

# Pruebas de laboratorio para el estudio de la función plaquetaria y diagnóstico de los trastornos plaquetarios congénitos

## Platelet function testing for diagnosis of congenital platelet disorders

Rivera J, Palma-Barqueros V, Vicente V, Lozano ML

*Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, CB15/00055-CIBERER, Murcia, Spain*

Jose.rivera@carm.es



IV CURSO EDUCACIONAL  
DE LA ISTH - BLOQUE 2  
PLAQUETAS

HEMATOLOGÍA  
Volumen 22 • Número Extraordinario  
XIII Congreso del Grupo CAHT: 238-251  
Septiembre 2018

**Palabras claves:** estudios de función plaquetaria, trastornos plaquetarios congénitos, secuenciación de alto rendimiento.

**Keywords:** platelet function testing, congenital platelet disorders, high throughput sequencing.

### Objetivos educacionales

- Conocer las pruebas de función plaquetaria más usadas/útiles en el diagnóstico funcional de los TPC.
- Conocer cómo se aborda y la relevancia del diagnóstico molecular de los TPC.

### Resumen

Los trastornos plaquetarios congénitos (TPC) son un grupo de enfermedades raras con un fenotipo clínico y de laboratorio muy heterogéneo, causadas por patología molecular que afecta a proteínas relevantes en la formación y/o la función de las plaquetas. Aunque el rasgo común de los TPC es una predisposición al sangrado mucocutáneo, esta complicación se presenta con una enorme variabilidad individual.

Además, en muchos TPC, aparte del sangrado más o menos relevante, los pacientes tienen riesgo de desarrollar alteraciones en distintos órganos y tejidos o neoplasias. El diagnóstico precoz y preciso de los TPC es esencial para su adecuado manejo clínico. Como en otras enfermedades, el diagnóstico de los TPC requiere en primer lugar de una adecuada investigación clínica, seguida de un estudio de laboratorio con pruebas generales de bioquímica y coagulación, hemograma y frotis y análisis del fenotipo funcional de las plaquetas. Finalmente, se debe abordar el estudio molecular que identifique la patología molecular responsable de la enfermedad y confirme definitivamente el diagnóstico de TPC. Para la identificación de pacientes con TPC y la carac-

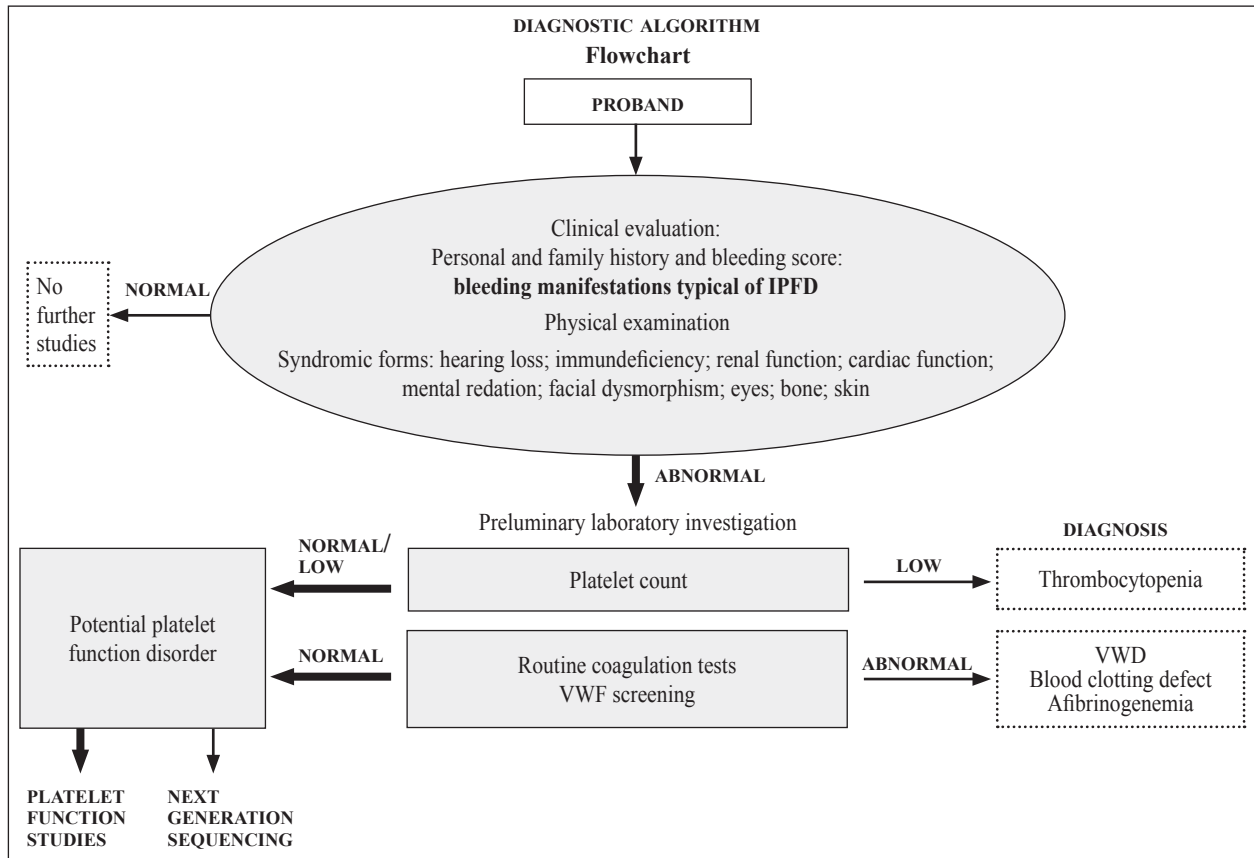
terización de su fenotipo de laboratorio, disponemos de una amplia batería de pruebas de función de las plaquetas. Ello incluye test de cribado automático o semi-automático, y pruebas con finalidad diagnóstica como la agregometría, la citometría de flujo o la microscopía. En los últimos años ha existido un interés creciente en la comunidad científica por establecer recomendaciones en la realización e interpretación de estas pruebas de función plaquetaria, en particular en el diagnóstico de pacientes con TPC. El diagnóstico definitivo de los TPC se logra identificando la patología molecular subyacente. Hasta hace poco el estudio molecular de los TPC se hacía, casi exclusivamente, por secuenciación de Sanger de genes candidatos identificados en base al fenotipo clínico y de laboratorio de los enfermos. Sin embargo, estamos ya en la era genómica, y el estudio molecular de los TPC, como de otras enfermedades, se aborda ahora, de una forma menos dirigida, mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS) de paneles de genes o incluso de todo el exoma o del genoma. En pocos años esta tecnología ha expandido notablemente el conocimiento de los TPC. No obstante, también tiene limitaciones como el manejo bioinformático de la gran cantidad de datos moleculares obtenidos, y la correcta interpretación de la patogenicidad de las variantes candidatas. Reconociendo el valor potencial de la identificación de alteraciones moleculares, hay tener presente que asignaciones incorrectas de patogenicidad molecular pueden ser perjudiciales para el enfermo. Por ello, aunque estemos ya inmersos en la nueva era genómica, es fundamental no despreciar la importancia de evaluación clínica del enfermo y del análisis detallado de su fenotipo plaquetario. En esta revisión describimos brevemente los ensayos usados en la caracterización funcional y molecular de TPC.

