



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**ESTUDIO MOLECULAR DEL SINDROME DE PLAQUETA
PEGAJOSA MEDIANTE ANALISIS DEL EXOMA**

GI SELA BARROS GARCIA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
Bogotá
2016**

**ESTUDIO MOLECULAR DEL SINDROME DE PLAQUETA PEGAJOSA
MEDIANTE ANALISIS DEL EXOMA**

GISELA BARROS GARCIA
Residente Oncohematología Pediátrica

Proyecto de investigación realizado como requisito para acceder al título de
Especialista en Oncohematología Pediátrica

Tutores:

EDUARDO BELTRÁN DUSSÁN
Especialista En Oncohematología Pediátrica
Profesor Titular Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría, División
de Oncohematología Pediátrica de la Universidad Nacional de Colombia

JORGE EDUARDO CAMINOS PINZÓN
MSc, PhD. Profesor Asociado, Coordinador División de Bioquímica. Facultad
de Medicina Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Bogotá
2016

Resumen

El síndrome de plaqueta pegajosa (SPP) es una condición pro-coagulante caracterizado por trombosis arterial o venosa debido a hiperagregabilidad plaquetaria. No se conoce la causa molecular que logre explicar con claridad el fenómeno de hiperagregabilidad plaquetaria en estos pacientes. La secuenciación del exoma (WES) está demostrando ser un método eficaz para la identificación de variantes de novo en trastornos de herencia mendeliana.

Métodos: Se realizó WES en una paciente con criterios de SPP. El procesamiento de las secuencias y las anotaciones de las variantes encontradas fueron realizadas utilizando herramientas bioinformáticas estándar. Se utilizó un sistema de filtración para dar prioridad a las variantes de novo de posible importancia funcional y estas fueron comparadas con genes posiblemente relacionados con SPP e hiperagregabilidad plaquetaria.

Resultados: En una paciente con SPP tipo I, se encontró una mutación delecional de novo, en el gen Ori1 que codifica una subunidad de canal de calcio en la membrana plaquetaria.

Conclusión: Estos hallazgos amplían el espectro de condiciones genéticas relacionadas con el SPP y proporcionan más apoyo para el entendimiento de su patogénesis, diagnóstico y tratamiento.

Abstract

Sticky platelet syndrome (SPS) is a pro-coagulant condition characterized by arterial or venous thrombosis due to a platelet hyperaggregability. There is no known molecular cause that allows to explain with clarity the platelet hyperaggregability phenomenon in these patients. The whole exome sequencing (WES) has been an effective method to identify novo variants in Mendelian hereditary disorders.

Methods: WES was done in a patient with SPP criteria. The processing of the sequences and the annotated variants found, were done utilizing bioinformatics standard tools. A filtration system was used to give priority to the novo variants that could have possible functional relevance. These ones were compared with genes possibly related with SPP and platelet hyperaggregability.

Results: In a patient with SPP type I, it was found a deletional novo mutation in the gene *Orai1* that encodes a calcium channel subunit in the platelet membrane.

Conclusion: These findings expand the spectrum of gene conditions related to the SPP and provide more support to understand its pathogenesis, diagnose and treatment.

Contenido

	Pág.
Contenido	
1. Introducción y justificación.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. Marco teórico.....	6
4. Metodología.....	17
4.1 Tipo de Muestra.....	17
4.2 Criterios de inclusión.....	17
4.3 Criterios de exclusión.....	18
4.4 Diagnóstico de SPP.....	18
4.5 Preparación de muestras de DNA.....	18
4.6 Secuenciación Exómica.....	19
4.7 Analisis de los datos.....	20
4.7.1 Secuenciación Exomica y análisis Bioinformatico	20
4.7.2 Alineación de las lecturas con un genoma de referencia.....	20
4.7.3 Localización de las variantes.....	21
4.7.4 Filtrado y Anotación de las Variantes.....	21
4.8 Procedimientos.....	22
5. Conducción del estudio.....	24
5.1 Sitio de investigación.....	24
5.2 Manejo de sustancias o especímenes biológicos.....	24
5.3 Seguridad.....	24
5.4 Consideraciones éticas.....	25

	Pág.
6. Cronograma general de actividades.....	27
7. Presupuesto.....	28
8. Resultados.....	29
9. Discusión de los resultados.....	31
10. Conclusión y Recomendaciones.....	35
11. Agradecimientos.....	36
12. Anexos.....	37
Anexo 1: Consentimiento informado.....	37
Anexo 2: Reglas para la toma de decisiones con respecto a la participación de niños en la investigación.....	42
Anexo 3. Listado de posibles genes de interés relacionados con el SPP.....	44
13. Referencias bibliográficas.....	48

1. Introducción y Justificación

La trombosis en la edad pediátrica, es una patología diagnosticada cada vez con mas frecuencia gracias a los progresos de la medicina actual que permiten reconocerla y diagnosticarla mas fácilmente. Aun cuando se han logrado avances en el conocimiento de esta patología en la edad pediátrica todavía quedan muchas aspectos por dilucidar.

Los eventos trombóticos pueden ser congénitos o adquiridos. Las causas congénitas son sospechadas ante la presencia de eventos trombóticos recurrentes, historia familiar y la ausencia de probables causas secundarias. La mayoría de estos episodios de trombosis son debidos a defectos de las proteínas anticoagulantes o a fenómenos plaquetarios. Actualmente se describen como causas genéticas, en primer lugar la Resistencia a la Proteína C activada seguida por el Síndrome de la Plaqueta Pegajosa y en tercer lugar la alteración del Gen de la Protrombina. Se cree además que una alta proporción de los episodios trombóticos en la edad pediátrica considerados como idiopáticos podrían estar explicados por el Síndrome de Plaqueta Pegajosa.

El síndrome de la plaqueta pegajosa es un trastorno de la agregabilidad plaquetaria de relativa reciente identificación caracterizado por un incremento de la agregación plaquetaria in vitro después de la activación con bajas concentraciones de adenosin difosfato y/o epinefrina asociado a la presencia de fenómenos trombóticos arteriales y venosos.

Desde las descripciones iniciales, se ha observado la ocurrencia familiar del síndrome de plaqueta pegajosa. Por lo tanto ha sido considerado, por lo menos en una proporción significativa de los individuos afectados, como un trastorno hereditario. A pesar de la definición clínica clara, la fuerte evidencia de ocurrencia familiar y los esfuerzos de algunos investigadores, la causa molecular exacta de este síndrome aun permanece sin identificar.

La mayoría de las mutaciones relacionadas con las enfermedades conocidas actualmente se encuentran ubicadas en el exoma o parte codificante del genoma. La secuenciación del exoma completo es un acercamiento reciente que ha demostrado su utilidad en encontrar las mutaciones responsables de distintas enfermedades. En este trabajo se plantea la hipótesis de que esta técnica podría ser útil para ayudar a aclarar la genética que subyace al síndrome de plaqueta pegajosa.

Partiendo de esta hipótesis, se pretende secuenciar a un individuo que cumpla con los criterios de Síndrome de Plaqueta Pegajosa y los miembros afectados por esta entidad de su familia con el objetivo de encontrar una variación genética común origen del trastorno en esta familia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Contribuir al estudio de la etiología del síndrome de plaqueta pegajosa, realizando una aproximación molecular mediante el estudio del exoma de una paciente y los miembros de su familia afectada.

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar la presencia de alteraciones genéticas mediante el estudio de secuenciación del exoma en un paciente con síndrome de plaqueta pegajosa y los miembros afectados de su familia.
- Hacer una descripción de las características clínicas y paraclínicas de un paciente con diagnóstico de síndrome de plaqueta pegajosa y de su familia.

3. Marco Teórico

La primera descripción de la función de las plaquetas fue realizada por William Osler en 1873, quien las describió como estructuras que tendían a “agruparse unas con otras”. Osler no solo hizo una descripción macroscópica de las plaquetas sino que también identificó su presencia en el coágulo sanguíneo. Mas adelante, en 1892 el patólogo italiano Bizzozero describió como las plaquetas se agrupan en los vasos sanguíneos dañados, formando el tapón hemostático y proporcionó evidencia de su participación en los procesos trombóticos identificándolas en los trombos formados en las placas ateroscleróticas, aneurismas aórticos y en las vegetaciones valvulares.(1)

Inicialmente, hacia 1880, fueron identificados los primeros trastornos hemostáticos cuantitativos plaquetarios asociados a una disminución en el conteo, seguido poco mas tarde de las primeras descripciones de alteraciones cualitativas hacia 1909 con el síndrome de May Hegglin y el síndrome de Bernard Soulier en los cuales fueron descritas características morfológicas únicas asociadas a la presencia de alteraciones en las pruebas de función plaquetaria presentes en ese momento como por ejemplo, la retracción del coágulo en la tromboastenia de Glanzmann.(2)

Una descripción mas profunda de la función plaquetaria fue aportada por Bernard, Caen, Roskam, y Soulier de 1920 a 1960, etapa durante la cual se desarrollaron métodos de laboratorio especializados como la agregometría plaquetaria turbidimétrica y métodos analíticos bioquímicos plaquetarios que fueron fundamentales para el entendimiento de la función plaquetaria en la hemostasia y sus trastornos. (3)

Las plaquetas son los elementos celulares más pequeñas en la sangre, con un volumen medio de alrededor de 7 a 9 fL. Se producen por la fragmentación de megacariocitos en la médula ósea, y son liberados en la

circulación. Su vida en la circulación es de 7 a 10 días. Las plaquetas tienen una forma discoidal y carecen de núcleo. Su membrana plasmática contiene glucoproteínas (GP) que se unen a proteínas de adhesión específicas para promover interacciones entre plaquetas-superficie (adhesión) y entre plaquetas-plaquetas (agregación). En condiciones normales, las plaquetas circulan en el torrente sanguíneo sin adherirse al endotelio de la pared del vaso. Sin embargo, cuando el endotelio se lesiona, las plaquetas se adhieren al endotelio, se activan, y se someten a un cambio en su forma discoidea a una forma irregular con múltiples prolongaciones. Esto se debe a cambios en el esqueleto contráctil y cambios en los microtúbulos.(4)

Después de su unión al colágeno subendotelial expuesto por la lesión, las plaquetas se activan adquiriendo pseudópodos que les permiten unirse más fuertemente entre sí y liberar los agonistas de la agregación plaquetaria contenidos en los gránulos. Todo esto lleva a la formación del tapón plaquetario.

