta A, Strisciuglio P. Cytosolic carbonic anhydrase activity in chronic myeloid disorders with different clinical phenotype. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2004;
 48. Mboge MY, Mahon BP, McKenna R, Frost SC. Carbonic anhydrases: Role in pH control and cancer. *Metabolites.* 2018;
 49. Zhang C, Liang Y. Latexin and hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 2018;
 50. Liu Y, Lu R, Cui W, et al. High IFITM3 expression predicts adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Ther.* 2020;
 51. Maxwell MJ, Yuan Y, Anderson KE, et al. SHIP1 and Lyn kinase negatively regulate integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *J. Biol. Chem.* 2004;
 52. Chari R, Kim S, Murugappan S, et al. Lyn, PKC- δ , SHIP-1 interactions regulate GPVI-mediated platelet-dense granule secretion. *Blood.* 2009;
 53. Jalagadugula G, Mao G, Kaur G, et al. Regulation of platelet myosin light chain (MYL9) by RUNX1: Implications for thrombocytopenia and platelet dysfunction in RUNX1

- haplodeficiency. *Blood*. 2010;
54. Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, et al. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood*. 2005;
 55. Ieda D, Hori I, Nakamura Y, et al. A novel truncating mutation in FLNA causes periventricular nodular heterotopia, Ehlers-Danlos-like collagenopathy and macrothrombocytopenia. *Brain Dev*. 2018;
 56. Pleines I, Woods J, Chappaz S, et al. Mutations in tropomyosin 4 underlie a rare form of human macrothrombocytopenia. *J. Clin. Invest*. 2017;
 57. Saultier P, Vidal L, Canault M, et al. Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: Ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica*. 2017;
 58. Latham SL, Ehmke N, Reinke PYA, et al. Variants in exons 5 and 6 of ACTB cause syndromic thrombocytopenia. *Nat. Commun*. 2018;
 59. Molli PR, Pradhan MB, Advani SH, Naik NR. RhoA: A therapeutic target for chronic myeloid leukemia. *Mol. Cancer*. 2012;
 60. Scheller I, Stritt S, Beck S, et al. Coactosin-like 1 integrates signaling critical for shear-dependent thrombus formation in mouse platelets. *Haematologica*. 2020;
 61. Dasgupta SK, Le A, Da Q, et al. Wdr1-dependent actin reorganization in platelet activation. *PLoS One*. 2016;
 62. Rabbolini DJ, Morel-Kopp MC, Ward CM, Stevenson WS. GFI1B variants associated with thrombocytopenia. *Platelets*. 2017;28(5):525–527.
 63. van Bergen MGJM, Saes JL, Simons A, et al. Platelet CD34 expression in a patient with a partial deletion of transcription factor subunit CBFβ. *Am. J. Hematol*. 2020;
 64. Kashiwagi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, et al. Affinity modulation of platelet integrin $\alpha(\text{IIb})\beta 3$ by $\beta 3$ -endonexin, a selective binding partner of the $\beta 3$ integrin cytoplasmic tail. *J. Cell Biol*. 1997;
 65. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med*. 2008;
 66. Lau LM, Wee JL, Wright MD, et al. The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ signaling and platelet function. *Blood*. 2004;
 67. Molica F, Morel S, Meens MJ, et al. Functional role of a polymorphism in the pannexin1 gene in collagen-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost*. 2015;
 68. Molica F, Meens MJ, Pelli G, et al. Selective inhibition of Panx1 channels decreases hemostasis and thrombosis in vivo. *Thromb. Res*. 2019;
 69. Zhu L, Bergmeier W, Wu J, et al. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2007;
 70. Wannemacher KM, Jiang H, Hess PR, et al. An expanded role for semaphorin 4D in platelets includes contact-dependent amplification of Clec-2 signaling. *J. Thromb. Haemost*. 2013;
 71. Marconi C, Di Buduo CA, LeVine K, et al. Loss-of-function mutations in PTPRJ cause a new form of inherited thrombocytopenia. *Blood*. 2019;
 72. Wen R, Wang D. PTPRJ: A novel inherited thrombocytopenia gene. *Blood*. 2019;
 73. Mo Yang, PhD, Enyu Liang, MB, Lijing Mao, MB, Beng H Chong, PhD, Chunfu Li M. Thrombospondin-1 Induces Apoptosis in Megakaryocytic Leukemia Via CD36 and Caspase-3 Signaling [abstract]. *Blood*. 2016;128(22):5209.