## Introducción

Las plaquetas, pequeños discos anucleados derivados de la fragmentación de los de los megacariocitos (MKs), tienen un papel principal en la hemostasia. Su participación comienza con su adhesión a la matriz subendotelial, continúa con su extensión, activación y agregación sobre la zona de lesión, y finaliza proporcionando una superficie celular óptima que activa la coagulación y favorece la formación de un trombo estable que evita el sangrado y facilita la reparación del vaso<sup>(1)</sup>. La relevancia de esta función

hemostática de las plaquetas se refleja muy bien en la tendencia hemorrágica asociada a las deficiencias cuantitativas o cualitativas de las mismas, ya sean adquiridas o congénitas<sup>(2,3)</sup>. Está bien demostrado que las plaquetas también desempeñan un papel preponderante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares (síndromes coronarios agudos, el infarto cerebral, la enfermedad vascular periférica y la diabetes mellitus)<sup>(4)</sup>. También hay ya una evidencia incontestable de la participación de estas células en otros muchos procesos como la biología vascular, la inflamación, la inmunidad o el cáncer<sup>(5)</sup>. Como se ha explicado en detalle en otra revisión de este volumen (Trastornos plaquetarios congénitos: ayer y hoy), los trastornos plaquetarios congénitos (TPC) son un grupo amplio de enfermedades raras (1:10<sup>4</sup> a 1:10<sup>6</sup>), muy heterogéneo en cuanto a su fenotipo clínico y de laboratorio. Los TPC son debidos a patología molecular en genes que codifican proteínas relevantes en la formación de las plaquetas (megacariopoyesis o trombopoyesis), o importantes para la estructura y función plaquetaria (receptores plaquetarios, proteínas de señalización y/o secreción, elementos del citoesqueleto..., etc.)<sup>(6,7)</sup>. El rasgo común de todos estos TPC es una predisposición de los enfermos al sangrado mucocutáneo, aunque se presenta con una enorme variabilidad individual. En algunos pacientes el sangrado aparece ya la infancia y puede ser clínicamente muy relevante (incluso de compromiso vital), mientras que en otros aparece sólo en situaciones de compromiso hemostático, como ser tratamientos con drogas, cirugías o partos<sup>(2)</sup>. Igualmente, en muchos TPC el defecto genético subyacente no afecta de forma exclusiva a las plaquetas, sino que también se dan anomalías en otros órganos y tejidos<sup>(6,8)</sup>.

La heterogeneidad clínica y de laboratorio de los TPC ha sido tradicionalmente una limitación para su diagnóstico precoz y preciso, y ha llevado a que muchos enfermos no se diagnostiquen o alcancen la edad adulta sin diagnóstico, exponiéndose a un riesgo alto de manejo clínico inadecuado<sup>(9)</sup>. De acuerdo con las recomendaciones de expertos<sup>(2,9-12)</sup> la evaluación diagnóstica de los trastornos plaquetarios congénitos requiere una investigación clínica exhaustiva, un estudio de laboratorio con pruebas generales de bioquímica y coagulación, hemograma y frotis, con especial atención a la cifra de plaquetas y su morfología, y el análisis del fenotipo funcional de las plaquetas



**Figura 1.** Algoritmo diagnóstico de los TPC recomendado por el Subcomité de Fisiología Plaquetaria de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia<sup>(10)</sup>.

Durante más de un siglo de investigación en fisiología plaquetaria se ha desarrollado una amplia batería de pruebas de laboratorio para valorar la función de las plaquetas, muchas de las cuales son útiles para el diagnóstico funcional de los TPC. Sin embargo, muchas adolecen de pobre estandarización, limitada reproducibilidad y escasa especificidad. Así, para la mayoría de los TPC, una sola prueba permite alcanzar un diagnóstico funcional inequívoco de los TPC, en la mayoría de casos, se usan en etapas diferentes tipos de ensayos de valoración de la morfología y funcionalidad plaquetaria<sup>(9,12-14)</sup>.

Por otra parte, la confirmación diagnóstica definitiva de los TPC se alcanza con la identificación de la patología molecular subyacente. Hasta hace unos años este estudio molecular se hacía mediante la estrategia de seleccionar genes candidatos en base al fenotipo clínico y de laboratorio de los enfermos, y secuenciarlos mediante el método de Sanger<sup>(9)</sup>. Sin embargo, estamos ya en la era genómica y el estudio molecular de los TPC, como de otras enfermedades, se aborda, de una forma menos dirigida, ya

en primera opción con la poderosa herramienta de la secuenciación de alto rendimiento o HTS (antes conocida como NGS), simultáneamente de múltiples genes, de todo el exoma o incluso de todo el genoma<sup>(15-17)</sup>. En pocos años esta tecnología ha expandido notablemente el conocimiento de los TPC, y ha permitido elevar a cerca de 70 los tipos de TPC reconocidos.

Aquí presentamos una breve revisión de los ensayos usados en la caracterización funcional y molecular de TPC.

### Métodos de análisis de la función plaquetaria

Como se ha dicho ya, la batería de pruebas de función plaquetaria es actualmente amplia y diversa (Tabla 1).

**Tabla 1.** Pruebas de función plaquetaria

Prueba	Aspecto valorado	Ventajas	Desventajas
<b>Tiempo de sangrado</b>	Duración de sangrado <i>in vivo</i> tras incisión estándar	Prueba de hemostasia fisiológica	Poco reproducible, insensible, invasivo
<b>Agregación en plasma rico en plaquetas (PRP)</b>	Agregación entre plaquetas valorada por cambio de transmisión de luz del PRP tras activación con agonistas y a bajo flujo	Muy versátil (agonistas/dosis) Es el método de referencia Diagnóstico	Laborioso, caro, personal cualificado. Exige alto volumen de sangre y manipulación previa. Respuesta plaquetaria en condiciones no fisiológicas. No válido si hay trombopenia severa
<b>Agregación en sangre total (ST)</b>	Agregación entre plaquetas valorada por cambio de impedancia en ST tras adición de agonistas.	Versátil Menos volumen de ST y sin manipulación.	Limpieza de electrodos (no en los nuevos equipos) Menos sensible que agregación estándar en PRP. No detecta la segunda onda.
<b>Lumiagregometría (PRP o ST)</b>	Agregación entre plaquetas (cambio de transmisión de luz si PRP o impedancia si ST) y liberación de ATP/ADP por aumento de luminiscencia.	Informativo de agregación y secreción granular.	Las mismas de la agregación
<b>Ensayos bioquímicos de proteínas de activación</b>	Concentración de proteínas granulares en suero, o plasma (basal o tras activación plaquetaria) (PF4, $\beta$ -TG, sCD40L, etc.) medida por ELISA/RIA.	Cuantitativos y sensibles. Ensayos comerciales muy estandarizados.	Requieren una estricta obtención y manipulación de las muestras; laboriosos y caros.
<b>Ensayos bioquímicos de metabolitos de ácido araquidónico</b>	Concentración de TxB <sub>2</sub> o 11-dehidro-TxB <sub>2</sub> en plasma, suero u orina, medida por ELISA/RIA	Cuantitativo y sensible Ensayos comerciales estandarizados (AspirinWorks®). Método de referencia para efecto de aspirina.	Requieren una estricta obtención y manipulación de las muestras (sobre todo si PRP estimulado); largos y caros; alta influencia de función renal (11-d-TxB <sub>2</sub> ).
<b>Unión con ligandos radiactivos</b>	Unión específica de ligandos radiactivos (anticuerpos, proteínas adhesivas, agonistas) a receptores.	Cuantitativos y muy sensibles.	Muy laborioso y caro; personal e instalaciones autorizadas para uso de radiactividad.
<b>Citometría de flujo</b>	Unión de ligandos marcados con fluorocromos a plaquetas, usando un citómetro de flujo; cuantificación de agregados entre plaquetas o entre plaquetas y leucocitos.	Poco volumen de muestra (ST, PRP, o plaquetas lavadas); muy versátil (identificación de receptores; marcadores de activación, agregados celulares, micropartículas, etc.); uso cada vez más extendido.	Personal cualificado; reactivos caros; los citómetros son equipos caros y delicados.
<b>Plateletworks® ICHOR</b>	Disminución del recuento de plaquetas tras la activación con agonistas.	Simple y rápido; poco volumen de ST; ensayo comercial disponible; posible en laboratorios clínicos.	Método indirecto, depende de la respuesta de agregación.
<b>PFA-100®</b>	Tiempo de formación de un trombo oclusivo sobre membrana trombogénica en condiciones de alto flujo.	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos. Amplia experiencia de uso.	Inflexible; caro; muy dependiente de hematocrito, FvW y recuento plaquetas; no específico, insensible a deficiencias moderadas