El proceso de adhesión de las plaquetas está mediada por la GPIb del complejo de GPIb/IX/V, que sirve como un sitio de unión para el factor de Von Willebrand (vWF) subendotelial. FvW es una proteína de adhesión secretada por las células endoteliales y las plaquetas, y está presente en el subendotelio y en el plasma. La unión al colágeno subendotelial está mediada a través del complejo GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$ integrina) y la GPVI. La adhesión al subendotelio estimula la secreción de los gránulos alfa de almacenamiento y los gránulos densos de las plaquetas, incluyendo adenosina-difosfato (ADP) y la formación de tromboxano A2 (TXA2); ADP y TXA2 promueven la agregación. (5)

La liberación de ADP es esencial para la agregación plaquetaria actuando mediante su interacción con receptores específicos localizados en la superficie plaquetaria. Se conocen dos receptores para el ADP en la plaqueta, uno acoplado a la proteína $G\alpha_q$ (el P2Y1) y otro acoplado a G_i (el

P2Y₁₂). Ambos receptores actúan de modo sinérgico en la activación de las plaquetas. P2Y₁ acoplado a G α_q regula los eventos de señalización calcio dependientes que inician el cambio de forma de las plaquetas y la rápida y reversible agregación plaquetaria aIIb β 3-dependiente. P2Y₁₂ es G α_i relacionado y activa aIIb β 3 por un mecanismo que implica la inhibición de la producción de cAMP por la adenilatociclasa; P2Y₁₂ es el blanco de fármacos antitrombóticos que incluyen clopidogrel.(6)

La visión actual de la relación entre estos dos receptores plaquetarios de ADP es que P2Y₁ inicia la agregación, reforzando P2Y₁₂. El ADP es secretado por los gránulos densos cuando las plaquetas son activadas por otros agonistas incluyendo colágeno, FvW, o trombina, actuando sobre los receptores P2Y₁/P2Y₁₂ y promoviendo la agregación plaquetaria estable.(7)

La GP Ib/IX/V es un complejo de glucoproteínas compuesto por GPIb α y GPIb β unidas por puentes disulfuro, no covalentemente asociados con GPIX y GPV con una relación 2:2:2:1. El dominio N-terminal de GPIb α (residuos 1-282) es la región de ligando principal del complejo GPIb-IX-V y contiene también sitios de unión, para el FvW, la integrina leucocitaria α Mh2 (Mac-1), α trombina, y P-selectina expresada sobre plaquetas activadas o células endoteliales activadas.(8)

En las plaquetas, la P-selectina y el FvW están presentes en los gránulos α , mientras que en las células endoteliales contienen gránulos de almacenamiento, los cuerpos de Weibel-Palade, que liberan también P selectina y el FvW, en consecuencia, los grandes multímeros de FvW y P-selectina se expresan rápidamente tras la activación de ambos tipos de células y pueden mediar la adhesión plaquetaria y leucocitaria por mecanismos tanto GPIb α -dependientes como GPIb α -independientes.

La GPIb α se expresa en la superficie de la plaqueta e inicia el proceso de adhesión uniéndose al colágeno y al factor von Willebrand. En los vasos con alto estrés de rozamiento, como ocurre en las arterias, el FvW es

esencial para reducir el flujo rápido de las plaquetas mediante la interacción del dominio A1 del FvW con la GPIIb/IIIa.(6)

El VWF subendotelial asociado con los filamentos de colágeno tipo IV inducen la activación plaquetaria y su adhesión firme a la pared, de tal manera que el colágeno y el FvW forman una especie de unidad funcional para la formación inicial del trombo. En este proceso participan dos receptores plaquetarios, la GPVI y la integrina $\alpha 2\beta 1$. La GPVI permite una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de las sustancias procoagulantes contenidas en ellas, consolidando la formación del trombo. (8)

La GPIIb/IIIa es la mas abundante en la superficie plaquetaria. Esta GP interviene en la adhesión de la plaqueta a la pared vascular y también en la interacción plaqueta-plaqueta, lo que se conoce como agregación plaquetaria, a través principalmente del fibrinógeno, que es el principal ligando, sin embargo otros péptidos que contienen la región RGD (arginina, glicina, aspártico) como por ejemplo el VWF, o la fibronectina, son capaces también de interactuar con la GPIIb/IIIa.(9)

La primera descripción de un trastorno cualitativo plaquetario protrombótico que mas adelante seria conocido como síndrome de plaqueta pegajosa fue realizada en 1979 por Mefti y colaboradores, quienes describieron 22 pacientes con episodios de accidente isquémico transitorio, que mostraban en las pruebas aumento de la adhesión y la agregabilidad plaquetaria y en quienes fueron descartadas otras probables causas de estos episodios, como presencia de aterosclerosis, émbolos cardiacos, migraña o enfermedades del colágeno. Mefti llegó a la conclusión de que había un grupo específico de pacientes con AIT en los que la anormalidad de la función plaquetaria fue la única causa del evento. Mefti observó una mejoría de los patrones de agregación con la administración de ASA y su anormalidad luego de su suspensión.(10)

En 1982 Mammen y colaboradores describieron una mujer de 24 años de edad, quien sufrió un infarto agudo del miocardio, mientras se encontraba en el séptimo mes de embarazo. La angiografía coronaria no demostró lesiones arterioscleróticas. Su madre había tenido un infarto agudo del miocardio durante uno de sus embarazos, y su hermano de 18 años un episodio de angina de pecho sin enfermedad coronaria asociada. Todos los estudios de hipercoagulabilidad fueron normales y en la agregometría plaquetaria en plasma rico en plaquetas una alta respuesta (100%) fue notada con adenosin difosfato (ADP) y epinefrina como agonistas, la respuesta a trombina, colágeno, ácido araquidónico y ristocetina fue normal. Idénticos patrones fueron encontrados en su madre y en su hermano, no siendo así en su padre y hermana. (11)

Posteriormente estudió el comportamiento plaquetario en función de su superficie de contacto mediante microscopía electrónica. Las plaquetas de la paciente, su madre y hermano fueron hiperadhesivas e hiperagregables. El patrón de agregación plaquetario después del tratamiento con aspirina regreso a lo normal y luego de discontinuarla regresaban a un patrón anormal. Mammen, propuso a partir de estos hallazgos que esta misma entidad podía ser encontrada no sólo en pacientes con accidente cerebrovascular, sino también en otros tipo de eventos trombóticos, de otro modo inexplicables, especialmente en personas jóvenes sin factores de riesgo graves, y fue el primero en describir el patrón herencia autosómico dominante.(12)

En 1983, Mammen y Holiday, en la 9^a conferencia Internacional de Trombosis y Circulación Cerebral en Phoenix, Arizona describiendo un grupo de pacientes con ictus isquémico o AIT y hiperagregabilidad plaquetaria después de bajas concentraciones de epinefrina y/o ADP. Holiday describió esta condición como un síndrome clínico distinto y sugirió el término Síndrome de Plaqueta Pegajosa para enfatizar el defecto de la agregación plaquetaria.(13)

La mayoría de los estudios de plaqueta pegajosa publicados entre los años 1980 y 1990 fueron limitados en el número de pacientes, diseño retrospectivo y, en general agregaban poco al conocimiento del síndrome mas allá de la descripción de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, los estudios de Mammen y colaboradores añadieron datos importantes para mejorar la comprensión y la definición del síndrome.

En 1986, Mammen publicó un estudio de un grupo de pacientes con IAM o angina de pecho, con arterias coronarias angiográficamente normales. Los datos revelaron diferencia significativa en los patrones de agregación con ADP y epinefrina y diferencias igualmente significativas en la evaluación microscópica electrónica.(13)

Mas adelante, Rubenfire y colaboradores estudiaron una serie de pacientes menores de 45 años de edad que habían sufrido accidentes cerebrovasculares o AIT trombóticos. No tenían factores de riesgo identificables, y se descartaron otras causas de hipercoagulabilidad. Los mismos patrones de agregación y hallazgos en la microscopia electrónica fueron identificados, y se pudo establecer en ellos un patrón de herencia autosómico dominante.(14)

Otro estudio realizado por Mammen y colaboradores, en pacientes con neuropatía óptica isquémica idiopática, que tenían pérdida temporal o permanente de la visión, demostró, patrones de agregación plaquetaria alterados y respuestas anormales en la superficie de contacto. (12)

La experiencia de Mammen con decenas de casos se resume en varios artículos publicados desde mediados de la década de 1990 a 2003. Estos le permitieron proponer las pruebas de laboratorio claramente definidas y criterios clínicos para el síndrome de Plaqueta Pegajosa. Tabla 1. De acuerdo al patrón de agregación plaquetaria, Mammen identificó dos tipos de síndrome: Tipo I, caracterizado por hiperagregabilidad tanto con ADP como a con epinefrina y Tipo II, que se caracteriza por hiperagregabilidad

solo con epinefrina, siendo ésta más frecuente.(5) Esta clasificación, se basa únicamente en características de laboratorio y Mammen no observó ninguna relación entre esta clasificación y las manifestaciones clínicas, la respuesta al tratamiento, o el curso de la enfermedad. (15) En cuanto al tratamiento, se observó una excelente respuesta al tratamiento con ASA, en la mayoría de los pacientes, lo que confirma los resultados iniciales de Mefty.