Anexo Capítulo IV: Ampliación del espectro genético del desorden RUNX1-RD y comprensión de su presentación clínica a través del perfil transcriptómico de pacientes con RUNX1-RD.

1. Figuras Suplementarias

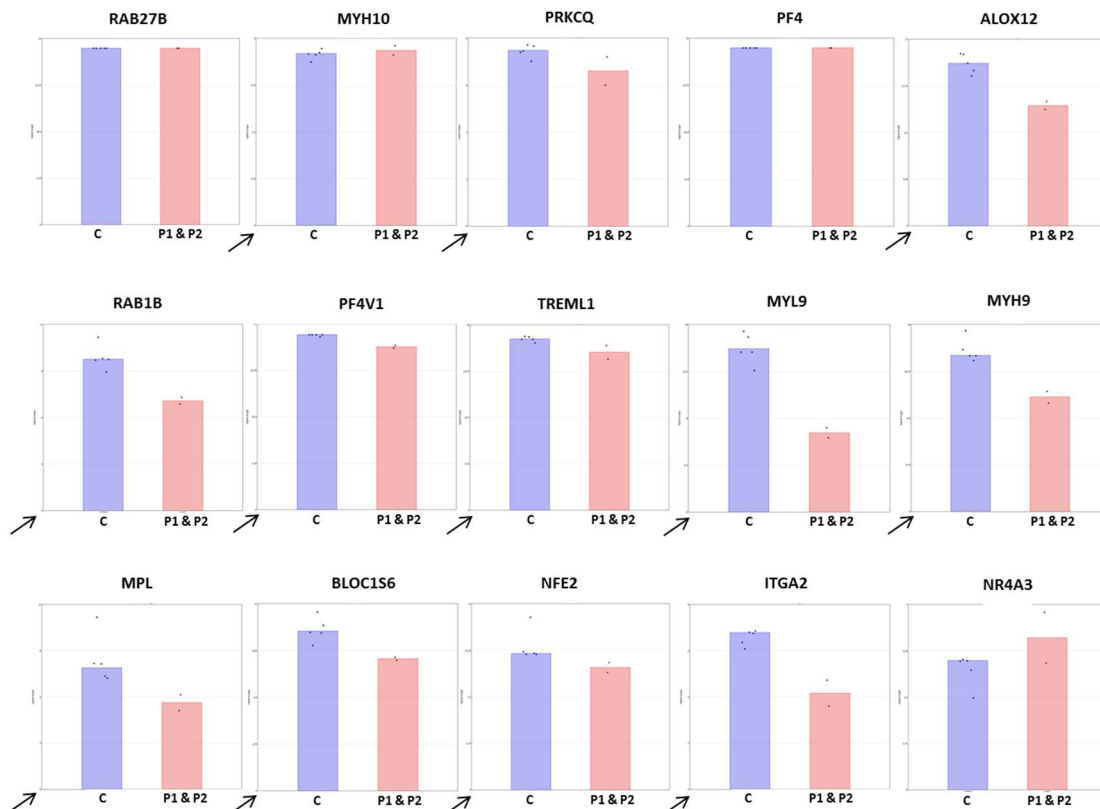
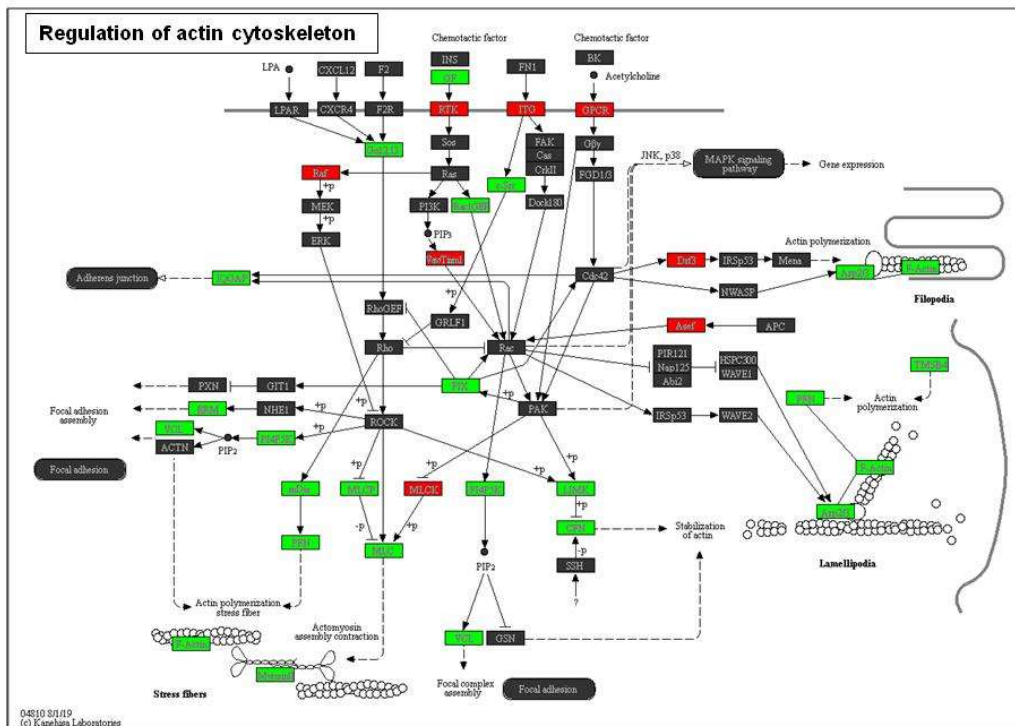