Prueba	Aspecto valorado	Ventajas	Desventajas
<b>VerifyNow®</b>	Agregación de plaquetas sobre bolas cargadas con fibrinógeno, en respuesta a agonistas.	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos. Licencia FDA para monitorización de antiagregantes.	Inflexible; caro; no específico; limitada experiencia
<b>Impact®</b>	Adhesión y agregación a alto flujo sobre superficie trombogénica.	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos. Versátil (varios modelos).	En vías de comercialización; limitada experiencia
<b>Hemostasis Analysis System® (HAS)</b>	Fuerza contráctil plaquetaria, elasticidad del trombo, generación de trombina.	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos.	Contempla básicamente de función procoagulante; limitada experiencia
<b>Tromboelastografía (TEG®, ROTEM®)</b>	Velocidad y calidad de la formación del trombo.	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos.	Contempla básicamente de función procoagulante (salvo uso de agonistas); limitada experiencia de uso
<b>Generación de trombina (Thrombinoscope®)</b>	Incremento de fluorescencia proporcional a la generación de trombina.	Simple y rápido; poco volumen de sangre total, plasma o PRP plasma; posible en laboratorios clínicos.	Contempla básicamente de función procoagulante; escasa estandarización; requiere estricta manipulación de muestras; personal cualificado; limitada experiencia

## Ensayos de cribado

### Tiempo de sangrado

El tiempo de sangrado (TS), desarrollado por Duke en 1910 y modificado por Ivy, es el ensayo más antiguo usado para la valoración de la función de las plaquetas. Consiste en medir el tiempo que tarda en detenerse el sangrado después de realizar una pequeña incisión en la cara anterior del antebrazo. El TS normal oscila entre 2 y 10 minutos, y se prolonga hasta más de 30 minutos en pacientes con defectos plaquetarios o con enfermedad de von Willebrand (EvW) severa. Esta técnica fue muy popular en el pasado y aún se usa en muchos laboratorios<sup>(18)</sup>, pero por su escasa reproducibilidad actualmente no está recomendada para el diagnóstico de TPC<sup>(10)</sup>.

### PFA-100

El Analizador de Función Plaquetaria (PFA-100®, Dade-Behring) valora automáticamente la adhesión y agregación plaquetaria inducida simultáneamente por una alta velocidad de flujo y por una mezcla de colágeno con ADP o con epinefrina. Esencialmente, una muestra de sangre (0,8 mL) anticoagulada con citrato se dispensa en el reservorio de un cartucho desechable que contiene un capilar dirigido hacia una membrana con un orificio de 150 µm de diámetro, que está recubierta de colágeno y ADP (col-

ADP), o con colágeno y epinefrina (col-Epi). Al iniciar el ensayo, un vacío constante (40 mbar) hace que la sangre circule a alto flujo (4000-6000 s<sup>-1</sup>) por el capilar hasta atravesar el orificio de la membrana del cartucho. El alto flujo, que *per se* induce activación, la presencia de colágeno, que promueve la adhesión de las plaquetas vía GP Ib/IX, y la activación inducida por el ADP/epinefrina de la membrana y por los componentes intraplaquetarios liberados *in situ* provocan la formación de un trombo plaquetario que termina por impedir el flujo de sangre a través del orificio. Así, la respuesta hemostática se expresa como el tiempo necesario para obstruir el flujo (TO). Algunos autores han propuesto para el TO la definición de TS *in vitro*. Conceptualmente, TO muy largos estarían asociados a hipofunción plaquetaria y tiempos muy cortos a hiperreactividad. El equipo está diseñado para cuantificar sólo TO inferiores a 300s, superado este tiempo el ensayo se corta automáticamente y el resultado se expresa como TO>300 s.

El PFA-100 ofrece simplicidad y rapidez, escaso requerimiento de sangre, y la valoración de la respuesta hemostática bajo condiciones de alto flujo. Por contra, es un equipo inflexible (los dos tipos de

cartuchos mencionados arriba, y uno de uso menos habitual que evalúa sólo reactividad plaquetaria al ADP [P2Y<sub>12</sub> innovance]), de limitada sensibilidad frente a trastornos leves por la intensa activación que induce, y con una pobre especificidad. El test es sensible a múltiples variables, aparte de la función plaquetaria intrínseca, en particular la cifra de plaquetas, el hematocrito, y el contenido de FvW en la muestra de sangre. Así, un TO normal con ambos cartuchos prácticamente excluye la existencia de un trastorno severo de la hemostasia primaria, pero no descarta un trastorno muy moderado. Un TO anormal no es diagnóstico y requiere confirmación con otras pruebas.

El ensayo PFA-100 ofrece una alta sensibilidad, alrededor del 80%, en la detección de pacientes con EvW, aunque tiene escaso valor en la caracterización de la severidad y tipo de la enfermedad. Su sensibilidad también es muy alta frente a defectos severos de receptores plaquetarios (trombastenia de Glanzmann [TG] o síndrome de Bernard Soulier [SBS]), pero menor y muy variable (<50% en promedio) en deficiencias granulares y de secreción, y en alteraciones de la señalización plaquetaria que normalmente cursan con clínica hemorrágica moderada. Otra limitación de la prueba PFA-100 es su falta de especificidad, y su uso no permite discriminar por ejemplo entre una EvW y un trastorno plaquetario, o entre un paciente con un defecto plaquetario moderado y un individuo que ha tomado aspirina u otros antiplaquetarios. Así, en base a la gran cantidad de estudios realizados, es controvertida la fiabilidad de esta prueba en el diagnóstico de TPC, y la recomendación general es considerar el PFA-100 en todo caso como un ensayo opcional en la evaluación rutinaria de la disfunción plaquetaria<sup>(10,19)</sup>.

### VerifyNow

El sistema VerifyNow® (Accumetrics Inc.) se basa en el mismo principio que la agregación plaquetaria, es decir la medida del cambio en la turbidez o la transmisión de luz a través de una muestra de sangre como consecuencia de la formación de agregados de plaquetas inducida con un agonista. Básicamente, el sistema es un fotómetro compacto automático en el que se insertan unos cartuchos de plástico con muestras de sangre. Estos cartuchos incluyen bolas recubiertas de fibrinógeno que sirven de soporte de la agregación, y un agonista plaquetario que varía

según el tipo de prueba. Iniciado el ensayo, el detector mide automáticamente (16 veces/s) la transmisión de luz a través de la muestra, y calcula la velocidad de aglutinación en función de la pendiente de cambio de la absorbancia. El resultado se imprime automáticamente expresado en unidades arbitrarias de respuesta al agonista.

El diseño de este sistema se ha enfocado particularmente a la monitorización de la terapia antiagregante, y se han comercializado tres modalidades de ensayo: a) VerifyNow IIB/IIIa dirigido a la monitorización de la terapia con antagonistas de GP IIB/IIIa; b) VerifyNow Aspirin para valorar el efecto de la aspirina; c) VerifyNow P2Y<sub>12</sub> para el control del tratamiento con antagonistas del receptor de ADP denominado P2Y<sub>12</sub>. Nosotros hemos usado este test en la evaluación de algunos enfermos con TPC moderados sin encontrar una alteración relevante, pero la experiencia de este ensayo en el contexto de los TPC es muy limitada<sup>(20)</sup>.

