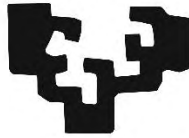


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Implementación de la Next Generation
Sequencing en el diagnóstico de las
Anemias Hemolíticas Congénitas**

Rafael Andrés Del Orbe Barreto

2016



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

TESIS DOCTORAL

**Implementación de la Next Generation Sequencing en el
diagnóstico de las Anemias Hemolíticas Congénitas**

Doctorando:

Rafael Andrés Del Orbe Barreto

Directoras:

África García-Orad

Beatriz Arizabalaga

**Si quieres ir rápido, camina solo.
Si quieres llegar lejos, ve acompañado.
(Proverbio africano)**

AGRADECIMIENTOS

Versa el adagio *“Ser talentoso te abre muchas puertas, ser agradecido te las mantiene abiertas”*.

Quiero agradecer a todas las personas que me han ayudado a cumplir esta meta. En primer lugar a Beatriz Arrizabalaga, gracias por tus enseñanzas, por tus consejos y tu paciencia. Has sido un apoyo incondicional y fuente continua de motivación.

A mi co-directora Dra. África García-Orad, por brindarme su apoyo y servir de guía en este camino.

Al servicio de Hematología del Hospital Universitario Cruces, por permitirme ir creciendo cada día más profesionalmente.

A Ana Belén de la Hoz y todos los compañeros de la plataforma de Genética-Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria BioCruces, por su valiosa cooperación en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Leticia Ribeiro, Celeste Bento, Teresa Fidalgo y demás compañeros del Servicio de Hematología Clínica del Centro Hospitalar de Coimbra en Portugal, por compartir conmigo sus enormes conocimientos en la Eritropatología.

Al personal técnico y de enfermería del laboratorio de Eritropatología y de Biología Molecular de Hematología del Hospital Universitario Cruces, por su generosa colaboración.

A este país, por acogerme y brindarme enormes oportunidades.

Gracias a todos.

PUBLICACIONES

El trabajo de esta tesis ha sido reflejado en las siguientes publicaciones:

Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz AB, García-Orad Á, Tejada MI, Garcia-Ruiz JC, Fidalgo T, Bento C, Manco L, Ribeiro ML. Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing. *Int J Lab Hematol*. 2016 Jul 17. doi: 10.1111/ijlh.12551. [Epub ahead of print].

Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz Rastrollo AB, García-Orad A, Gonzalez Vallejo I, Bento C, Villegas A, García-Ruiz JC. Hereditary xerocytosis, a misleading anemia. *Ann Hematol*. 2016 Sep;95(9):1545-6.

Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, de la Hoz AB, Aragües P, Garcia-Ruiz JC, Arrieta A, Adán R, Manco L, Macedo-Ribeiro S, Bento C, Ribeiro ML. Severe neonatal jaundice due to a de novo glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient mutation. *Int J Lab Hematol*. 2016 Apr;38(2):e27-9.

ABREVIATURAS

3UTR:	Región 3'no traducida del gen
5UTR:	Región 5'no traducida del gen
A:	Adenina
ABD:	Anemia de Blackfan-Diamond
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADC:	Anemia Diseritropoyética Congénita
AHC:	Anemia Hemolítica Congénita
Ala:	Alanina
ARN:	Ácido ribonucleico
Arg:	Arginina
Asp:	Ácido Aspártico
Asn:	Asparagina
BDGP:	Berkeley Drosophila Genome Project
BWA:	Burrows-Wheeler Aligner
C:	Citosina
Cys:	Cisteína
CHCM:	Concentración media de hemoglobina corpuscular
CNV:	Variaciones en número de copia
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilen-diaminotetraacético
EMA:	Eosin-maleimida
EH:	Esferocitosis hereditaria
ExAC:	Exome Aggregation Consortium
G:	Guanina
Gb:	Gigabases
GC:	Guanina-Citosina
Glu:	Ácido glutámico
Gln:	Glutamina
Hb:	Hemoglobina
His:	Histidina
HGMD:	Human Gene Mutation Database
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
Ile:	Isoleucina
KB:	Kilobase
Leu:	Leucina
MAT:	Microangiopatía trombótica
Met:	Metionina
MLPA:	Multiplex Ligation-dependet Probe Amplification.
NaCl:	Cloruro de sodio
NGS:	Next-Generation Sequencing
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
Phe:	Fenilalanina
Pro:	Prolina
PTT:	Púrpura Trombótica Trombocitopénica
Q-PCR:	PCR Cuantitativa

Rh:	Rhesus
SIFT:	Scale-invariant feature transform
Ser:	Serina
SHU:	Síndrome Hemolítico Urémico
SHUa:	Síndrome Hemolítico Urémico atípico
T:	Timina
Thr:	Treonina
Trp:	Triptófano
Tyr:	Tirosina
UCSC:	University of California Santa Cruz
Val:	Valina
VCM:	Volumen Corpuscular Medio
WES:	Whole Exome sequencing
WGS:	Whole Genome sequencing