Tabla 1. Valores de normalidad de las curvas de agregación plaquetaria, y criterios diagnósticos

	Agregación Plaquetaria después de la Activación con					
	ADP			EPI		
Concentración del agente (µM)	0.58	1.17	2.34	0.55	1.1	11.0
Rango normal (% agregación)	0–12	2–36	7.5–55	9–20	15–27	39–80
Criterios Diagnostico						
Diagnostico sugestivo	• Historia de TE e hiperagregabilidad a 1 conc. de 1 agente					
Diagnostico Confirmado	• Historia de TE e hiperagregabilidad a 2 conc. de 1 agente					
	• Historia de TE e hiperagregabilidad a 1 conc. de ambos agentes					
	• Historia de TE e hiperagregabilidad con solo 1 conc. de 1 agente, repetidamente					

Abreviaturas: ADP, difosfato de adenosina; EPI, epinefrina; TE, tromboembolismo. Adaptado de MAMMEN E F. Sticky Platelet Syndrome. Seminars in Thrombosis and homeostasis, 1999

Más adelante, Bick adopta la clasificación propuesta por Mammen en el diagnóstico y, en base a su propia observación, agregó el tipo III caracterizado por hiperagregabilidad solo después de ADP. Al igual que Mammen, no encontró ninguna relación entre los diferentes tipos (I, II o III) y las manifestaciones clínicas o las respuestas terapéuticas. Bick fue de los primeros en señalar el Síndrome de Plaqueta Pegajosa en pacientes con

trombosis venosa; y también confirmo la eficacia de las dosis bajas de aspirina.(16)

Bick y su grupo de investigadores publicaron un estudio con 153 pacientes que habían presentado eventos tromboembólicos sin explicación, se identificó la presencia del Síndrome de plaqueta pegajosa en el 17,6% de los casos. Además demostró que un número significativo de mujeres con abortos involuntarios recurrentes (18,2%) cumplían con los criterios de SPP. (17) Sobre la base del análisis en los cohortes de pacientes descritas por Bick, se llegó a la conclusión de que el síndrome de plaqueta pegajosa es la trombofilia mas frecuente en los pacientes con eventos trombóticos inexplicables después de la resistencia a la proteína C activada. Y es la segunda causa mas frecuente de perdidas fetales recurrentes después del Síndrome Antifosfolipidos.(17,18)

Chaturvedi y Dzieczkowski en 1999, describieron la ocurrencia de SPP junto con otros trastorno heredados de trombofilia en los mismos pacientes. Describieron un caso de una mujer joven con episodios de accidente cerebrovascular recurrentes y deficiencia de proteína S combinada. (19) Se informó posteriormente la aparición concomitante de SPP con otras trombofilias (niveles elevados de factor VIII, síndrome antifosfolipidos, G20201A protrombina y hiperhomocisteinemia).(20)

El-Amm, Mühlfeld, y Yagmur, describen hiperagregabilidad plaquetaria en pacientes sometidos a hemodiálisis o receptores de trasplante renal con complicaciones trombóticas o rechazo del injerto. Ellos evaluaron la curva de agregación plaquetaria con epinefrina en 30 pacientes sometidos a hemodiálisis y 34 pacientes con trasplante renal y encontraron una alta prevalencia de Síndrome de Plaqueta Pegajosa, en el 67 y 82%, respectivamente, en pacientes con eventos tromboembólicos posteriores. Los autores sugieren que la prueba de hiperagregabilidad plaquetaria puede complementar la evaluación de las complicaciones tromboembólicas en pacientes con enfermedad renal crónica.(21)

En nuestro país, el primer reporte de casos de este síndrome se hizo en 2002 por Beltrán E, Linares A. y Castaño S. en pacientes pediátricos del Hospital de La Misericordia en donde se advirtió la frecuencia elevada de esta entidad como causa de eventos tromboticos en la edad pediátrica.(22) Existe otro reporte de casos en pacientes obstétricas realizado en 2004 por Velásquez A, Carmona V, y Ramos G. en el Hospital Militar Central quienes sufrían eventos tromboticos durante el embarazo o tenían antecedente de abortos recurrentes.(23)

El síndrome de plaqueta pegajosa se ha considerado como un trastorno hereditario, sin embargo no ha sido posible determinar su causa exacta. Mammen, sugirió un defecto de glicoproteínas plaquetarias de membrana (GP) Sin embargo, no logro identificar cambios genéticos específicos. Kubisz y col, demostraron que la fisiopatología del síndrome esta relacionada con procesos de activación plaquetaria. Inicialmente, encontró aumento de la expresión superficial de CD62 y CD51, neoantígenos expresados sólo después de la activación plaquetaria en pacientes con SPP, en comparación con la población normal, luego de un episodio trombotico agudo.(24)

En las ultimas dos décadas, los resultados de varios análisis genéticos sugieren la relación entre ciertos polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de ciertas glucoproteinas plaquetarias e hiperagregabilidad plaquetaria, en pacientes portadores del alelo A₂ de GPIIIa PLA. (25) Esta anomalía se presenta por una sustitución específica de leucina-prolina que incrementa la unión del fibrinógeno a IIbIIIa, y expresión en la membrana de P-selectina, y esta relacionada con riesgo aumentado de eventos tromboticos, como enfermedad cardiovascular, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular.(26)

GAS6 es una proteína de los gránulos α , vitamina k dependiente, homologa a la proteína S que interactúa con Axl/Sky/Mer Tirosin-Kinasa, y se ha

demostrado en modelos animales que potencia la agregación, al afectar la función de los receptores α -2 adrenérgicos y de ADP. (27) El mecanismo por el cual esta proteína causa hiperagregabilidad plaquetaria aun no esta muy bien definido. Recientes estudios sugieren que su acción es relativamente tardía. Un reciente estudio de Chen y colaboradores sugiere que uno de los receptores tirosin-cinasa de Gas6 esta presente en plaquetas humanas y que su bloqueo conduce a inhibición de la agregación plaquetaria en modelos animales, sin embargo en plaquetas humanas esta información no ha sido demostrada.(28) Kubisz y col, estudiaron el polimorfismo Gas6 c. 834 β 7G > A en 128 pacientes con síndrome de plaqueta pegajosa no encontrando diferencias entre los pacientes del grupo control.(29)

La glucoproteína VI es una proteína crucial que participa en la activación, adhesión y agregación plaquetaria. Recientemente Kubisz y col, han estudiado la variabilidad del gen de la GPVI, encontrando mayor frecuencia de cuatro haplotipos en pacientes con síndrome de plaqueta pegajosa, sin embargo no pudieron demostrar en su estudio, que estos fueran mas frecuentes que en la población control.(30) Kotuličová y colaboradores mas recientemente han encontrado varios SNP de GP6(31) (rs1613662, rs1654419) en pacientes con síndrome de plaqueta pegajosa.

En los últimos años, Ruiz-Argüelles y su grupo de investigadores han publicado varios estudios, donde se han encontrado polimorfismos de la glicoproteína IIIa, sin embargo, los resultados publicados hasta la fecha no han logrado identificar un solo defecto genético responsable de síndrome de plaqueta pegajosa, ni mostrar una relación consistente de alteraciones genéticas en GPIIIa y el desarrollo del síndrome.(32)

Actualmente, tal y como lo planteo Mammen y Bick el ácido acetil salicílico es el fármaco de elección para el manejo de esta condición. Recientemente, un estudio de Velázquez-Sánchez-de-Cima publicó un estudio prospectivo sobre su experiencia con AAS, clopidogrel o el uso concomitante de ambos fármacos en 55 pacientes con SPP. Ellos observaron una excelente eficacia

de combinación con la terapia de combinación ASA y clopidogrel en la prevención de retrombosis. (33)

Hasta ahora, la mayor parte de los datos sobre la terapia son recogidos de pocos estudios en los que se utilizó solo ASA, y el uso de otros agentes antiplaquetarios es muy escaso y se limita a pocos informes de casos individuales.

Con el advenimiento de tecnologías de secuenciación de última generación, la capacidad de secuenciar de forma rápida todo el genoma de un individuo ha colocado esta estrategia entre las herramientas más eficaces para la detección de las causas genéticas de enfermedades de herencia mendeliana. Esto es especialmente cierto para la secuenciación del exoma (WES), que ha demostrado eficacia notable en la identificación de variantes genéticas en todo los genes de un individuo (34 35).

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de muestra:

Muestra por conveniencia.

Fue seleccionada para participar en el estudio una paciente quien presentó un evento trombótico agudo de la arteria cerebral media a la edad de 7 años y en quien se documentó como único hallazgo anormal, hiperagregabilidad plaquetaria con ADP y Epinefrina, sin antecedente de eventos trombóticos previos, y sin otros antecedentes patológicos de importancia previo al evento. Como antecedente familiar madre con migraña y hermana con antecedente de trombosis venosa en extremidades en la infancia, ambas con agregometrias que mostraron hiperagregabilidad plaquetaria con ADP y epinefrina.

Esta paciente fue seleccionada tomando como base a los pacientes diagnosticados con diagnóstico de Síndrome de Plaqueta pegajosa en la Fundación Hospital de la Misericordia y que cumplían con los criterios de inclusión.

4.2 Criterios de inclusión:

1. Al menos un episodio de trombosis 2. La confirmación de SPP de acuerdo a los criterios de Mammen y Bick; (Tabla 1) y 3. La firma voluntaria del consentimiento informado por el paciente y por sus padres o tutores, 4. Patrón de herencia mendeliano propuesto (autosómico dominante).