### Impact: analizador de cono y placa

El Impact® (Matis Medical), es otro equipo compacto y semiautomatizado que intenta reproducir la hemostasia midiendo la adhesión y agregación plaquetaria bajo condiciones de alto flujo (1800 s<sup>-1</sup>). En este caso, una pequeña muestra de sangre anticoagulada (130 µL) se dispensa en una placa de poliestireno (en la versión previa recubierta de colágeno o matriz extracelular). En la placa se coloca entonces un cono que se hace girar a gran velocidad generando un alto flujo que induce la adhesión y agregación de las plaquetas a la superficie trombogénica de la placa. El instrumento dispone de un microscopio y realiza de forma automática la tinción y análisis de imagen de las plaquetas adheridas y agregadas. Los resultados, obtenidos en sólo 6 minutos, se expresan como superficie media cubierta y tamaño medio de los trombos formados. Existe una versión modificada del test concebida para valorar la agregación plaquetaria inducida por agonistas. En esta versión la sangre problema se preincuba con dosis bajas de agonistas (ADP 0,75 µM, TRAP 5 µM, o ácido araquidónico 0,275 mM; 1 minuto con suave agitación), lo que induce trombocitopenia en la muestra por la formación de microagregados. La sangre se ensaya entonces con Impact y el resultado se compara con el obtenido en paralelo en otra muestra no tratada con el agonista. La activación con esas dosis

bajas de agonista induce una disminución significativa y transitoria en la adhesión de las plaquetas a la superficie trombogénica de la placa.

En el ensayo Impact, la adhesión es dependiente del hematocrito y del recuento plaquetario, con disminuciones significativas por debajo de valores del 30% y de  $25 \cdot 10^9/L$ , respectivamente. La reducida adhesión observada con muestras de sangre de pacientes con trombostenia de Glanzmann (TG), con afibrinogenemia, y con enfermedad de von Willebrand (EvW) tipo III, pone de manifiesto la relevancia que tiene en este ensayo la inmovilización de fibrinógeno y FvW en la placa, y la interacción de estas proteínas con sus receptores GP IIb/IIIa y GP Ib/IX<sup>(21)</sup>. Nosotros hemos usado recientemente esta prueba para demostrar que las plaquetas anormales de los pacientes con TG compiten con las normales en la adhesión, lo que puede explicar la limitada eficacia de las transfusiones de plaquetas en pacientes con TG que tienen un recuento de plaquetas normal.

### Otros ensayos

Además de los comentados arriba, durante los últimos años se han desarrollado otros equipos y ensayos, la mayoría de ellos usados sólo con fines de investigación básica (Tabla 1). Entre estos, destaca la tromboelastografía, una vieja técnica de valoración de la formación del trombo, incorporada recientemente en equipos automatizados (TEG<sup>®</sup>, ROTEM<sup>®</sup> Gamma). Tradicionalmente usada en el ámbito quirúrgico como marcador del riesgo de sangrado, la aplicación en tromboelastografía de activadores plaquetarios que inducen agregación más que coagulación (Thrombelastograph Platelet Mapping System<sup>®</sup> que usa ADP y ácido araquidónico) amplía la potencial utilidad de estos equipos en la valoración de la terapia antiagregante.

La experiencia de uso de tromboelastografía en el estudio de TPC también es muy limitada. En pacientes con SBS o con TG se ha visto que la formación y estabilidad de los trombos está alterada<sup>(22)</sup>.

### Diagnóstico funcional de TPC

#### Agregación plaquetaria

El estudio de la agregación plaquetaria es el método de referencia y el más usado en la identificación y diagnóstico de la disfunción plaquetaria<sup>(10,18)</sup>. El ensayo clásico, desarrollado de forma independiente por Born y O'Brien a principios de los años sesenta,

se basa en medir el aumento en la transmisión de luz a través de una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP) mantenido en agitación, tras inducir la agregación con un agonista (ADP, colágeno, epinefrina, etc.). El PRP del paciente es la muestra más opaca (0% de transmisión de luz o 0% de agregación) y su plasma pobre en plaquetas (PPP) la máxima transparencia alcanzable (100% de agregación). El patrón de agregación más clásico es bifásico, con una primera onda que corresponde a la respuesta primaria al agonista añadido, y una segunda onda en la que intervienen los agonistas producidos y/o secretados de los gránulos *in situ* por las propias plaquetas. Esta respuesta bifásica puede quedar enmascarada cuando se usan concentraciones muy altas de agonistas que inducen respuestas primarias muy intensas. Además de la amplitud de la agregación (% de agregación máxima), otros parámetros como el tiempo de inicio o *lag time*, y la pendiente o velocidad de agregación también son característicos de la respuesta plaquetaria a cada agonista. Su valoración también puede informar de alteraciones funcionales específicas.

La gran ventaja de la agregación plaquetaria es su flexibilidad en cuanto a los agonistas y concentraciones posibles, lo que nos permite obtener información relevante sobre distintos aspectos de la bioquímica y función plaquetaria. Además, el ensayo muestra una buena relación dosis-respuesta y es compatible con varios tipos de anticoagulantes (citrato, heparina, ACD-A, PPACK). Existen varios modelos de agregómetros (Aggrecoorder II de Menarini Inc., PAP-8E de Bio/Data Co., Model 490 4+4 Optical o M700 de Chrono-Log Co.) que facilitan la realización y estandarización de la técnica, y que permiten el análisis simultáneo de varias muestras y el registro informatizado de los resultados. Algunos de estos equipos pueden medir al mismo tiempo transmisión de luz y luminiscencia, los llamados lumiagregómetros, y así analizan simultáneamente la agregación plaquetaria y la secreción de nucleótidos de los gránulos plaquetarios durante la segunda onda de agregación.

Entre las limitaciones de la agregación plaquetaria, destaca en primer lugar que mide la respuesta plaquetaria bajo condiciones no fisiológicas, en una muestra de plaquetas aisladas de otras células sanguíneas, con una agitación moderada equivalente a una baja velocidad de turbulencia o *shear rate*, y

tras la adición exógena de un(os) agonista(s) a dosis arbitrarias. Además, se trata de un procedimiento caro, laborioso y relativamente complejo que requiere personal entrenado en su realización. El volumen de sangre necesario es grande cuando se requiere ensayar múltiples agonistas y concentraciones, y su uso está limitado en caso de trombocitopenia. Por último, distintas variables, independientes del individuo evaluado, pueden afectar la respuesta de agregación, tales como el grado de activación inducido al extraer la muestra, el tipo de anticoagulante, el tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre, la contaminación del PRP con hematíes o lípidos, el pH y la temperatura de la muestra al inicio del ensayo, y el ajuste o no de la concentración de plaquetas. Para favorecer la estandarización de esta metodología, el Subcomité de Fisiología Plaquetaria de la ISTH creó hace unos años un grupo de trabajo específico y ha elaborado una guía de recomendaciones para la realización de ensayos de agregación plaquetaria<sup>(23)</sup>. Como alternativa al uso de agregómetros convencionales, se han desarrollado ensayos de agregación plaquetaria en PRP usando placas de ELISA con pocillos precargados con concentraciones crecientes de agonistas liofilizados. Esta tecnología de agregación plaquetaria disminuye el tiempo de análisis y la necesidad de grandes volúmenes de muestra, mejora la sensibilidad y especificidad con un alto valor predictivo negativo, y es una técnica útil para el diagnóstico de TPC<sup>(24)</sup>.