Figura Suplementaria S1. Perfil transcriptómico de P1 y P2 considerando las señales de intensidad del array para las 15 dianas descritas de RUNX1. Una comparación del perfil del transcriptoma plaquetario individual de nuestros pacientes (P1 y P2) con el perfil medio de 5 controles sanos mediante el uso de señales de intensidad de matriz (valores RMA), considerando 15 genes regulados por RUNX1 descritos anteriormente. Las gráficas se obtuvieron con el software TAC (Transcriptome Analysis Console 3.0, Affymetrix, ThermoFisher Scientific). El array se realizó en el GeneChip Clariom D Array (Affymetrix, ThermoFisher) (Affymetrix, Santa Clara, CA).

A



B

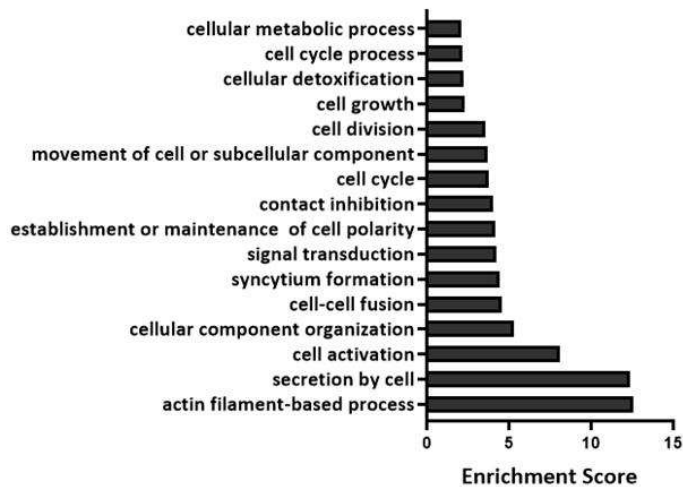


Figura Suplementaria S2. Rutas biológicas y análisis de enriquecimiento génico considerando genes diferencialmente expresados entre pacientes y controles. A) Aplicamos el análisis Partek de Partek Genomics Suite y Partek Pathway vinculado a la base de datos KEGG a la lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.05$) entre pacientes RUNX1 (P1 y P2) y controles sanos ($n=5$). La vía más alterada corresponde a la vía relacionada con la regulación del citoesqueleto de actina donde aparecen alterados diferentes mediadores. Los genes infraexpresados están coloreados en verde y los supraexpresados en rojo. B) Los análisis de enriquecimiento genético se realizaron tras considerar los 120 genes downregulados en el algoritmo GO biological process (<http://geneontology.org>).