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
-ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS (AHC)	5
1. AHC Corpusculares	9
1.1. AHC por alteración en la síntesis de Hemoglobina	9
1.2. AHC por alteraciones de proteínas de membrana	13
a) Membranopatías por alteración de la deformabilidad	13
b) Membranopatías por alteración de la permeabilidad iónica	17
c) Diagnóstico de las Membranopatías	19
1.3. AHC debidas a alteraciones del sistema enzimático	21
2. AHC Medulares	25
2.1. Anemias diseritropoyéticas congénitas (ADC)	25
2.2. ADC Variantes	31
3. AHC Extrínsecas	32
3.1. Púrpura Trombótica Trombocitopénica	32
3.2. Síndrome Hemolítico Urémico	33
-APLICACIONES DE LA NEXT GENERATION SEQUENCING EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO	35
1. Secuenciación del genoma completo	36
2. Secuenciación del exoma completo	36
3. Secuenciación dirigida a genes candidatos	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
- Hipótesis	43
- Objetivos	44

MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Diseño del panel de genes	47
2. Proceso de valoración de la utilidad clínica del panel en el diagnóstico molecular de las AHC	49
RESULTADOS	67
1. Diseño del panel	69
2. Valoración de la utilidad clínica del panel en el diagnóstico de las AHC	74
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXOS	123

INTRODUCCIÓN

- ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS.

Las Anemias Hemolíticas Congénitas (AHC) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por un incremento en la destrucción de hematíes en sangre periférica o menos frecuente por un aumento de la apoptosis intramedular por eritropoyesis ineficaz de los eritroblastos maduros [1,2], su causa siempre está ligada a un defecto genético, pudiendo ser la alteración en el ADN por herencia o nueva mutación. Son enfermedades de tan baja prevalencia que se incluyen en la categoría de enfermedades raras < 250.000 pacientes (5/10.000) [3]. Debido a que estas enfermedades afectan solo a unos pocos o cientos de individuos, ha sido un reto desarrollar herramientas diagnósticas y tratamientos para estos pacientes.

El conocer la mutación causante de la AHC permitirá un mejor conocimiento de la biología de la enfermedad y será útil para la identificación de portadores dentro de la familia, lo que a su vez facilitará un adecuado consejo genético y de ser necesario llevar a cabo un adecuado diagnóstico prenatal o pre-implantacional. Por tanto, la detección de las mutaciones causantes de estas patologías va a ser una herramienta eficaz no solo en el correcto diagnóstico sino también en la prevención del riesgo de nuevos casos.

Fisiopatología.

Desde el punto de vista fisiopatológico, los mecanismos de destrucción eritrocitaria son de dos tipos:

- Hemólisis intravascular: implica la rotura del eritrocito (lisis) en el compartimento vascular, produciendo liberación de hemoglobina al plasma (hemoglobinemia) con posibilidad de eliminación por orina (hemoglobinuria) [4,5].

- Hemólisis extravascular: implica una exacerbación de los mecanismos fisiológicos de retirada de eritrocitos senescentes por el sistema monocito-macrófago en el hígado, bazo, y médula ósea, produciéndose aumento de los niveles de bilirrubina en plasma debido al catabolismo de la hemoglobina [6].

Aunque en ocasiones exista un componente mixto, el predominio de uno de ellos generará una expresión clínica diferente en cada caso.

Manifestaciones clínicas.

La expresión clínica de una AHC es extremadamente variable y dependerá de la intensidad de la anemia, de la forma de presentación (aguda o crónica), de la fisiopatología de la hemólisis (extra o intravascular) y de la edad del paciente. Esta variabilidad determina un rango de expresión muy amplio que puede abarcar desde una anemia grave en el feto incompatible con la vida o en el extremo opuesto ser una anemia leve que se diagnostica en la edad adulta.

El efecto deletéreo que produce una AHC va a depender de la hipoxia ligada a la anemia propiamente pero también de los productos derivados de la hemólisis (bilirrubina, hemoglobinemia) y a largo plazo por la sobrecarga de hierro que el exceso de eritropoyesis mantenida produce [1,2,4]. Estas consecuencias pueden manifestarse desde el período perinatal en forma de *Hydrops* o en forma de encefalopatía aguda y/o posterior *Kernicterus* (daño neuronal irreversible producido por la hiperbilirrubinemia), durante la edad infantil afectando el crecimiento y desarrollo del niño y en la edad adulta en forma de sobrecarga férrica que puede afectar órganos como el hígado, corazón y glándulas endocrinas [2,6].