4.3 Criterios de exclusión:

1. El diagnóstico no claro de evento trombótico 2. Evento trombótico debido a las otras causas o estados de hipercoagulabilidad; 3. Etiología indeterminada o secundaria a otras causas de trombofilia primaria.

4.4 Diagnóstico de Síndrome de Plaqueta Pegajosa

Se confirmó en la historia clínica de la paciente que la agregometría fue realizada teniendo en cuenta los lineamientos propuestos por Mammen. Cada muestra se realizó con tres bajas concentraciones de ADP (2,34, 1,17, y 0,58 μ M) y EPI (11,0, 1,1 y 0,55 μ M). Los criterios de Mammen y Bick se utilizaron para el diagnóstico y clasificación de SPS. Se confirmó que la prueba fuese llevada a cabo mientras la paciente no recibía tratamiento antiagregante y esta fue realizada posterior a 3 meses del evento trombótico agudo.

Se comprobó la normalización de las curvas de agregación plaquetaria con ADP y epinefrina un mes después del inicio del tratamiento con Acido Acetilsalicílico. Fueron descartadas otras causas primarias de trombofilia congénita (deficiencia de proteína C y S, actividad antitrombina, niveles de homocisteína, presencia de anticuerpos antifosfolípidos, resistencia a la proteína C activada (APCR), mutación G20210A de la protrombina, mutación factor V de Leyden se analizaron mediante métodos estándar en esta paciente)

4.5 Preparación de muestras de DNA

Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular, de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Para la extracción del DNA se realizó aislamiento de leucocitos mediante metodología de separación por gradientes de sucrosa usando el reactivo

LSM (lymphocyte Separation Medium), el pellet de células obtenido se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

La extracción de DNA se realizó a partir de los pellets almacenados a -80°C , usando el kit PureLink™ Genomic DNA, (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y calidad de cada una de las extracciones se determinó mediante espectrofotometría leyendo a 260nm y determinando la pureza mediante la relación 260/280 nm, siendo aceptables relaciones por encima de 1,5. Esta medición se realizó usando el equipo Nanodrop 2000, Thermo

4.6 Secuenciación Exomica

La secuenciación del exoma completo fue realizada por la compañía FASTERIS Suiza. Para el inicio de la secuenciación se utilizó el Kit SureSelect Human All Exon V5 (50,4 Mb), según las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies). El DNA genómico (3 μg) se fragmentó (150-200 pb), se ligó al adaptador, y se amplificó mediante PCR. Después de la desnaturalización (95°C , 5 min), los fragmentos de biblioteca de DNA amplificados (~ 500 ng) se hibridaron en una solución a alta rigurosidad (65°C , 24 h) con sondas de captura de RNA con biotina (~ 120 pb). Híbridos de DNA resultantes se recuperaron por separación con perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dyna, Invitrogen, Carlsbad, CA).

El DNA capturado fue eluido (NaOH) y luego sujeto a fase sólida de secuenciación en un sistema HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA) usando el Kit Illumina Multiplexing Sample Preparation Oligo-nucleotide y el Kit HiSeq 2000 Paired-End Cluster Generation de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.7 Análisis de los datos

4.7.1 Secuenciación Exomica y análisis Bioinformatico

La secuenciación del exoma completo fue realizada por la compañía FASTERIS Suiza. Para el inicio de la secuenciación se utilizó el Kit SureSelect Human All Exon V5 (50,4 Mb), según las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies). El DNA genómico (3 µg) se fragmentó (150-200 pb), se ligó al adaptador, y se amplificó mediante PCR. Después de la desnaturalización (95 ° C, 5 min), los fragmentos de biblioteca de DNA amplificados (~ 500 ng) se hibridaron en una solución a alta rigurosidad (65 ° C, 24 h) con sondas de captura de RNA con biotina (~ 120 pb). Híbridos de DNA resultantes se recuperaron por separación con perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dyna, Invitrogen, Carlsbad, CA).

El DNA capturado fue eluido (NaOH) y luego sujeto a fase sólida de secuenciación en un sistema HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA) usando el Kit Illumina Multiplexing Sample Preparation Oligo-nucleotide y el Kit HiSeq 2000 Paired-End Cluster Generation de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Parámetros de calidad. Los parámetros de calidad de los datos se exploraron con el programa FastQC-ReadQC de la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org>). Con base en el informe de calidad de los archivos FASTQ se mantuvieron las secuencias alta calidad y fueron eliminadas las secuencias de baja calidad de los nuevos análisis.

4.7.2 Alineación de las lecturas con un genoma de referencia.

El secuenciador Illumina produjo millones de lecturas cortas que posteriormente fueron alineadas con un genoma de referencia para obtener la secuencia de DNA original. En este estudio fue utilizado el

algoritmo BWA (*Burrows-Wheeler Aligner* <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) (36). El genoma de referencia fue descargado del link: <https://icom.illumina.com/Message/iGenome/>

4.7.3 Localización de las variantes

El siguiente paso a fue la identificación de todas las variaciones presentes en el exoma. Para ello se utilizó el programa informático GATK (desarrollado por el Broad Institute, Cambridge, Massachusetts <http://www.broadinstitute.org/gatk/>), disponible de forma libre en la red.

Los SNPs e indels fueron identificados por el programa SAMTOOLS v.0.1.19 (<http://samtools.sourceforge.net/>) . Las variantes que tuvieron profundidades de menos de 20 x situados fuera de las regiones del exoma no fueron tenidas en cuenta.

4.7.4 Filtrado y Anotación de las Variantes

Este proceso fue realizado con el apoyo del grupo de Medicina Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria, del laboratorio del complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Para la anotación y el filtrado de las variante fue utilizado el programa ANNOVAR (www.openbioinformatics.org/annovar/) (37).

Las variantes anotadas fueron filtradas en cuatro bases de datos: NCBI CCDS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/ccdsBrowse.cgi>), RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>) y Encode (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE>).

En función de la probabilidad de que cada una de las variantes resultado del proceso de filtración previo fuera o no causal de la patología y que pudieran alterar la función de alguna proteína se realizó una priorización de las mismas filtrando de acuerdo a los siguientes puntos:

- Variantes en regiones no exónicas y de splicing
- Variantes no sinónimas, stop gain, stop loss, frame shift o que afectan al splicing
- Variantes con una frecuencia inferior a 1/2000 que es la frecuencia establecida para una enfermedad rara.
- Variantes con una frecuencia del alelo mutado por encima del 20%.

Posterior a este proceso de filtración, los probables daños producidos por las variantes encontradas en la estructura de las proteínas fueron predecidos por el programa DANN el cual es un programa de predictor de patogenicidad.

4.8 Procedimientos

El proyecto se desarrolló en las siguientes fases:

- Consentimiento: Fue solicitado inicialmente a todas las instituciones el aval para la realización de la investigación, a través del apoyo y soporte del departamento de pediatría de la Universidad Nacional de Colombia.
- Solitud de Base de datos: Se solicitó al Hospital de la Misericordia la base de datos de los pacientes que tengan como diagnóstico de la Clasificación Internacional de Enfermedades en su décima versión (CIE-10) otros trastornos de la coagulación y que correspondan a Síndrome de Plaqueta pegajosa.
- Evaluación de las historias. Fueron evaluados los criterios de inclusión de los pacientes a través de las historias clínicas que cumplan los correspondientes criterios de inclusión.
- La paciente escogida para participar en el estudio cumplía con todos los criterios de inclusión se realizará contacto con ellos, por lo que se solicitó el consentimiento informado para la realización de la prueba y se concertó una cita para firmar el consentimiento informado, y la toma de la muestra.

- Toma de muestras: Fue tomada mediante punción venosa, según lo descrito en el punto anterior en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia. Estas fueron manejadas con todos los protocolos de bioseguridad correspondientes.

5. CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO

5.1 Sitio de investigación:

- El estudio fue realizado en la fundación Hospital de la misericordia la cual es una institución de tercer nivel de atención, de exclusiva atención en pediatría, ubicada en la Avenida Caracas No 1 – 13 Bogotá D.C.
- El laboratorio en que fueron procesadas las muestras será el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, ubicado en Carrera 45 No 26 – 85, Facultad de Medicina, piso 3, Bogotá DC
- El laboratorio donde se realizó la secuenciación exómica es FASTERIS, Suiza
- El laboratorio donde fueron analizados los resultados fue el laboratorio de Medicina Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria del Complejo Universitario de Santiago de Compostela.

5.2 Manejo de sustancias o especímenes biológicos:

Fue seguido el protocolo de manejo de desperdicios y sustancias biológicas y no biológicas según el Programa de Gestión Integral de Residuos Sólidos (PGIRS) de cada institución.

5.3 Seguridad

Fue garantizado , a través de la ejecución de los procedimientos por personal calificado y entrenado, contando con personal idóneo para la toma de las muestras y personal de laboratorio entrenado en el procesamiento de las mismas.

5.4 Consideraciones éticas

El presente estudio fue basado en la recolección de muestras biológicas y la revisión de fuentes secundarias.

De acuerdo a la normatividad internacional, particularmente la declaración de Helsinki y a las pautas éticas para la investigación biomédica preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas – CIOMS-, fue establecido un riesgo mínimo y se realizó con adherencia a los tres principios éticos básicos: respeto por las personas, beneficencia y justicia.

El riesgo ético de esta propuesta de investigación según la resolución 8430 del 4 de Octubre de 1993 del Ministerio de Salud, artículo 11, literal A, se corresponde con una investigación con riesgo mínimo. Se estableció que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad según el artículo 15, literal H.

Esta propuesta de investigación fue evaluada y aprobada antes de su ejecución, por el comité de ética médica de la Universidad Nacional de Colombia y de la Fundación Hospital de la Misericordia.