Por otra parte, también se puede medir la agregación plaquetaria en sangre total anticoagulada. El método más clásico usa la tecnología de la impedancia, y se basa en medir el cambio en la resistencia o impedancia eléctrica entre dos electrodos a medida que las plaquetas, activadas con un agonista, se adhieren y agregan sobre ellos. Esta técnica tiene las ventajas de usar una muestra más fisiológica y no manipulada, necesitar menos volumen de sangre, ser más rápida, y poder combinarse también con luminiscencia para medir simultáneamente la secreción granular. Por contra, con este método no se observan las dos ondas de agregación, y la correlación entre agregación y secreción es peor que con la agregación plaquetaria en PRP. La agregación en sangre total también puede verse influenciada por las variables relevantes en la agregación plaquetaria en PRP, como la extracción de la muestra, anticoagulante, tiempo post-extracción de la sangre, etc. Existen

comercialmente varios modelos de instrumentos para medir la agregación plaquetaria en sangre total, multicanal, computarizados, y con cubetas/electrodos desechables y preparados para distintos agonistas y aplicaciones diagnósticas o de monitorización de antiagregación (Multiplate<sup>®</sup> Dynabyte Medical de Hart Biologicals). Sin embargo, se ha mostrado recientemente que esta metodología es menos sensible que la agregación plaquetaria en PRP en la detección de pacientes con disfunción plaquetaria<sup>(25)</sup>. Otra forma de valorar la agregación plaquetaria en sangre total es mediante la comparación del recuento plaquetario en la sangre anticoagulada antes y después de la adición de un agonista. La agregación inducida por el agonista provocará una disminución proporcional en la cifra de plaquetas, que podemos medir con contadores celulares automáticos o mediante citometría de flujo<sup>(26)</sup>. Se han comercializado ensayos (Plateletworks<sup>®</sup> e Ichor Full blood counter, Helena Biosciences) para valorar de forma rápida la agregación plaquetaria en sangre total, basados en la diferencia de recuento entre una muestra de sangre recogida en EDTA y otra recogida en citrato y activada con ADP o colágeno.

Algunos TPC son relativamente fáciles de identificar por el patrón de agregación en respuesta a distintos agonistas<sup>(2,9,11,13,23,27)</sup>. Así, en la TG (deficiencia de GP IIb/IIIa), las plaquetas no agregan, o la agregación está muy disminuida, en respuesta a ADP, epinefrina, colágeno, ácido araquidónico o trombina (TRAP), pero sí aglutinan en respuesta a ristocetina. Por contra, en el SBS (deficiencia en GP Ib/IX/V) no hay aglutinación con ristocetina, pero las plaquetas agregan en respuesta al resto de agonistas. Este mismo patrón se da en pacientes con EvW, excepto en el tipo IIb donde la aglutinación con ristocetina es anormalmente alta, y será la medida de los niveles de FvW y el estudio de su estructura multimérica las que permitan discriminar entre SBS y EvW. La ausencia de agregación específicamente a un solo agonista, muy poco frecuente excepto en el SBS, orienta hacia la deficiencia en el paciente del receptor para ese agonista. Así, se han identificado algunos pacientes con carencia de GP Ia/IIa o de GP VI y ausencia de agregación en respuesta a colágeno, algunos enfermos cuyas plaquetas muestran una agregación muy disminuida y reversible con ADP por alteraciones congénitas en los receptores P2Y<sub>12</sub>, y en una familia japonesa se encontró una agrega-



ción deficiente específica con ácido araquidónico y análogos de tromboxano causada por una mutación en el receptor de este prostanoides<sup>(28-30)</sup>. Las anomalías del patrón de agregación en pacientes con trastornos plaquetarios de secreción (*storage pool disease*; deficiencias de gránulos alfa y/o densos) o de la señalización intraplaquetaria no son homogéneas. Muchos presentan ausencia o disminución significativa de la segunda onda de agregación en respuesta a ADP, epinefrina, colágeno, o ácido araquidónico, secundaria a la carencia de liberación de nucleótidos de los gránulos. Sin embargo, en otros pacientes el patrón de agregación es normal. Para el diagnóstico de estos pacientes los ensayos de agregación son insuficientes, y normalmente se recurre a ensayos bioquímicos y/o de citometría de flujo (ver abajo)<sup>(13)</sup>.

### Citometría de flujo

La introducción de la citometría de flujo ha sido inequívocamente uno de los mayores avances en el estudio de las plaquetas<sup>(31)</sup>. El citómetro de flujo analiza a gran velocidad las características de tamaño y dispersión de luz de cada tipo celular, así como la intensidad de fluorescencia que emiten las células problema tras su incubación con anticuerpos u otros ligandos marcados con fluorocromos. En los protocolos aplicados al estudio de plaquetas se usan sangre total anticoagulada y diluida, PRP o plaquetas lavadas. Las grandes ventajas de usar sangre total diluida son que se minimiza la manipulación de las muestras y así el riesgo de activación artificial, y que requiere una muy pequeña cantidad de sangre haciendo posible el estudio, por ejemplo en pacientes con trombocitopenia severa o en neonatos<sup>(32)</sup>. Lo habitual es incubar la sangre total simultáneamente con dos anticuerpos marcados con fluorocromos distintos, lo que permite seleccionar específicamente la población de plaquetas e identificar aquéllas positivas para el parámetro evaluado. El análisis de imagen y numérico se realiza de forma rápida con programas específicos.

En los últimos años, la mayor disponibilidad comercial de reactivos, incluso en formato de *kits* comerciales con todos los componentes necesarios, hace de la citometría de flujo una metodología muy versátil para el estudio de las plaquetas y su uso se ha extendido mucho con múltiples fines. Su principal limitación es que sigue siendo un procedimiento caro y que requiere experiencia del personal.

La citometría de flujo se ha convertido es una técnica de su uso rutinario en el diagnóstico de TPC en los laboratorios especializados en plaquetas<sup>(9-11,18,33-35)</sup>. Con ella es relativamente sencillo y fiable la confirmación del diagnóstico del SBS o de la TG empleando anticuerpos o ligandos específicos para los complejos Ib/IX y IIb/IIIa<sup>(9,13)</sup>. Nuevos ensayos de citometría permiten cuantificar la densidad de estos receptores, y así identificar pacientes en heterocigosis. Más difícil es su uso en la identificación de defectos de otros receptores (ADP, epinefrina, colágeno o tromboxano A2), cuyo nivel de expresión puede ser inferior a la sensibilidad del equipo (unas 500 copias/plaqueta). También existen protocolos de citometría de flujo para valorar la activación plaquetaria en respuesta a los distintos agonistas: algunos basados en la exocitosis de proteínas granulares (P-selectina, CD63, etc.) reconocidas con anticuerpos específicos, otros en el cambio de conformación de la GP IIb/IIIa (identificable con el anticuerpo PAC-1 o con fibrinógeno marcado con un fluorocromo)<sup>(34,36,37)</sup>. Estos protocolos son aplicables en el diagnóstico de TPC que afecta a la señalización intraplaquetaria y/o a la secreción granular, aunque no nos permiten identificar la proteína anómala concreta. Incluso se han desarrollado ensayos de citometría para valorar la agregación plaquetaria, empleando una mínima cantidad de muestra en contraste con la agregometría clásica<sup>(38)</sup>. Por último, la identificación de la externalización de fosfolípidos negativos por citometría de flujo usando anexina-V marcada con un fluorocromo se ha aplicado en el diagnóstico de anomalías congénitas de la actividad plaquetaria procoagulante como el síndrome de Scott<sup>(13,37)</sup>.

### Ensayos bioquímicos

Clásicamente, nosotros y otros hemos usado varios ensayos bioquímicos para estudiar distintos aspectos de la función plaquetaria<sup>(13,39)</sup>. Así, la activación y secreción se puede valorar con inmunoensayos, ELISA o RIA, que miden la concentración de proteínas granulares (b-tromboglobulina, factor plaquetario 4 [PF4], factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF]) en el sobrenadante de las plaquetas estimuladas. La secreción granular puede también valorarse usando plaquetas cargadas con <sup>14</sup>C-serotonina antes de la estimulación con los agonistas<sup>(40)</sup>. Este ensayo de liberación de serotonina sigue siendo de referencia en el diagnóstico de patologías como la

trombocitopenia inducida por heparina, causada por anticuerpos que en presencia de heparina provocan la activación y agregación de las plaquetas vía PF4<sup>(41)</sup>. Otros métodos bioquímicos clásicos son los ensayos de unión con ligandos plaquetarios (ADP, trombina, factor de von Willebrand [FvW], fibrinógeno, colágeno) marcados radiactivamente (<sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C), que permiten la cuantificación de los receptores de estos ligandos en la superficie plaquetaria. Finalmente, la medida por RIA o ELISA de los niveles de segundos mensajeros pro-agregantes como el tromboxano A<sub>2</sub> o inhibidores de la agregación como el AMPc ayuda a conocer el estado de activación de las plaquetas y el funcionamiento de estas vías enzimáticas claves para el proceso de la activación plaquetaria<sup>(39)</sup>. La medida de la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> durante la coagulación de una muestra de sangre o en PRP tras la activación con un agonista es considerada un método de referencia para verificar el efecto de la aspirina o defectos genéticos severos en las enzimas implicadas en la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub><sup>(13,39)</sup>.