2. Tabla Suplementaria

Tabla Suplementaria S1. 50 genes más supraexpresados en pacientes con RUNX1-RD.

Gen	Descripción	Fold Change	P-value
CA1	carbonic anhydrase I	140,04	0,0005
ALAS2	5-aminolevulinate synthase 2	81,98	0,0066
SLC25A30	solute carrier family 25, member 30	58,36	0,0002
TCP11L2	t-complex 11, testis-specific-like 2	54,35	0,0051
HBA2	hemoglobin, alpha 2	36,26	0,0065
BPGM	2,3-bisphosphoglycerate mutase	31,99	0,0042
HBA1	hemoglobin, alpha 1	30,96	0,0081
SLC25A37	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37	24,87	0,0071
SLC4A1	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1 (Diego blood group)	23,57	0,0190
FECH	ferrochelatase	21,91	0,0026
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	21,71	0,0007
S100A12	S100 calcium binding protein A12	21,47	0,0336
AHSP	alpha hemoglobin stabilizing protein	21,08	0,0020
PITHD1	PITH (C-terminal proteasome-interacting domain of thioredoxin-like) domain containing 1	19,97	0,0086
LXN	latexin	17,34	0,0137
CPM	carboxypeptidase M	15,08	1,10E-07
BLVRB	biliverdin reductase B	15,08	0,0106
GYPA	glycophorin A (MNS blood group)	14,92	0,0187
RPS21	ribosomal protein S21	14,58	0,0249
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	14,56	0,0003
MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	13,36	0,0008
RPL27	ribosomal protein L27	12,86	0,0114
RPL34	ribosomal protein L34	12,14	0,0173
SLC10A7	solute carrier family 10, member 7	11,37	0,0052
EPB42	erythrocyte membrane protein band 4.2	11,27	0,0335
CCDC122	coiled-coil domain containing 122	10,25	0,0017
TRHDE	thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme	9,57	0,0442
NDUFA12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	9,4	0,0014
SCLT1	sodium channel and clathrin linker 1	9,01	0,0016
SNX2	sorting nexin 2	8,41	0,0401
TBPL1	TBP-like 1	8,03	0,0017
MEST	mesoderm specific transcript	7,96	6,83E-05
INPP5D	inositol polyphosphate-5-phosphatase D	7,85	0,0151
ZNF385B	zinc finger protein 385B	7,85	0,0002
STRADB	STE20-related kinase adaptor beta	7,78	0,0451
UGGT2	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2	7,75	0,0125

CHAMP1	chromosome alignment maintaining phosphoprotein 1	7,49	0,0009
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	7,46	0,0397
RNU6ATAC	RNA, U6atac small nuclear (U12-dependent splicing)	7,41	0,0465
C11orf87	chromosome 11 open reading frame 87	7,38	1,67E-05
RSBN1L	round spermatid basic protein 1-like	7,33	0,0058
RNF217	ring finger protein 217	7,32	0,0238
FAM133B	family with sequence similarity 133, member B	7,18	0,0129
KLRB1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	7,15	0,0123
TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	7,13	0,0231
CLK1	CDC like kinase 1	7,01	0,0015
DCAF12	DDB1 and CUL4 associated factor 12	6,76	0,0215
PIGC	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class C	6,59	6,78E-05
GYPC	glycophorin C (Gerbich blood group)	6,57	0,0005
PAPOLA	poly(A) polymerase alpha	6,52	0,0036

Capítulo V

**Nuevas aproximaciones de terapia génica a través del uso
de vectores lentivirales para la Trombastenia de
Glanzmann.**

*Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de
fecha 14 Julio 2021*

Conclusiones

En este proyecto de Tesis Doctoral se ha alcanzado el diagnóstico clínico, funcional y molecular de serie de 50 pacientes que pertenecen a 14 familias no emparentadas, se ha demostrado la patogenicidad de 10 variantes moleculares en 4 genes diferentes, y se han sentado bases pre-clínicas para el desarrollo de un vector viral con futura aplicación clínica en el tratamiento de la Trombastenia de Glanzmann.