5.5 Consentimiento Informado (anexo 1)

Este documento fue elaborado por el investigador principal, revisado por el comité de ética en investigación de la Fundación Hospital de la Misericordia y Universidad Nacional de Colombia e indicará los nombres de dos testigos. Debido a que la paciente tenía una clasificación de Simpson de “no compresión del lenguaje y no capacidad de decisión” (34), se realizó una discusión amplia para explicar a los padres los objetivos del estudio y estos tuvieron la autorizada en la decisión completa para el ejercicio basados en la

razón riesgo beneficio. Igualmente se brindó esta información a los miembros de la familia que cumplan con los criterios de inclusión.

El consentimiento informado, fue firmado por los padres o su representante legal y la paciente que aceptó participar en el estudio previa explicación detallada de todos los procedimientos a realizar.

7. Presupuesto

ITEM	VALOR		
	Personal	Unidad	Tiempo (meses)
Investigador principal 10 horas/mes Hora: 25000	250000/mes	12	3000000
Tutor de investigación 5 horas/mes Hora: 50000	250000/mes	12	3000000
Asesor epidemiológico 6 horas/mes Hora: 50000	300000/mes	12	3600000
Subtotal 1			9.600.000

ITEM	VALOR		
	Unidad	Tiempo (meses)	Total (pesos)
Materiales e insumos			
Papelería			400.000
Transporte	100000/mes	4	400.000
Kit PCR – Secuenciacion exoma	15000000		5.000.000
Búsqueda bibliográfica			100.000
Impresión trabajo			100.000
Subtotal 2			6.000.000

SUBTOTAL	VALOR (pesos)
Subtotal 1	9.600.000
Subtotal 2	6.000.000
TOTAL	15.600.000

8. Resultados

Un total de 1'320'253 variantes fueron detectadas inicialmente. Después del filtro inicial para seleccionar todas las variantes con una cobertura por encima de 20X fueron identificadas un total de 100'761 variantes. De estas 99.454 fueron anotadas.

Tras el proceso de priorización realizado fueron obtenidas un total de 317 variantes y posterior al filtro por predictores de patogenicidad utilizando el programa DANN fueron obtenidas 113 variantes.

Dado el número tan elevado de variantes obtenido, se realizó una búsqueda de posibles genes relacionados con el síndrome de plaqueta pegajosa.

Seleccionamos un total de 176 genes, de los que siete hacen parte de los genes que han sido relacionados en la literatura con el SPP y los restantes están relacionados con el proceso de agregación plaquetaria (anexo 3).

En el listado de variantes filtradas y priorizadas se confirmó una mutación tipo delecional de Novo de cinco nucleótidos (GCCCC) en el gen ORAI1, localizado en el cromosoma 12 (ORAI1:NM_032790:exon1:c.124_128del:p.A42fs) (*Fig1*). que resulto en un cambio del marco de lectura y provoca un codón de parada prematuro que afecta la expresión final de la proteína, (*Fig 2*). la cual es una subunidad del canal de calcio de membrana activada por el sensor de calcio STIM1 cuando las reservas de calcio son agotadas ubicado en la superficie plaquetaria.

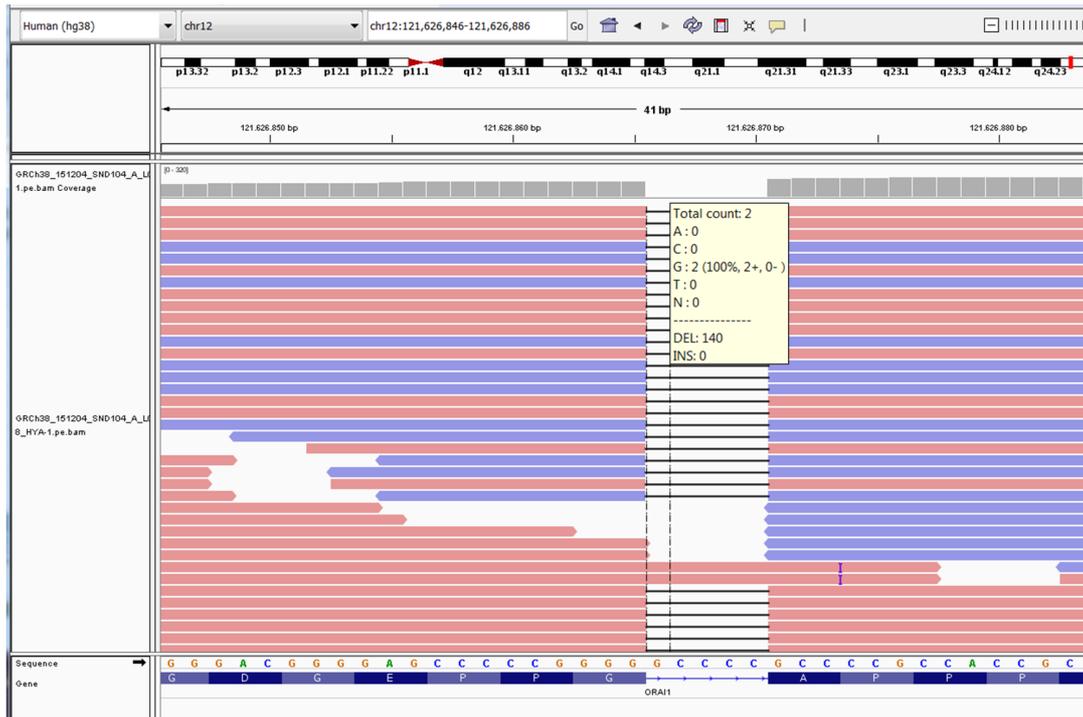


Fig 1. Delección de novo de cinco nucleótidos (GCCCC) en el gen ORAI1, localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (ORAI1:NM_032790:exon1:c.124_128del:p.A42fs).

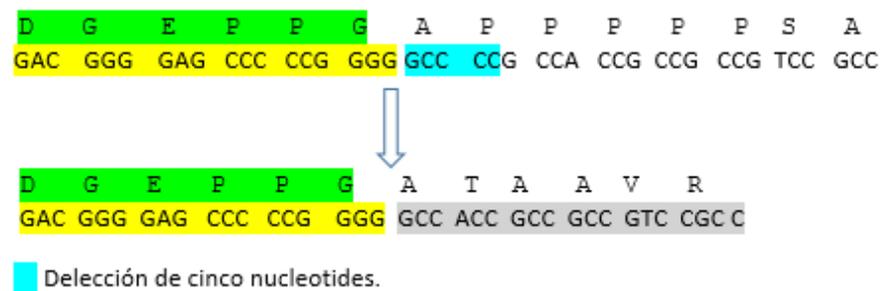


Fig 2. Delección de 5 nucleótidos que produjo cambio del marco de lectura y provocó un codón de parada prematuro afectando la expresión de la proteína.

9. Discusión

Con el uso de WES en una paciente con Síndrome de Plaqueta Pegajosa, se ha identificado una mutación delecional de 5 nucleótidos del gen ORAI1 localizado en el brazo largo del cromosoma 12 que resulta en un cambio en el marco de lectura que afecta el producto final de la proteína. La proteína codificada por este gen es una subunidad del canal de calcio de membrana activada por el sensor de calcio STIM1 cuando son depletadas en la célula las reservas de calcio. ORAI1 es expresado en linfocitos T, mastocitos y más recientemente se ha demostrado su presencia y vital importancia en plaquetas humanas (38).

La activación plaquetaria y la formación de trombos es un proceso de múltiples etapas que involucra diferentes vías de señalización para activar el cambio de forma de las plaquetas, la activación de integrinas, y degranulación plaquetaria (39). Las vías de señalización convergen en la activación de la fosfolipasa C (PLC), que conduce a la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. IP_3 es entonces capaz de unirse a su receptor en el retículo endoplasmático (ER) y media el flujo de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares en el citoplasma (40).

El proceso de secreción y agregación plaquetaria, así como la formación de trombos de plaquetas dependen del aumento de la concentración citosólica de calcio (Ca^{2+}), como resultado principalmente de la liberación intracelular de Ca^{2+} por los canales de depósito de calcio (SOC) (41). La molécula estromal 1 (STIM1) ha sido identificada como un sensor de Ca^{2+} que regula la liberación intracelular de Ca^{2+} por los canales de depósito de calcio (SOC) a través de la activación de la subunidad formadora de poros Orai1, el principal canal de entrada de Ca^{2+} que funciona en las plaquetas (42).

Después de la depleción de calcio de los depósitos intracelulares, Orai1 se activa por la molécula estromal 1 (STIM1), que se encuentra principalmente en las depósitos de Ca^{2+} intracelular. STIM sobresale en el lumen de los depósitos intracelulares y detecta el contenido de Ca^{2+} por su dominio de unión al calcio (43).

Han sido descritas tres isoformas Orai expresadas en plaquetas humanas, pero Orai1 parece ser la principal molécula implicada principalmente con SOC y la función plaquetaria (44). Orai1 se considera particularmente importante para la función de las plaquetas ya que el desarrollo de modelos murinos Orai1 deficientes in vivo ha demostrado que estos ratones Orai1 deficientes, son resistentes a la tromboembolia pulmonar, trombosis arterial, e infarto cerebral isquémico debido a la producción de canales de depósito de calcio (SOC) defectuosos, y al deterioro del proceso de activación y formación de trombos in vitro (41).

Wolfgang et al , desarrollaron un modelo murino in vivo con plaquetas Orai1^{R93W} mutadas e inactivas que se caracterizaron por una marcada reducción SOC y aumentos en $[Ca^{2+}]$ inducido por agonistas. Plaquetas Orai1^{R93W} mutadas demostraron una reducción de la activación de la integrina y degranulación deteriorada cuando las plaquetas fueron estimuladas con concentraciones bajas de agonistas en condiciones estáticas. Este defecto, sin embargo, no afectó significativamente la capacidad de las plaquetas Orai1^{R93W} para agregarse o adherirse a colágeno bajo condiciones de flujo arterial ex vivo. En contraste estas plaquetas Orai1^{R93W} mutadas fueron defectuosas en la exposición de fosfatidilserina en su superficie lo que sugiere que Orai1 es crucial para la respuesta procoagulante plaquetaria mas que otras respuestas Ca^{2+} celular dependientes (45).