### Microscopía

La microscopía electrónica ha sido una herramienta de gran utilidad para el conocimiento básico de la morfología, estructura, y bioquímica plaquetaria, así como de los cambios que experimentan las plaquetas durante su activación. Igualmente, esta metodología tiene valor en el estudio de pacientes con defectos o características congénitas o adquiridas que afectan la ultraestructura plaquetaria o el número o contenido granular<sup>(42)</sup>. Generalmente, los protocolos de microscopía electrónica de plaquetas son laboriosos y complejos y en ellos se usan secciones finas de plaquetas fijadas en las que se pueden ver la mayoría de los orgánulos y elementos estructurales. No obstante, algunos orgánulos como los gránulos densos se pueden distinguir con facilidad usando preparaciones no fijadas ni teñidas, lo que simplifica el procedimiento y facilita su uso para el estudio de pacientes con sospecha de deficiencias en este tipo de gránulos<sup>(9,43)</sup>. Aparte de la microscopía electrónica, otras tecnologías de microscopía confocal y de fluorescencia son útiles en el estudio de TPC. Además, asistimos ahora a la aparición de una nueva generación de tecnología de microscopía de superresolución. Aunque su uso en plaquetas es aún limitado, sin duda esta nueva tecnología podrá suponer un salto cualitativo importante en el estudio de la

fisiología plaquetaria y de los TPC<sup>(44,45)</sup>.

### Diagnóstico molecular de los TPC

Como ya hemos mencionado, identificar la patología molecular en los pacientes con TPC representa la confirmación definitiva de su diagnóstico. En la actualidad no hay ninguna duda de que el diagnóstico molecular precoz es muy relevante para el manejo clínico apropiado de los pacientes con TPC, proporcionarles asesoramiento genético en casos particulares y satisfacer la lógica demanda de una información amplia sobre su enfermedad<sup>(46-48)</sup>. El diagnóstico molecular precoz es especialmente relevante en TPC sindrómicos en los que la clínica hemorrágica puede ser un problema menor en comparación el riesgo alto de desarrollar anomalías clínicamente relevante en otros órganos o tejidos o neoplasias<sup>(7,49-51)</sup>.

Hasta hace poco el diagnóstico molecular de los TPC dependía de si las pruebas previas de la función plaquetaria apuntan a un diagnóstico particular causada por patología en un gen(es) candidato(s) conocido(s). Sin embargo, esto ha cambiado con la reciente aparición de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento (HTS) (antes conocida como NGS), que nos permite secuenciar simultáneamente múltiples genes, incluso todo el exoma o todo el genoma<sup>(15-17)</sup>.

### Secuenciación de Sanger de genes candidatos

La secuenciación de Sanger ha sido durante muchos años el estándar para secuenciar el ADN. Los genes candidatos son amplificados por reacción en cadena de la polimerasa como segmentos cortos de ADN (200-1,000 nucleótidos), secuenciados después de la purificación y las secuencias resultantes se alinean con la secuencia de consenso del genoma humano usando un software específico. Nosotros, y otros grupos, hemos aplicado con éxito esta metodología para alcanzar el diagnóstico molecular en TPC cuyos genes causales eran conocidos desde hace tiempo como SBS, TG, MYH9, o síndromes severos de gránulos plaquetarios como Chediak Higashi (CHS) o síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS)<sup>(9)</sup>. Sin embargo, hasta en un 50% de pacientes con un TPC, el estudio funcional no permitió identificar el gen candidato y, por tanto, no se pudo aplicar la secuenciación de Sanger<sup>(9)</sup>.

Hoy en día existe una amplia lista de *loci* genéticos,

cerca del centenar, que se sabe que están asociados TPC, por lo que una estrategia de gen candidato puede usarse, siempre y cuando el fenotipo clínico y de laboratorio del paciente identifique el gen candidato. Como en muchos pacientes esto no es posible, se requieren nuevos enfoques moleculares alternativos para identificar los defectos genéticos subyacentes.

### Estudios de *linkage* genético

El análisis de ligamiento es una herramienta poderosa para detectar la ubicación cromosómica de los genes de la enfermedad. Se basa en la observación de que los genes que residen físicamente cerca en un cromosoma permanecen vinculados durante la meiosis.

*Mapeo de autozigosidad.* En familias consanguíneas hay una alta probabilidad de que un individuo afectado herede ambas copias del gen mutado de un ancestro reciente común; como consecuencia de este principio, se puede esperar que la región cromosómica que rodea al gen mutado sea homocigótica; dicha región se dice que es idéntica por descendencia o autozigota. Con el fin de identificar los genes causantes de enfermedades, por lo tanto, se pueden buscar segmentos cromosómicos homocigotos en individuos afectados consanguíneos, y este mapeo se ve facilitado por secuencias específicas de ADN llamadas microsatélites o repeticiones cortas en tándem (STR). Ejemplos exitosos de este enfoque fue nuestro descubrimiento de la segunda mutación en el gen *HPS7*<sup>(52)</sup>.

*Análisis de asociación del genoma (GWAS).* El GWAS ha sido una herramienta efectiva para definir *loci* candidatos en aquellos IPD donde los genes candidatos no son obvios. Este enfoque molecular permitió la identificación de los *loci* genéticos responsables del MYH9-RD, TAR y GPS<sup>(16)</sup>.

### Secuenciación de alto rendimiento o HTS

La HTS se refiere a tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento no basadas en Sanger. Al contrario, las plataformas HTS realizan una secuenciación en paralelo de millones de fragmentos de ADN de una sola muestra<sup>(53)</sup>. Así, la HTS ofrece la gran ventaja, frente a la secuenciación de Sanger, de que el estudio molecular no tiene por qué restringirse a un gen concreto. En poco tiempo, la HTS se está convirtiendo en el estándar para la identificación de defectos genéticos subyacentes en pacien-

tes con TPC u trastornos hemorrágicos hereditarios raros de causa desconocida<sup>(15-17)</sup>. Además su coste se está reduciendo a gran velocidad.

Las aproximaciones de estudio molecular mediante HTS incluyen el análisis de:

- Paneles de genes seleccionados (10-100), que han sido seleccionados por ser ya conocida su implicación en TPC, o en base a su relevancia en alguna aspecto de la fisiología plaquetaria<sup>(15,16)</sup>.
- Secuenciación del exoma (*Whole-Exome Sequencing* o WES) o del genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS). Consiste en secuenciar todas las regiones codificantes (WES) y/o no codificantes (WGS) del genoma<sup>(54)</sup>.

Recientemente, distintos grupos, entre ellos el nuestro, ha establecido plataformas HTS como herramienta diagnóstica de TPC en proyectos de colaboración multicéntrica<sup>(55-58)</sup>. Ello no sólo ha permitido alcanzar el diagnóstico molecular en muchos pacientes con TPC sino, además, identificar nuevas variantes en genes conocidos y nuevos genes implicados en TPC. En nuestro caso, la investigación de 80 casos de TPC sin diagnóstico molecular previo, mediante una plataforma HTS con 72 genes, permitió alcanzar un diagnóstico molecular en el 70% de los pacientes, y esta sensibilidad aumentó al 88% entre los pacientes con sospecha de tener un TPC concreto definido por la clínica y el fenotipo plaquetario<sup>(55)</sup>. Además, con esta aproximación de HTS, panel de genes y WES, hemos identificado casos pacientes muy raros con TPC debidos a alteraciones moleculares en genes nuevos en este contexto como *RASGRP2*, *DIAPH1* o *KDSR*<sup>(55, 59-61)</sup>. Estos resultados son muy prometedores respecto al potencial de la HTS en el diagnóstico molecular de los TPC, pero también ponen de manifiesto que incluso usando esta poderosa tecnología, en un número significativo de enfermos con TPC de fenotipo inespecífico no se consigue aún identificar la alteración molecular subyacente. A ello contribuye tanto la enorme heterogeneidad molecular de los TPC, implicando tanto a genes quizás no incluidos en los paneles HTS, como las propias limitaciones metodológicas de estas plataformas, que no alcanzan un cobertura del 100% de la secuencia y que son poco sensibles para variantes de número de copias (CNV, acrónimo de *copy number variant*) y para inserciones y deleciones. La combinación de HTS con estrategias de agrupación

de pacientes raros por fenotipos definidos con nomenclatura estandarizada HPO (Human Phenotype Ontology) está ayudando a identificar nuevos genes implicados en estas enfermedades<sup>(62,63)</sup>.