Las conclusiones o aspectos generales más destacados en cada uno de los estudios que integran esta Tesis son:

Capítulo I: La variante p.Asn143Ser de COX-1, identificada aquí por primera vez en una niña española de ascendencia asiática, se asocia con disfunción plaquetaria *aspirina-like* y con sangrado relevante. La variante provoca la pérdida de un glicano en el dominio catalítico de la enzima. Ésta, o cualquier otra, forma hipoglicosilada en esta posición provoca que la enzima pierda su actividad catalítica. Interesantemente, la mutación ejerce un efecto dominante negativo sobre la funcionalidad del alelo silvestre, justificando el carácter dominante del trastorno plaquetario en la paciente. Este caso, el tercero en el mundo de TPC por patología de *PTGS1*, demuestra por primera vez la criticidad del N-Glycano 143 en la COX-1 humana y refuerza, en una nueva proteína, el defecto de glicosilación como mecanismo de enfermedad.

Capítulo II: Reportamos un nuevo pedigrí, el cuarto hasta la fecha en todo el mundo, con SRC-RT debido a la variante p.E527K. Evidenciamos que en SRC-RT coexisten alteraciones plaquetarias con otras complicaciones clínicas como infecciones recurrentes y manifestaciones autoinmunes o alteraciones neurológicas que van desde defecto del lenguaje hasta cuadros de epilepsia severos. La SRC-RT aparece como una enfermedad atípica que desde la perspectiva clínica es difícil de diferenciar de la inmunotrombocitopenia. Identificamos que la activación y señalización mediada por la quinasa de Bruton está incrementada en plaquetas de los pacientes, sugiriendo que los inhibidores de BTK podría ser una opción terapéutica para las manifestaciones autoinmunes de esta patología.

Capítulo III: Ampliamos notablemente el espectro clínico y genético de *TUBB1*-RT al haber podido caracterizar la serie más larga de casos con *TUBB1*-RT descrita hasta la fecha, identificando 6 variantes en *TUBB1*, 3 de ellas nuevas. La patogenicidad de estas variantes se avala por su rareza, segregación familiar y, en el caso de las 4 *missense*, por el efecto deletéreo sobre la tubuina $\beta 1$ en plaquetas y en modelos de CHO y en la formación *in vitro* de proplaquetas. La penetrancia incompleta parece un hecho frecuente en este tipo de trombocitopenia genética. Por primera vez, describimos que en algunos casos, el patrón de herencia de la *TUBB1*-RT puede ser autosómico recesivo, y la carga alélica es relevante en el desarrollo de la enfermedad. Este trabajo también se ilustra la importancia de caracterizar series grandes de cada tipo de TPC a la hora de adaptar los criterios generales de patogenicidad de las variantes genéticas establecidos por el ACMG, a los diferentes tipos de TPC, como ya han hecho grupos de expertos para la TG y la *RUNX1*-RT.

Capítulo IV: Estudiando, de forma amplia y novedosa, tres casos con sospecha de *RUNX1*-RT, demostramos la patogenicidad de las variantes de *RUNX1* p.Gln268* y p.Thr196Ala, y no así la de p.Asn159Ser. Nuestro estudio apoya que el análisis del transcriptoma plaquetario es una herramienta potencialmente útil en la caracterización patogénica de variantes moleculares nuevas identificadas en genes de factores de transcripción, como *RUNX1*, y además puede

ayudar a identificar nuevos genes diana de estos factores. Una selección de los 120 genes infraexpresados se pueden agrupar en 3 categorías funcionales: i) genes implicados en el citoesqueleto que podrían justificar la trombocitopenia, genes implicados en la señalización celular que podrían justificar la disfunción plaquetaria, y iii) genes implicados en la interacción con el ADN, el ciclo celular o con procesos oncogénicos que explicarían la predisposición a neoplasia hematológica de estos pacientes.