Tratamiento.

Las AHC teniendo en cuenta su origen mutacional no tienen tratamiento curativo salvo el trasplante de progenitores hematopoyéticos que solo se reserva para los casos graves con altos requerimientos transfusionales y la terapia génica que ya está en desarrollo avanzado en los casos de Beta-Talasemia mayor [7]. La esplenectomía es un tratamiento sintomático en aquellas entidades donde la hemólisis se produce preferentemente en el bazo y la terapia transfusional es el recurso habitual en episodios de crisis agudas en la mayoría de estas anemias [8,9].

Diagnóstico.

El diagnóstico de una anemia congénita con datos bioquímicos de hemólisis exige valorar la diferente etiopatogenia de la misma, para lo cual en un primer paso se evalúa la hematimetría y sus índices eritrocitarios (Volumen Corpuscular Medio-VCM, Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media-CHCM), la morfología eritrocitaria y el tipo de hemólisis (extra o intravascular). Estos datos morfológicos y bioquímicos unidos al patrón de herencia nos ayudan a delimitar la causa en corpuscular, medular y/o extrínseca. Para ratificar la sospecha, se requieren pruebas específicas de cada entidad. Muchas de estas determinaciones son complejas y precisan de laboratorios de referencia especializados, además la muestra sanguínea a analizar no siempre consigue ser adecuada ya que requiere que no haya transfusión previa, o requiere una cantidad que no es fácil de obtener en un recién nacido, un tiempo de procesamiento corto o la necesidad de eliminar el exceso de reticulocitos en el caso de medición de enzimas [7]. Por tanto, ante resultados no concluyentes el análisis genético para la detección de la mutación específica en el gen sospechoso se convierte en la única posibilidad de alcanzar el diagnóstico correcto [10].

Clasificación.

Las AHC según donde se manifieste el daño genético que va a generar la causa de la hemólisis se pueden agrupar en tres categorías 1) Corpusculares, 2) Medulares y 3) Extrínsecas.

- 1) AHC Corpusculares: incluyen aquellas anemias debidas a alteraciones en la síntesis de hemoglobina, defectos de las proteínas que componen el citoesqueleto de la membrana eritrocitaria y déficits de los sistemas enzimáticos del hematíe.

- 2) AHC Medulares: Las Anemias Diseritropoyéticas Congénitas comparten un componente de insuficiencia medular con un cuadro hemolítico, debido al aumento de la apoptosis de los eritroblastos maduros en la médula ósea e incremento de hemólisis periférica de los hematíes anómalos.

- 3) AHC Extrínsecas: La oclusión vascular en la microcirculación debida a la ausencia en el suero de Factor ADAMTS13 o anomalías del sistema del complemento determinarán la hemólisis.

1. AHC Corpusculares.

1.1. AHC por alteración en la síntesis de Hemoglobina.

La hemoglobina (Hb) A del adulto, es una proteína con cuatro cadenas polipeptídicas α_2 y β_2 a cada una de las cuales se une un grupo Hemo cuyo átomo de hierro (Fe^{++}) se une de forma reversible al oxígeno [11].

Las AHC debidas a alteración en la síntesis de Hb o Hemoglobinopatías son las enfermedades monogénicas más frecuentes en el mundo [12], originadas por mutaciones puntuales, inserciones o deleciones de los genes que codifican las globinas α (*HBA1*, *HBA2*) y globina β (*HBB*). Estas alteraciones pueden ser cuantitativas (α y β Talasemias, dependiendo del gen afectado *HBA1* y *HBA2* o *HBB* respectivamente) o cualitativas, entre las cuales se encuentran un gran número de hemoglobinopatías estructurales [13,14,15].

Las Talasemias pueden presentar formas clínicas minor o rasgos talasémicos (portadores heterocigotos) que son generalmente asintomáticos, sin embargo existen formas de Talasemia intermedia que provocan la presencia de anemia microcítica con algunas de las manifestaciones clínicas generalmente leves derivadas de la hematopoyesis incrementada (deformidades esqueléticas, dolores óseos, retraso del crecimiento) y extramedular (hepato-esplenomegalia) [14]. La forma de β -Talasemia mayor (anemia de Cooley) constituye la forma más grave con anemia transfusión-dependiente, hepato-esplenomegalia gigante, retraso en el crecimiento y alteraciones craneofaciales y esqueléticas por hiperplasia de la médula ósea [15] (Figura 1). El componente hemolítico de la β -Talasemia mayor es muy discreto y clínicamente se manifiesta a partir del 6º mes de vida ya que el recién nacido posee predominantemente Hb Fetal ($\alpha_2 \gamma_2$) [13].