Destacar que entre los principales problemas en el uso de la HTS está el análisis de la ingente cantidad de datos genéticos generados y la identificación certera de la(s) variante(s) responsable(s) de la patología entre las múltiples variantes detectadas en cualquier individuo. Aunque se han desarrollado herramientas bioinformáticas de análisis, éstas suelen estar disponibles en centros muy especializados, su uso requiere personal con formación específica, y muchas veces estas herramientas están ya obsoletas respecto al avance de la metodología HTS. Por ello, este análisis puede ser el paso limitante en el proceso de identificación de variantes genéticas. Para reconocer alteraciones moleculares candidatas en los pacientes con TPC, es habitual ver si están presentes en base de datos que mantienen registro de variantes asociadas a enfermedad, tales como:

- ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>),
- ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>),
- EVS (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) ó
- HGMG (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>).

Sin embargo, ninguna de estas bases de datos está depurada al 100%, e incluye variantes asociadas a enfermedad que realmente no tienen consecuencias funcionales<sup>(16,47)</sup>. Para la calificación de variantes genéticas nuevas, es decir no identificadas previamente en otros pacientes, se han publicado recientemente normas y directrices como las del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) y la Asociación Para la Patología Molecular<sup>(64)</sup>. En esta guía consenso se califican las variantes en un posible gen causal de enfermedad, como “patogénica”, “probablemente patogénica”, “significado incierto”, “benigna” y “probablemente benigna”, en base a un conjunto de criterios, incluyendo, entre otros, la prevalencia en la población de esa raza, tipo de mutación y predicción de su impacto estructural en la proteína, funcionalidad del gen correspondiente y la segregación de la variante en la familia con el fenotipo. Otra debilidad potencial del uso de HTS en TPC, como en otras enfermedades, es el descubrimiento de variantes genéticas de potencial relevancia clínica pero no relacionadas con la patología en estudio en el enfermo, los denominados hallazgos secundarios o incidentales. Nos enfrentamos entonces al

dilema ético de informar o no al paciente de estos hallazgos y, en su caso, cómo y cuándo informarle. La ACMG también ha hecho recomendaciones sobre el uso de HTS y la información sobre hallazgos incidentales en estas pruebas, que incluye un listado de condiciones, genes y variantes susceptibles de ser informadas en caso de hallazgos incidentales en la secuenciación clínica<sup>(65)</sup>. Es sin duda un área controvertida que requiere debate profesional y social y tratarse con cautela y preocupación ética. Aunque hay consenso sobre la importancia y el valor del diagnóstico molecular para el manejo clínico de los enfermos con TPC, asignaciones incorrectas de la patogenicidad de las variantes raras encontradas puede ser perjudicial para los enfermos. Por ello, es fundamental no despreciar el valor de la evaluación clínica del enfermo y del análisis detallado de su fenotipo plaquetario, así como aplicar estándares rigurosos en la valoración de la patogenicidad de las variantes genéticas encontradas en los estudios moleculares masivos. A medida que se obtengan y registren públicamente datos depurados acerca de la genética de los TPC, mejorará la probabilidad de encontrar en todos los pacientes la(s) alteración(es) molecular(es) responsable(s) de la enfermedad.

### Agradecimientos

Los proyectos de nuestro grupo de investigación están financiados por las siguientes instituciones de investigación en TPC: Instituto de Salud Carlos III, CIBERER, Fundación Séneca y SETH.

### Declaración de conflictos de interés:

El Dr. José Rivera declara no poseer conflictos de interés.

### Bibliografía

1. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nuñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009 May;94(5):700-11.
2. Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *British Journal of Haematology*. 2006 Dec;135(5):603-33.
3. Casari C, Bergmeier W. Acquired platelet disorders. *Thrombosis Research*. 2016 May;141 Suppl 2:S73-5.
4. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *The New England Journal of Medicine*. 2007 Dec 13;357(24):2482-94.
5. Mancuso ME, Santagostino E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. *British Journal of Haematology*. 2017 Apr 17.
6. Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: a growing list of disorders. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2017 Dec 8;2017(1):385-99.

7. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *British Journal of Haematology*. 2014 Apr;165(2):165-78.
8. Nurden AT, Fiore M, Pillois X, Nurden P. Genetic testing in the diagnostic evaluation of inherited platelet disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2009 Mar;35(2):204-12.
9. Sanchez-Guiu I, Anton AI, Padilla J, Velasco F, Lucia JF, Lozano M et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014 Dec 24;9:213.
10. Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2015 Feb;13(2):314-22.
11. Gresele P, Bury L, Falcinelli E. Inherited Platelet Function Disorders: Algorithms for Phenotypic and Genetic Investigation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2016 Apr;42(3):292-305.
12. Bastida Bermejo JM, Hernandez-Rivas JM, Gonzalez-Porras JR. Novel approaches for diagnosing inherited platelet disorders. *Medicina Clinica*. 2017 Jan 20;148(2):71-7.
13. Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *British Journal of Haematology*. 2015 Jul;170(2):150-61.
14. Rivera J, Navarro-Núñez L, Lozano ML, Martínez C, Corral J, Gonzalez-Conejero R et al. Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. *Haematologica/Edición esp*. 2007;92((Sup 1)):13-27.
15. Heremans J, Freson K. High-throughput sequencing for diagnosing platelet disorders: lessons learned from exploring the causes of bleeding disorders. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2018 May;40 Suppl 1:89-96.
16. Sivapalaratnam S, Collins J, Gomez K. Diagnosis of inherited bleeding disorders in the genomic era. *British Journal of Haematology*. 2017 Nov;179(3):363-76.
17. Freson K, Turro E. High-throughput sequencing approaches for diagnosing hereditary bleeding and platelet disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2017 Jul;15(7):1262-72.
18. Gresele P, Harrison P, Bury L, Falcinelli E, Gachet C, Hayward CP et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2014 Sep;12(9):1562-9.
19. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2006 Feb;4(2):312-9.
20. SR. S. The VerifyNow System. Michelson AD, editor *Platelets* 2nd ed San Diego, CA: Elsevier. 2007:509-18.
21. Varon D SN. Impact cone and plate(let) analyzer. I. In: Michelson AD, editor *Platelets* 2nd ed San Diego, CA: Elsevier;. 2007:535-44.
22. Castellino FJ, Liang Z, Davis PK, Balsara RD, Musunuru H, Donahue DL et al. Abnormal whole blood thrombi in humans with inherited platelet receptor defects. *PloS One*. 2012;7(12):e52878.
23. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2013 Apr 10.
24. Lordkipanidze M, Lowe GC, Kirkby NS, Chan MV, Lundberg MH, Morgan NV et al. Characterization of multiple platelet activation pathways in patients with bleeding as a high-throughput screening option: use of 96-well Optimul assay. *Blood*. 2014 Feb 20;123(8):e11-22.
25. Al Ghaithi R, Drake S, Watson SP, Morgan NV, Harrison P. Comparison of multiple electrode aggregometry with lumi-aggregometry for the diagnosis of patients with mild bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2017 Oct;15(10):2045-52.
26. Jarvis GE. Platelet aggregation in whole blood: impedance and particle counting methods. *Methods Mol Biol*. 2004;272:77-87.
27. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidze M, Bem D, Daly ME, Makris M et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood*. 2012 Dec 13;120(25):5041-9.
28. Lecchi A, Razzari C, Paoletta S, Dupuis A, Nakamura L, Ohlmann P et al. Identification of a new dysfunctional platelet P2Y12 receptor variant associated with bleeding diathesis. *Blood*. 2015 Feb 05;125(6):1006-13.
29. Mumford AD, Nisar S, Darnige L, Jones ML, Bachelot-Loza C, Gandrille S et al. Platelet dysfunction associated with the novel Trp29Cys thromboxane A(2) receptor variant. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2013 Mar;11(3):547-54.
30. Podda G, Femia EA, Cattaneo M. Current and emerging approaches for evaluating platelet disorders. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016 May;38 Suppl 1:50-8.
31. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*. 1996 Jun 15;87(12):4925-36.
32. Hardy AT, Palma-Barqueros V, Watson SK, Malcor JD, Eble JA, Gardiner EE et al. Significant Hypo-Responsiveness to GPVI and CLEC-2 Agonists in Pre-Term and Full-Term Neonatal Platelets and following Immune Thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018 Jun;118(6):1009-20.
33. Andres O, Henning K, Strauss G, Pflug A, Manukjan G, Schulze H. Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach. *Platelets*. 2018 Jun;29(4):347-56.
34. Boknas N, Ramstrom S, Faxalv L, Lindahl TL. Flow cytometry-based platelet function testing is predictive of symptom burden in a cohort of bleeders. *Platelets*. 2018 Jul;29(5):512-9.
35. van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G et al. Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2018 Apr;16(4):689-98.
36. Frelinger AL, 3rd. Using flow cytometry to monitor glycoprotein IIb/IIIa activation. *Platelets*. 2018 May 25:1-7.