Capítulo V: Los resultados de este estudio demuestran la utilidad del sistema CRISPR/Cas9 para generar de forma barata, rápida y sencilla modelo de células CD34⁺ con TPC como la Trombastenia de Glanzmann [*CD34+TG-like*]. Resulta viable diseñar y producir un vector viral para guiar la expresión correcta de genes plaquetarios que puedan estar alterados en pacientes con TPC. Así los estudios preclínicos realizados muestran la eficacia de nuestro vector para revertir el fenotipo patológico de las células *TG-like*. Ello anticipa su potencial aplicabilidad clínica como terapia génica en pacientes con Trombastenia de Glanzmann.

Conclusions

In this Doctoral Thesis project, the clinical, functional and molecular diagnosis of series of 50 patients belonging to 14 unrelated families has been achieved, the pathogenicity of 10 molecular variants in 4 different genes has been demonstrated, and pre-clinical studies have been established for development of a viral vector with future clinical application in Glanzmann's Thrombasthenia.

The most relevant conclusions in each of the studies making up this Thesis are:

Chapter I: The p.Asn143Ser variant in COX-1, first identified here in a Spanish girl of Asian origin, is associated with aspirin-like platelet dysfunction and relevant bleeding. The variant causes the loss of a glycan in the catalytic domain of the enzyme. This, or any other, hypoglycosylated form at this position causes the loss of the enzyme catalytic activity. Interestingly, the mutation exerts a dominant negative effect on the functionality of the wild-type allele, justifying the dominant character of the platelet disorder in the patient. This case, the third in the world of Inherited Platelet Disorders [IPD] due to *PTGS1* pathology, demonstrates, for the first time, the criticality of N-Glycan 143 in human COX-1 and reinforces, in a new protein, the glycosylation defect as a disease mechanism.

Chapter II: We report a new pedigree, the fourth to date worldwide, with SRC-RT due to the p.E527K variant. We show that in SRC-RT, platelet alterations coexist with other clinical complications such as recurrent infections, autoimmune manifestations or neurological alterations ranging from a language defect to severe epilepsy. SRC-RT appears as an atypical disease that is difficult to differentiate from immunothrombocytopenia from a clinical perspective. We identified that activation and signaling mediated by Bruton's kinase is increased in platelets of SRC-RT patients, suggesting that BTK inhibitors could be a therapeutic option for the autoimmune manifestations of this pathology.

Chapter III: We have notably expanded the clinical and genetic spectrum of TUBB1-RT by characterizing the longest series of cases with this inherited thrombocytopenia described to date, identifying 6 variants in *TUBB1*, 3 of them new. The pathogenicity of these variants is supported by their rarity, family segregation and, in the case of the 4 missense, by the deleterious effect on β 1 tubulin in platelets and in CHO models and in the *in vitro* proplatelet formation. Incomplete penetrance appears to be a common occurrence in this type of genetic thrombocytopenia. For the first time, we describe that the inheritance pattern of TUBB1-RT can be autosomal recessive in some cases, and the allelic load is relevant in the development of the disease. This work also illustrates the importance of characterizing large series of each type of IPD when adapting the general criteria of pathogenicity of genetic variants established by the ACMG, to the different types of TPC, as has already been done by groups of experts for the GT and the RUNX1-RT.