Hasta el momento no han sido publicados en la literatura estudios en humanos que demuestren las implicaciones de mutaciones de Orai1 y su posible relación con alteraciones en la función plaquetaria que puedan

aumentar el riesgo de trombosis. Recientemente A. Tolios et al, demostraron que la estimulación de plaquetas por CRP (péptido relacionado al colágeno) no sólo conduce a la activación de Orai1 existente, sino que sobre regula la cantidad de proteína Orai1 en la membrana plaquetaria aumentando así la capacidad de las plaquetas para la formación de trombos en pacientes con infarto agudo del miocardio (46). Como se había demostrado anteriormente (47), un aumento de la expresión de Orai1 aumenta en paralelo la afluencia de Ca^{2+} . En consecuencia, se observa una correlación positiva entre la expresión de Orai1 y Ca^{2+} . La importancia de un rápido aumento de la expresión de Orai1 en la superficie ya ha sido demostrada para otros tipos de células (48). Estas observaciones demuestran, que la cantidad de proteínas Orai1 expresada en las plaquetas es mayor en los pacientes con infarto agudo del miocardio (IAM) que en los pacientes con cardiopatía isquémica estable, poniendo de relieve la importancia clínica de la expresión en la superficie plaquetaria de Orai1 para la activación plaquetaria y el desarrollo de enfermedad vascular oclusiva. Un aumento de la expresión Orai1 ya había sido demostrado en otras enfermedades con hiperactividad de las plaquetas, por ejemplo, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (49).

Si bien el papel decisivo de las plaquetas en la fisiopatología de la trombosis arterial y venosa en los pacientes con Síndrome de Plaqueta Pegajosa está bien establecido, una asociación entre la expresión alterada de Orai1, activación y agregación plaquetaria y el desarrollo de trombosis a la luz del conocimiento actual no ha sido demostrada. Se considera, con los hallazgos de esta investigación, que una alteración en la expresión de Orai1 podría conducir a activación plaquetaria, ganancia de la función de la proteína, y generar hiperagregabilidad plaquetaria y acontecimientos tromboembólicos clínicos. Son necesarios ensayos de movilización de calcio in vitro en plaquetas clonadas con la mutación encontrada en este estudio para comprobar esta hipótesis.

Por otro lado, considerando el impacto de la activación plaquetaria y la oclusión trombótica STIM1, Orai1 y sus reguladores pueden ser considerados moléculas diana para el desarrollo de terapias anti-trombóticas. Actualmente, varios inhibidores plaquetarios disponibles tienen como moléculas diana entre otros a la clooxigenasa-1, el receptor purinérgico P2Y₁₂ y la integrina activada α IIb β 3, pero estas terapias antiagregantes tienen limitaciones como complicaciones hemorrágicas graves y la falta de eficacia establecida por la presencia de pacientes no respondedores. Por lo tanto, estrategias antiplaquetarias nuevas pueden lograr controlar la activación de plaquetas sin alterar la hemostasia y de esta manera evitar complicaciones hemorrágicas que amenacen la vida. (50) Estudios hasta ahora disponibles en modelos animales sugieren que la vía SOCE/Orai1 en plaquetas es de vital importancia en la formación del trombo oclusivo arterial, aunque no así en la hemostasia primaria lo que convierte a esta molécula en un blanco muy interesante de investigación terapéutica actual (51,52).

10. Conclusiones y recomendaciones

- En una paciente con SPP tipo I, se encontró una mutación delecional de novo, en el gen Ori1 que codifica una subunidad de canal de calcio en la membrana plaquetaria. Estos hallazgos amplían el espectro de condiciones genéticas relacionadas con el SPP y proporcionan más apoyo para el entendimiento de su patogénesis, diagnóstico y tratamiento.
- Son necesarios ensayos de movilización de calcio in vitro en plaquetas clonadas con la mutación encontrada en este estudio para comprobar la hipótesis de ganancia de función de Ori1 derivada de la mutación encontrada
- En una próxima fase de este estudio se realizara la confirmación de la relación genotipo-fenotipo en los miembros de la familia afectados de la paciente para de esta manera confirmar el tipo de herencia de la mutación encontrada.
- Otros datos derivados de esta investigación podrían tener implicaciones en la fisiopatología del SPP y se encuentran actualmente en fase de análisis.

11. Agradecimientos

Agradezco a la paciente y familiares por su participación en esta investigación. Este estudio fue realizado gracias al apoyo de la Fundación Hospital de la Misericordia, la Universidad Nacional de Colombia, el laboratorio Fasteris en Suiza y el equipo de trabajo de la Doctora Maria Brion y el grupo de Medicina Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria del Complejo Universitario de Santiago de Compostela.

12. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA
DIVISIÓN ONCOHEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA**

ESTUDIO MOLECULAR DEL SINDROME DE PLAQUETA PEGAJOSA MEDIANTE ANALISIS DEL EXOMA

1. Introducción y propósito del estudio

La Universidad Nacional de Colombia, dentro del programa de Especialidad de Oncohematología Pediátrica, está haciendo un estudio en el que se busca encontrar alteraciones moleculares presentes en el Síndrome de Plaqueta Pegajosa, una de las causas más frecuentes de trombosis en la edad pediátrica. Si se encuentran alteraciones moleculares se mejorará la comprensión y aceptación del síndrome y de su fisiopatología, al igual que se podrán identificar probables blancos terapéuticos.

2. Porqué ha sido seleccionado

Existen dos razones para ingresar al estudio:

- Una de ellas es que a su hijo(a) se le realizó el diagnóstico de Síndrome de Plaqueta Pegajosa en la Fundación Hospital de la Misericordia.
- La otra razón es que usted tiene Síndrome de plaqueta Pegajosa y es familiar de un niño que tienen la enfermedad

3. Procedimientos del estudio

Si decide participar debe hacer lo siguiente:

- Proporcionar información acerca de su dirección y teléfono, esto con el fin de contactarlos para el seguimiento
- Permitir la realización de una punción venosa. En esta muestra de sangre se realizará el análisis de la secuenciación del exoma.
- Asistir a todos los controles planteados y seguir tratamiento según lo indicado por su médico tratante.
- Informar acerca de sus inquietudes y en caso tal, expresar el deseo de abandonar el estudio

4. Confidencialidad

La información que suministre, incluyendo los datos sobre su localización y de su enfermedad es confidencial y solo será conocida por su médico tratante y los investigadores.

Los resultados del estudio se presentarán en forma general y en ningún caso ni usted ni su hijo(a) podrán ser identificados.

Los resultados de los análisis de exoma podrán publicarse en bibliografía médica. Estas publicaciones no incluirán ninguna información que lo identifique personalmente.

5. Riesgos y beneficios

1. Los riesgos derivados de su participación en este estudio son mínimos y están asociados a la punción venosa que se realizará para obtener la muestra. Estos son básicamente sangrado, dolor o infección local.

2. Es posible que pueda tener una mutación en un gen incluido en el análisis de secuenciación del exoma, pero que en este análisis no se haya podido detectar la mutación. Por lo tanto, es posible que el análisis no detecte la causa de que usted tenga Síndrome de plaqueta pegajosa. Además, este análisis no se analiza el 100% de los genes del genoma humano. Existen algunos genes que no se pueden incluir en el análisis por motivos técnicos.
3. El realizar este estudio traerá beneficio a todos los pacientes que tengan diagnóstico de Síndrome de Plaqueta Pegajosa, ya que la información aportada podrá ser tomada como base para el diseño de nuevos estudios que busquen encontrar las alteraciones encontradas en otras poblaciones.

Adicionalmente, desde su casa tiene acceso telefónico para consultas respecto a posibles complicaciones o inquietudes.

6. Costos y compensación

Usted no recibirá pago por su participación en el estudio, ni este tampoco implica costos adicionales para su atención médica.

7. Derecho a rehusar o abandonar el estudio

Usted debe estar saber que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Aun después de dar su aceptación para participar, tendrá derecho a retirarse del estudio o a negarse a contestar alguna de las preguntas en el momento en que usted así lo desee. El hecho de retirarse no implicará cambios en la atención ni en el tratamiento recibidos.

8. Preguntas

Por favor siéntase en libertad de hacer cualquier pregunta si hay algo que no haya entendido. También si más adelante le surge alguna duda o inquietud, usted puede contactar a: Dra. Gisela Barros Garcia en el Departamento de Pediatría de la Fundación Hospital de la Misericordia (4° piso) o en el teléfono 3134652727

9. Declaración del participante

Nosotros le entregaremos una copia de este formulario. Al firmar esta forma usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado, que está de acuerdo en participar como sujeto de investigación en este estudio, y que está de acuerdo en:

- Proporcionar su dirección y teléfono
- Permitir toma de muestra mediante punción venosa para realizar secuenciación del exoma
- Asistir a las consultas de control y seguir el manejo propuesto por su médico tratante

¿Acepta participar en este estudio voluntariamente? Si_____ NO_____

Si usted ha aceptado participar por favor escriba su nombre completo y firme en el espacio correspondiente:

Nombre del participante_____

Firma del participante: _____ Fecha____/____/____
dd mm aa

Nombre del testigo 1_____

Firma _____ del _____ testigo _____ 1
_____ Fecha ____/____/____
dd mm aa

Nombre del testigo 2_____

Firma _____ del _____ testigo _____ Fecha ____/____/____

 dd mm aa

10. Asentimiento del paciente (*Diligenciar en los casos en que se requiera, según las reglas para la toma de decisiones con respecto a la participación de niños en la investigación*)

Certifico que he sido informado/a acerca de los objetivos y procedimientos de esta investigación. Con mi firma, declaro que estoy de acuerdo en participar en el estudio de *análisis molecular del Síndrome de plaqueta pegajosa mediante análisis del exoma*, en una muestra de sangre tomada de mis venas, aun cuando, en algunas ocasiones, la toma del examen no coincida con los otros exámenes que me realizarán en el tratamiento de la enfermedad y que para ello deba ser puncionado nuevamente.