37. Pasalic L, Pennings GJ, Connor D, Campbell H, Kritharides L, Chen VM. Flow Cytometry Protocols for Assessment of Platelet Function in Whole Blood. *Methods Mol Biol.* 2017;1646:369-89.
38. Vinholt PJ, Frederiksen H, Hvas AM, Sprogøe U, Nielsen C. Measurement of platelet aggregation, independently of patient platelet count: a flow-cytometric approach. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH.* 2017 Jun;15(6):1191-202.
39. Rivera J, Lozano ML, Vicente V. In vitro changes of platelet parameters: lessons from blood banking. *Methods Mol Biol.* 2004;273:57-72.
40. Mumford AD, Frelinger AL, 3rd, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thrombosis and Haemostasis.* 2015 Jul;114(1):14-25.
41. Arepally GM. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2017 May 25;129(21):2864-72.
42. White JG. Electron microscopy methods for studying platelet structure and function. *Methods Mol Biol.* 2004;272:47-63.
43. Sanchez-Guiu I, Torregrosa JM, Velasco F, Anton AI, Lozano ML, Vicente V et al. Hermansky-Pudlak syndrome. Overview of clinical and molecular features and case report of a new HPS-1 variant. *Hamostaseologie.* 2014;34(4):301-9.
44. Lambert TJ, Waters JC. Navigating challenges in the application of superresolution microscopy. *The Journal of Cell Biology.* 2017 Jan 2;216(1):53-63.
45. Megens RT, Soehnlein O. Intravital Microscopy for Atherosclerosis Research. *Methods Mol Biol.* 2015;1339:41-60.
46. Daly ME, Leo VC, Lowe GC, Watson SP, Morgan NV. What is the role of genetic testing in the investigation of patients with suspected platelet function disorders? *British Journal of Haematology.* 2014 Apr;165(2):193-203.
47. Lentaigne C, Freson K, Laffan MA, Turro E, Ouwehand WH. Inherited platelet disorders: toward DNA-based diagnosis. *Blood.* 2016 Jun 09;127(23):2814-23.
48. Westbury SK, Mumford AD. Genomics of platelet disorders. *Haemophilia: the Official Journal of the World Federation of Hemophilia.* 2016 Jul;22 Suppl 5:20-4.
49. Melazzini F, Zaninetti C, Balduini CL. Bleeding is not the main clinical issue in many patients with inherited thrombocytopenias. *Haemophilia: the Official Journal of the World Federation of Hemophilia.* 2017 Sep;23(5):673-81.
50. Balduini CL, Melazzini F, Pecci A. Inherited thrombocytopenias-recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets.* 2017 Jan;28(1):3-13.
51. Daly ME. Transcription factor defects causing platelet disorders. *Blood Reviews.* 2017 Jan;31(1):1-10.
52. Lowe GC, Sanchez Guiu I, Chapman O, Rivera J, Lordkipanidze M, Dovlatova N et al. Microsatellite markers as a rapid approach for autozygosity mapping in Hermansky-Pudlak syndrome: identification of the second HPS7 mutation in a patient presenting late in life. *Thrombosis and Haemostasis.* 2013 Apr;109(4):766-8.
53. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2013 Aug;133(8):e11.
54. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *The New England Journal of Medicine.* 2014 Sep 18;371(12):1170.
55. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, Janusz K, Palma-Barqueros V, Del Rey M et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica.* 2018 Jan;103(1):148-62.
56. Johnson B, Lowe GC, Futterer J, Lordkipanidze M, MacDonald D, Simpson MA et al. Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica.* 2016 Oct;101(10):1170-9.
57. Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi SV, Megy K, Bariana TK et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood.* 2016 Jun 09;127(23):2791-803.
58. Leinoe E, Zetterberg E, Kinalis S, Ostrup O, Kampmann P, Nornstrom E et al. Application of whole-exome sequencing to direct the specific functional testing and diagnosis of rare inherited bleeding disorders in patients from the Oresund Region, Scandinavia. *British Journal of Haematology.* 2017 Oct;179(2):308-22.
59. Lozano ML, Cook A, Bastida JM, Paul DS, Irwin G, Cid AR et al. Novel mutations in RASGRP2, which encodes CalDAG-GEFI, abrogate Rap1 activation, causing platelet dysfunction. *Blood.* 2016 Sep 01;128(9):1282-9.
60. Sevivas T, Bastida JM, Paul DS, Caparros E, Palma-Barqueros V, Coucelo M et al. Identification of two novel mutations in RASGRP2 affecting platelet CalDAG-GEFI expression and function in patients with bleeding diathesis. *Platelets.* 2018 Mar;29(2):192-5.
61. Takeichi T, Torrelo A, Lee JYW, Ohno Y, Lozano ML, Kihara A et al. Biallelic Mutations in KDSR Disrupt Ceramide Synthesis and Result in a Spectrum of Keratinization Disorders Associated with Thrombocytopenia. *The Journal of Investigative Dermatology.* 2017 Nov;137(11):2344-53.
62. Westbury SK, Turro E, Greene D, Lentaigne C, Kelly AM, Bariana TK et al. Human phenotype ontology annotation and cluster analysis to unravel genetic defects in 707 cases with unexplained bleeding and platelet disorders. *Genome Med.* 2015;7(1):36.
63. Stritt S, Nurden P, Turro E, Greene D, Jansen SB, Westbury SK et al. A gain-of-function variant in DIAPH1 causes dominant macrothrombocytopenia and hearing loss. *Blood.* 2016 Jun 09;127(23):2903-14.
64. Rio P, Banos R, Lombardo A, Quintana-Bustamante O, Alvarez L, Garate Z et al. Targeted gene therapy and cell reprogramming in Fanconi anemia. *EMBO Molecular Medicine.* 2014 Jun;6(6):835-48.
65. May T. On the justifiability of ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *The Journal of Law, Medicine & Ethics: a Journal of the American Society of Law, Medicine & Ethics.* 2015 Spring;43(1):134-42.