Chapter IV: Studying, in a broad and novel way, three cases with suspected RUNX1-RT, we demonstrate the pathogenicity of the *RUNX1* variants p.Gln268 * and p.Thr196Ala, and not that of p.Asn159Ser. Our study supports that platelet transcriptome analysis is a potentially useful tool in the pathogenic characterization of new molecular variants identified in transcription factor genes, such as RUNX1, and can also help identify new target genes for these factors. A selection of the 120 under-expressed genes can be grouped into 3 functional categories: i) genes involved in the cytoskeleton that could account for thrombocytopenia, genes involved in cell signaling that could account for platelet dysfunction, and iii) genes involved in interaction with DNA, the cell cycle or with oncogenic processes that would explain the predisposition to hematological neoplasia in these patients.

Chapter V: The results of this study demonstrate the usefulness of the CRISPR/Cas9 system to generate cheaply, quickly and easily CD34⁺ cells modeling IPD such as Glanzmann's Thrombasthenia [CD34⁺ GT-like]. It is feasible to design and produce a viral vector to guide the correct expression of platelet genes that may be altered in patients with IPD. The preclinical studies carried out showed the efficacy of our vector to correct the pathological phenotype of the CD34⁺ GT-like cells. This anticipates its potential clinical applicability as gene therapy in patients with Glanzmann's Thrombasthenia.

Publicaciones integrales de la Tesis Doctoral:

1. Palma-Barqueros V; Revilla N; Sánchez A; et al. **Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview.** *International Journal of Molecular Sciences*. 26/04/2021.
2. Palma-Barqueros V; Crescente M; De la Morena ME; *et al.* **A novel genetic variant in PTGS1 affects N-glycosylation of cyclooxygenase-1 causing a dominant-negative effect on platelet function and bleeding diathesis.** *American Journal of Hematology*. 15/12/2020.
3. Palma-Barqueros V; Bohdan N; Revilla N; Vicente V; Bastida JM; Rivera J. **PTGS1 gene variations associated with bleeding and platelet dysfunction.** *Platelets*. 25/06/2020.
4. Palma-Barqueros V, Revilla N, Zaninetti C, Sanchez A, Zamora-Cánovas A, Bohdan N, Marín-Quiles A, Fuster J, Greinacher A, Vicente V, Rivera J, Lozano ML. **Src-related thrombocytopenia - a fine line between a megakaryocyte dysfunction and an immune mediated disease.** *Blood advances*. [Bajo 1^º revisión].
5. Palma-Barqueros V, Bury L, Kunissima S, et.al. **Expanding the genetic spectrum of TUBB1-related thrombocytopenia.** *Blood Advances*. [Aceptado].
6. Palma-Barqueros V, Bohdan N, Bastida JM; et. al. **Expanding the genetic spectrum of RUNX1-RD through the transcriptome profile of patients with RUNX1 mutations.** [*Pendiente de someter*].
7. Palma-Barqueros V, Mesa-Nuñez C, Damian C, et.al. **Towards the lentiviral-mediated gene therapy for Glanzmann thrombasthenia.** [*Manuscrito en preparación*].

Publicaciones relacionadas con el marco de investigación de la Tesis Doctoral (fisiopatología plaquetaria), con contribución relevante:

1. Lee RH; Piatt R; Dhenge A; Lozano ML; Palma-Barqueros V; Rivera J; Bergmeier W. **Impaired hemostatic activity of healthy transfused platelets in inherited and acquired platelet disorders: Mechanisms and implications.** *Science Translational Medicine*. 11 - 522, 11/12/2019.
2. Palma-Barqueros V; Torregrosa JM; Caparrós-Pérez E; Mota-Pérez N; Bohdan N; Llanos MC; Jurak Begonja A; Sola-Visner M; Vicente V; Teruel-Montoya R; Rivera J; Ferrer-Marin F. **Developmental Differences in Platelet Inhibition Response to Prostaglandin E1.** *Neonatology*. 117 - 1, 2020.
3. Palma-Barqueros V; Ruiz-Pividal J; Bohdan N; Vicente V; Bastida JM; Lozano M; Rivera J. **RASGRP2 gene variations associated with platelet dysfunction and bleeding.** *Platelets*. 30 - 4, pp. 535 - 539. 08/03/2019.
4. Palma-Barqueros V*; Hardy AT*; Watson SK; Malcor JD; Eble JA; Gardiner EE; Blanco JE; Guijarro-Campillo R; Delgado JL; Lozano ML; Teruel-Montoya R; Vicente V; Watson SP; Rivera J; Ferrer-Marín F. **Significant Hypo-Responsiveness to GPVI and CLEC-2 Agonists in Pre-Term and Full-Term Neonatal Platelets and following Immune Thrombocytopenia.** *Thrombosis and Haemostasis*. 25/04/2018.
5. Bastida JM; Lozano ML; Benito R; Janusz K; Palma-Barqueros V; Del Rey M; Hernández-Sánchez JM; Riesco S; Bermejo N; González-García H; Rodríguez-Allen A; Aguilar C; Sedivas T; López-Fernández MF; Marneth A; Reijden B; Morgan N; Watson SP; Vicente V; Hernández-