Firma _____ del _____ paciente _____ Fecha
 ____/____/____

 dd mm aa

11. Declaración del investigador

Certifico que yo o algún miembro de mi grupo de investigación le ha explicado a la persona cuyo nombre aparece registrado en este formulario, sobre esta investigación y que esta persona entiende la naturaleza y el propósito del estudio así como los posibles riesgos y beneficios asociados con la participación en el mismo. Todas las preguntas que esta persona ha hecho, han sido contestadas.

Nombre de quien diligencia el consentimiento (investigador/encuestador):

 Firma: _____ Fecha ____/____/____

 dd

8.2 Anexo 2: Reglas para la toma de decisiones con respecto a la participación de niños en la investigación (34)

<i>Categoría del niño</i>	<i>Papel del comité de ética</i>	<i>Papel de los padres/cuidadores</i>	<i>Papel del investigador</i>	<i>Papel del niño</i>
*No comprensión del lenguaje	(1) Proteger intereses de los niños	(1) Ejercen autoridad de decisión completa	(1) Asegurar información completa	(1) No autoridad de decisión
*no capacidad de decisión	aprobando investigación que cumpla condiciones pre-especificadas (2) Información completa a los padres y su autorización	basándose en riesgo/beneficio (2) Estar presentes/disponibles durante la investigación (3) Retirar al niño del estudio si el riesgo supera al beneficio	(2) Retirar al niño si el riesgo/beneficio no es favorable (3) Anular decisión de los padres (ej: retirar al niño del estudio cuando aumenten riesgos)	(2) Puede protestar pero esto no lo excluirá del estudio
*Alguna comprensión del lenguaje	(1) y (2) (3) La información relevante se debe explicar al niño	(1), (2) y (3) (4) Compartir información con el niño acerca de la participación y responder preguntas (5) Prestar atención a la protesta del niño	(1), (2) y (3) (4) Asegurar información relevante al niño acerca de su participación y resolver preguntas (5) Prestar atención a la protesta del niño	(1) y (2) (3) Papel limitado en la toma de decisión (4) Puede realizar preguntas
*Capacidad limitada para tomar decisiones	(4) Requiere discusión y autorización documentada de padres y niño	(5) Prestar atención a la protesta del niño	(5) Prestar atención a la protesta del niño	
*Buena comprensión del lenguaje	(1), (2), (3) y (4) (5) Defender que la protesta del niño pueda ser autorizada en algunos casos	(2), (3) y (4) (6) Se requiere el acuerdo de los padres en todos los casos. En algunos casos la protesta del niño puede ser autorizada (7) Dar al niño la oportunidad de expresar sus deseos y tenerlos en cuenta en la evaluación del riesgo/beneficio (8) Autoridad limitada	(1), (2), (3) y (4) (6) Asegurar que el niño tenga la oportunidad de expresarse (7) Asegurar que los padres tengan en cuenta los deseos del niño	(5) Tiene mayor papel en la toma de decisión (6) Se requiere el acuerdo para participar, pero no es suficiente (7) La protesta puede excluirlo del estudio, excepto cuando los padres consideren que los beneficios superan los riesgos
*Capacidad de decisión en desarrollo				
*Buena comprensión del lenguaje	(6) Reconocer la capacidad del niño para la toma de decisiones	(8) (9) El acuerdo parental es necesario en algunas participaciones	(8) Asegurar información completa al niño sobre su participación	(8) suficiente autoridad para decidir (9) Se requiere el consentimiento para participar y algunas veces es suficiente (el acuerdo de los padres se requerirá en algunos casos)
*Capacidad de decisión sustancial				
*Maduro pero no independiente	(7) Aprobar investigaciones que cumplan condiciones pre-especificadas (8) Asegurar información completa al niño y cuando sea necesario, a sus padres (9) Documentar	(requerimiento legal, consecuencias a los padres, riesgo mayor al mínimo) pero no es suficiente	(9) Determinar si el consentimiento del niño es suficiente o si se requiere el acuerdo de los padres (10) Asegurar información relevante a los padres cuando estén involucrados legítimamente en la	(10) Se respetará su decisión de no participar

		consentimiento del niño y cuando sea necesario, acuerdo de los padres		decisión (11)Discutir con el niños el retiro del estudio cuando los riesgos superen beneficios	
*	Buena	(10)Similar a	(10)No autoridad para la	(12)Aplicar	(11)Capacidad de
comprensión	del	investigaciones	toma de decisiones	obligaciones del	decisión completa
lenguaje		realizadas en adultos		investigador cuando	(12)No está obligado
*Capacidad	de			involucra adultos	a compartir
decisión sustancial				competentes	información con sus
*Maduro	e				padres
independiente					

Anexo 3. Listado de posibles genes de interés relacionados con el SPP.

listado/s origen	Gen	Fuentes	
Platelet aggregation	ACTB	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ACTG1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY4	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY5	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY6	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY7	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY8	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ADCY9	KEGG (Platelet activation)	
SPS	ADRA2A	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442	
SPS	ADRA2B	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442	
SPS	ADRA2C	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442	
Platelet aggregation	AKT1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	AKT2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	AKT3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	APBB1IP	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	APP	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	ARHGAP35	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ARHGEF1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ARHGEF12	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	BTK	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	CD36	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	CD40LG	GeneCards ("platelet aggregation")	
AMBOS	CD63	GeneCards ("platelet aggregation")	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442
Platelet aggregation	C1SD2	OMIM ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	CLCNKB	OMIM ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	COL1A1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	COL1A2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	COL3A1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	COX1	OMIM ("platelet aggregation")	
AMBOS	E2	GeneCards ("platelet aggregation")	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sci-hub.io/pubmed/26567442
AMBOS	E2B	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
SPS	F2RL1		
SPS	F2RL2		
SPS	F2RL3		
Platelet aggregation	F2RL3	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	E3	GeneCards ("platelet aggregation")	
AMBOS	E5	GeneCards ("platelet aggregation")	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609
SPS	F7	http://www.genenames.org/cgi-bin/search?search_type=all&search=Prothrombin&submit=	
Platelet aggregation	F8	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	FCER1G	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	FCGR2A	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	FERMT3	KEGG (Platelet activation)	
AMBOS	FGA	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	FGB	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
AMBOS	FGG	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	FYN	KEGG (Platelet activation)	
SPS	GAS6	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703
Platelet aggregation	GNA13	KEGG (Platelet activation)	

Platelet aggregation	GNAI1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	GNAI2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	GNAI3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	GNAQ	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	GNAS	KEGG (Platelet activation)	
AMBOS	GP1BA	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	GP1BB	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	GP5	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	GP6	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	GP9	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	GUCY1A2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	GUCY1A3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	GUCY1B3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	HSPG2	GeneCards ("platelet hyperaggregability")	
AMBOS	ITGA2	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	ITGA2B	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
AMBOS	ITGB1	KEGG (Platelet activation)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442
AMBOS	ITGB3	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
Platelet aggregation	ITPR1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ITPR2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ITPR3	KEGG (Platelet activation)	
SPS	JMJD1C		http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442
	JMJD7		
Platelet aggregation	PLA2G4B	KEGG (Platelet activation)	
SPS	LAMP1		http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442
Platelet aggregation	LCP2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	LYN	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MAPK1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MAPK11	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MAPK12	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MAPK13	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MAPK14	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MAPK3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MMRN1	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	MPL	GeneCards ("platelet aggregation")	
SPS	MRV1		http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442
SPS	MTHFR		http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609280
Platelet aggregation	MYL12A	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MYL12B	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MYLK	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MYLK2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MYLK3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	MYLK4	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	NBEAL2	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
Platelet aggregation	NOS2	GeneCards ("platelet hyperaggregability")	
Platelet aggregation	NOS3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ORAI1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	P2RX1	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
Platelet aggregation	P2RY1	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	P2RY12	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
SPS	P2Y12		http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442
Platelet aggregation	PDGFA	GeneCards ("platelet aggregation")	

Platelet aggregation	PDGFB	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PDGFRA	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PDPN	OMIM ("platelet aggregation")	
AMBOS	PEAR1	GeneCards ("platelet aggregation")	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567
Platelet aggregation	PECAM1	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PF4	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PGG2	OMIM ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PGHS1	OMIM ("platelet aggregation")	
AMBOS	PIK3CA	KEGG (Platelet activation)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567
AMBOS	PIK3CB	KEGG (Platelet activation)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567
AMBOS	PIK3CD	KEGG (Platelet activation)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567
AMBOS	PIK3CG	KEGG (Platelet activation)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567
Platelet aggregation	PIK3R1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PIK3R2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PIK3R3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PIK3R5	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLA2G2A	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PLA2G4A	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	PLA2G4B	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLA2G4C	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLA2G4D	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLA2G4E	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLA2G4F	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLA2G7	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PLAU	OMIM ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PLCB1	GeneCards ("platelet hyperaggregability")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	PLCB2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLCB3	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLCB4	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLCG2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PLEK	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PPBP	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	PPP1CA	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PPP1CB	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PPP1CC	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PPP1R12A	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PRKACA	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PRKACB	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PRKACG	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PRKCI	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PRKCZ	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	PRKG1	OMIM ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	PRKG2	KEGG (Platelet activation)	
SPS	<i>PROC</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609280	
SPS	<i>PROS1</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609280	
Platelet aggregation	PTGIB	KEGG (Platelet activation)	
AMBOS	PTGS1	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
Platelet aggregation	RAP1A	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	RAP1B	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	RASGRP1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	RASGRP2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	RHQA	KEGG (Platelet activation)	

Platelet aggregation	ROCK1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	ROCK2	KEGG (Platelet activation)	
AMBOS	SELP	GeneCards ("platelet aggregation")	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567
SPS	SERPINC1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609280	
SPS	SHH	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567442	
Platelet aggregation	SNAP23	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	SNCA	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	SOD1	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	SRC	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	STIM1	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	SYK	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
AMBOS	TBXA2R	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")
Platelet aggregation	TBXAS1	GeneCards ("platelet aggregation")	KEGG (Platelet activation)
Platelet aggregation	THBS1	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	THPO	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	TLN1	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	TLN2	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	TREML1	GeneCards ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	TXA2	OMIM ("platelet aggregation")	
Platelet aggregation	VAMP8	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	VASP	KEGG (Platelet activation)	
Platelet aggregation	VWE	GeneCards ("platelet aggregation")	OMIM ("platelet aggregation")

13. Bibliografía

1. R IA. El descubrimiento de las plaquetas. *Rev Biomed*. 1997;8(3):197–208.
2. Hasle H. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. *Eur J Haematol*. 2010;84:189.
3. Rand ML, Kuhle S. Platelets and platelet function testing in children. *Prog Pediatr Cardiol*. 2005 Dec;21(1):63–9.
4. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Jan;31(4):381–92.
5. Kubisz P, Stasko J, Holly P. Sticky platelet syndrome. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2013 Sep;39(6):674–83.
6. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* [Internet]. 2004 Jan [cited 2014 Aug 11];114(5-6):447–53.
7. Berny-Lang M a, Jakubowski J a, Sugidachi A, Barnard MR, Michelson AD, Frelinger AL. P2Y12 receptor blockade augments glycoprotein IIb-IIIa antagonist inhibition of platelet activation, aggregation, and procoagulant activity. *J Am Heart Assoc*. 2013 Jun;2(3):e000026.
8. López A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2014;13(B):2–7.
9. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1992;267:11300–6.
10. al-Mefty O, Marano G, Raiaraman S, Nugent GR, Rodman N. Transient ischemic attacks due to increased platelet aggregation and adhesiveness. Ultrastructural and functional correlation. *J Neurosurg*. 1979;50:449–53.
11. Holiday PL, Mammen E GJ. Sticky platelet syndrome and cerebral infarction in young adults. Ninth International Join Conference on Stroke and Cerebral Circulation (abstract). 1983.
12. Mammen EF, Barnhart MI, Selik NR, Gilroy J, Klepach GL. “Sticky platelet syndrome”: a congenital platelet abnormality predisposing to thrombosis? *Folia Haematol*. 1988;115:361–5.

13. Frenkel EP, Mammen EF. Sticky platelet syndrome and thrombocythemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003 Feb;17(1):63–83.
14. Rubenfire M, Blevins RD, Barnhart M, Housholder S, Selik N, Mammen EF. Platelet hyperaggregability in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Am J Cardiol.* 1986;57:657–60.
15. Kubisz P, Ruiz-argüelles DGJ, Glasg F, Holly P, Ruiz-delgado GJ. Sticky Platelet Syndrome : History and Future. *Semin Thromb Hemost.* 2014;1(212):1–9.
16. Lenka B, Jana F, Jela I, Pavol H, Jan S, Peter K. Sticky platelet syndrome : where is its cause ? *acta Medica Martiniana.* 2008;23–9.
17. Bick RL. Recurrent Miscarriage Syndrome due to Blood Coagulation Protein/Platelet Defects: Prevalence, Treatment and Outcome Results. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 2000. p. 115–25.
18. Bick RL. Sticky Platelet Syndrome: A Common Cause of Unexplained Arterial and Venous Thrombosis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 1998. p. 77–81.
19. Chaturvedi S, Dzieczkowski JS. Protein S deficiency, activated protein C resistance and sticky platelet syndrome in a young woman with bilateral strokes. *Cerebrovasc Dis.* 1999;9:127–30.
20. Chaturvedi S, Dzieczkowski J. Multiple hemostatic abnormalities in young adults with activated protein C resistance and cerebral ischemia. *J Neurol Sci.* 1998;159:209–12.
21. Yagmur E, Frank RD, Neulen J, Floege J, Mühlfeld AS. Platelet Hyperaggregability is Highly Prevalent in Patients With Chronic Kidney Disease: An Underestimated Risk Indicator of Thromboembolic Events. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013;23728835.
22. Beltran E, Linares A CS. El síndrome de la plaqueta pegajosa. Primer reporte de casos en niños en Colombia y revisión de la literatura. *Pediatría.* 202AD;37:15–21.
23. Velasquez A C V. El síndrome de la plaqueta pegajosa. *Rev Colomb Ginecol y Obstet.* 2004;55(3):232–9.
24. Staško J, Bartošová L, Mýtník M, Kubisz P. Are the platelets activated in sticky platelet syndrome? *Thromb Res.* 2011 Jul;128(1):96–7.

25. Wiwanitkit V. PIA1/A2 Polymorphism of the Platelet Glycoprotein Receptor IIb/IIIa and Its Correlation With Myocardial Infarction: An Appraisal. *Clin Appl Thromb*. 2006 Jan 1 [cited 2014 Jul 13];12(1):93–5.
26. Duan H, Cai Y, Sun X. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism HPA-3 b/b is associated with increased risk of ischemic stroke in patients under 60 years of age. *Med Sci Monit*. 2012 Jan;18(1):CR19–24.
27. Kubisz P, Bartosová L, Ivanková J, Holly P, Stasko J, Skerenová M, et al. Is Gas6 protein associated with sticky platelet syndrome? *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010 Dec;16(6):701–4.
28. Chen C-H, Lo Y-K, Ke D, Liu C-K, Liou C-W, Wu H-L, et al. Platelet glycoprotein Ia C807T, Ib C3550T, and IIIa PI(A1/A2) polymorphisms and ischemic stroke in young Taiwanese. *J Neurol Sci*. 2004 Dec 15;227(1):1–5.
29. Kubisz P, Bartosová L, Ivanková J, Holly P, Stasko J, Skerenová M, et al. Is Gas6 protein associated with sticky platelet syndrome? *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010;16:701–4.
30. Kubisz P, Ivanková J, Škereňová M, Staško J, Hollý P. The prevalence of the platelet glycoprotein VI polymorphisms in patients with sticky platelet syndrome and ischemic stroke. *Hematology*. 2012 Nov [cited 2014 Jul 13];17(6):355–62.
31. Kotuličová D, Chudý P, Škereňová M, Ivanková J, Dobrotová M, Kubisz P. Variability of GP6 gene in patients with sticky platelet syndrome and deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2012. p. 543–7.
32. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Camacho-Alarcón C, Reyes-Nuñez V, Moncada-González B, Valdés-Tapia P, et al. Primary thrombophilia in Mexico IX: the glycoprotein IIIa PLA1/A2 polymorphism is not associated with the sticky platelet syndrome phenotype. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012;19(6):689–92.
33. Velázquez-Sánchez-de-Cima S, Zamora-Ortiz G H-RJ. Primary thrombophilia in Mexico X: a prospective study of the treatment of the sticky platelet syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2013;
34. Kelly B, MacKay-Lyons MJ. Ethics of involving children in health-related research: Applying a decision-making framework to a clinical trial. *Physiother Canada*. 2010;62:338–46.
35. Clark MJ, Chen R, Lam HYK, Karczewski KJ, Chen R, Euskirchen G, et al. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies. *Nat Biotechnol*. 2011;29(10):908–14.

36. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* [Internet]. 2010;26(5):589–95.
37. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164.
38. Tolhurst G, et al. Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets.* 2008;19(4):308-31
39. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3):403-412.
40. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):517-529.
41. Braun A, et al. Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood* 2009; 113: 2056-2063.
42. Bergmeier W, Stefanini L. Novel molecules in calcium signalling in platelets. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 187-190.
43. Borst O, et al. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signalling and function by regulation of Orai1 expression in megakaryocytes. *Blood* 2012; 119: 251-261.
44. Varga-Szabo D, et al. The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischaemic brain infarction. *J Exp Med* 2008; 205, 1583-1591.
45. Gilio K, et al. Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *J Biol Chem* 2010; 285: 23629-23638.
46. Bergmeier W, et al. R93W mutation in Orai1 causes impaired calcium influx in platelets. *Blood* 2009; 113: 675-678.
47. Tolios A. Increased platelet Ca²⁺ channel Orai1 expression upon platelet activation and in patients with acute myocardial infarction, *Thrombosis and Haemostasis*, 2013; 110: 386-389.
48. Borst O, Schmidt EM, Munzer P, et al. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signaling and

function by regulation of Orai1 expression in megakaryocytes. *Blood* 2012; 119: 251-261.

49. Woodard GE, Salido GM, Rosado JA. Enhanced exocytotic-like insertion of Orai1 into the plasma membrane upon intracellular Ca²⁺ store depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: 1323-1331.
50. Zbidi H, Lopez JJ, Amor NB, et al. Enhanced expression of STIM1/Orai1 and TRPC3 in platelets from patients with type 2 diabetes mellitus. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 43: 211-213.
51. Gawaz M. Intelligent platelet inhibitors are on the horizon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1949-1950
52. Authi KS. Orai1: a channel to safer antithrombotic therapy. *Blood* 2009; 113: 1872-1873.