Rivas JM; Rivera J; González-Porras JR. **Introducing high-throughput sequencing into mainstream of genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders.** *Haematologica*. 103-1, pp. 148 - 162. 01/2018.

6. Bastida JM; Morais S; Palma-Barqueros V; Benito R; Bermejo M; Karkucak M; Trapero-Marugan M; Bohdan N; Pereira M; Marin-Quilez A; Oliveira J; Yucel Y; Santos R; Padilla J; Janusz K; Lau C; Martinez-Izquierdo M; Couto E; Ruiz-Pividal JF; Vicente V; Hernández-Rivas JM; Gonzalez-Porras JM; Lozano ML; Lima M; Rivera J. **Identification of novel variants in ten patients with Hermansky-Pudlak syndrome by high-throughput sequencing.***Annals of Medicine*. 16/04/2019.

7. A Marín-Quilez; I García-Tuñón; C Fernández-Infante; L Hernández-Cano; V Palma-Barqueros; E Vuelta; M Sánchez-Martin; JR González-Porras; C Guerrero; R Benito; J Rivera; JM Hernández-Rivas; JM Bastida. **Characterization of the Platelet Phenotype Caused by a Germline RUNX1 Variant in a CRISPR/Cas9-Generated Murine Model.** *Thrombosis and Haemostasis*. 18/02/2021.

8. Bastida JM; Benito R; Lozano ML; Marin-Quilez A; Janusz K; Martin-Izquierdo M; Hernández-Sánchez J; Palma-Barqueros V; Hernández-Rivas JM; Rivera J; González-Porras JR. **Molecular Diagnosis of Inherited Coagulation and Bleeding Disorders.***Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 04/2019.

9. Caparros-Perez E; Teruel-Montoya R; Palma-Barqueros V; Torregrosa JM; Blanco JE; Delgado JL; Lozano ML; Vicente V; Sola-Visner M; Rivera J; Martinez C; Ferrer-Marin F. **Down regulation of the Munc18b-syntaxin-11 complex and b1-tubulin impairs secretion and spreading in neonatal platelets.** *Thrombosis and Haemostasis*. 117 - 11, pp. 2079 - 2091. 11/2017.

10. Caparrós-Pérez E; Teruel-Montoya R; Lopéz-Andreo MJ; Llanos MC; Rivera J; Palma-Barqueros V; Blanco JE; Vicente V; Martínez C; Ferrer-Marín F. **Comprehensive comparison of neonate and adult human platelet transcriptomes.***PLOS ONE*. 12 - 8, 16/08/2017

11. Sevivas T; Bastida JM; Pau DS; Caparros-Perez E; Palma-Barqueros V; Coucelo M; Marques D; Ferrer-Marin F; González-Porras JR; Vicente V; Hernández-Rivas JM; Watson SP; Lozano ML; Bergmeier W; Rivera J. **Identification of two novel mutations in RASGRP2 affecting platelet CaLDAG-GEFI expression and function in patients with bleeding diathesis.***Platelets*. 1, pp. 1 - 4. 01/08/2017.

Además se considera la presentación de ~40 abstracts en Congresos nacionales e internacionales del campo de la Hematología (SETH, CIBERER, ISTH, ECTH, Gordon Conference, ESGCT, Platelet Meeting).