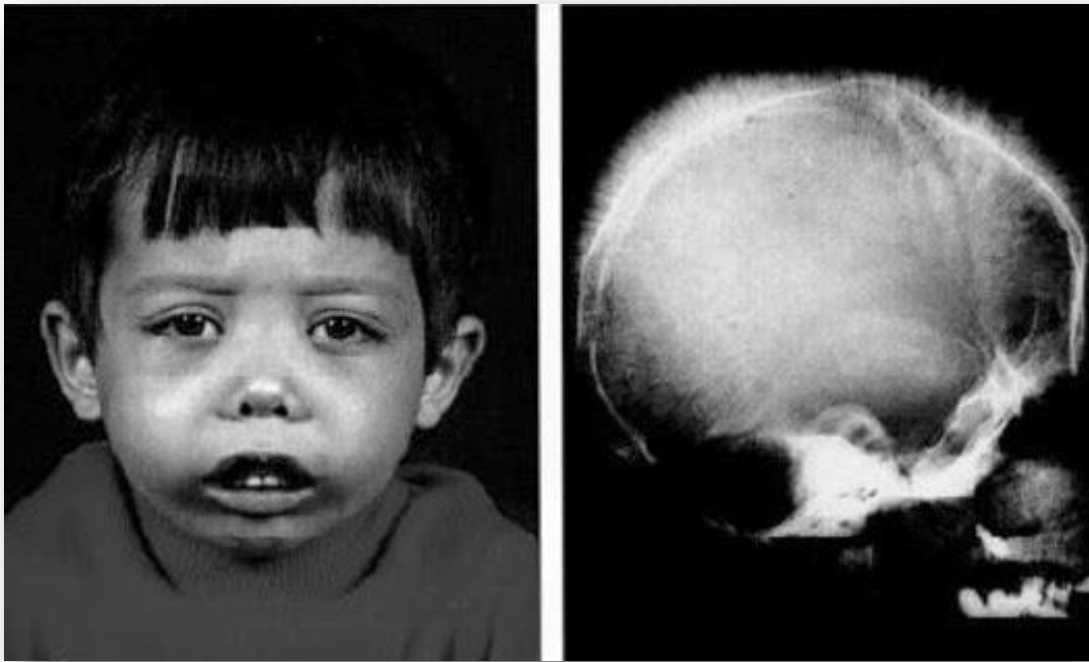


Figura 1. Alteraciones esqueléticas en un paciente con Beta-Talasemia Mayor. Tomado de <http://easypediatrics.com/tag/hematology>.

La forma de α -Talasemia mayor es incompatible con la vida por la incapacidad del feto de sintetizar cadenas α de globina que necesitan las diferentes hemoglobinas fetales, el feto sufre una severa anemia que determina un *Hydrops* fetal y muerte [14].

En relación a las hemoglobinopatías estructurales, existen más de 1.000 tipos descritas [16], que afectan a aminoácidos situados en la superficie de la molécula (HbS y hemoglobinopatías asintomáticas), en el interior en las uniones $\alpha\beta 1$ (hemoglobinopatías inestables) o en las uniones $\alpha\beta 2$ (hemoglobinopatías con alteración en la afinidad por el O_2), y en las zonas de contacto con el grupo Hemo que producen la estabilización del hierro en forma férrica (hemoglobinopatías M) [17].

La hemoglobinopatía estructural más frecuente y con importantes consecuencias clínicas cuando se hereda de forma homocigota es la HbS (anemia drepanocítica o falciforme), en la cual el hematíe falciforme presenta adhesión incrementada a los endotelios vasculares provocando crisis vaso-oclusivas y se destruye finalmente mediante hemólisis intra y extravascular. Los pacientes presentan además mayor susceptibilidad a infecciones y tendencia trombótica. La clínica viene determinada por la presencia de anemia crónica y retraso del crecimiento con exacerbaciones en episodios agudos isquémicos que pueden afectar a cualquier órgano: sistema nervioso (infartos-hemorragias), pulmones (distrés respiratorio agudo), hígado (isquemia hepática), riñones (hematuria, alteraciones tubulares, glomerulares, insuficiencia renal crónica), infartos esplénicos, retinopatía, infartos óseos, úlceras cutáneas y miocardiopatía [18].

Las hemoglobinopatías inestables son causa de AHC de herencia autosómica dominante. Se han descrito más de 150 variantes de Hb inestables que pueden ser de gen α o de gen β , que al provocar la sustitución o pérdida de uno o más aminoácidos de la cadena globínica afectan la conformación y estabilidad de la molécula de la Hb. La mayoría de las Hb inestables son debidas a mutaciones puntuales que se limitan a determinadas familias, la más frecuente es la Hb Köln de amplia distribución mundial, también en España se han publicado Hb Madrid, Hb Extremadura, Hb Santander, Hb Castilla, entre otras. La mayoría de las Hb inestables cursan con un cuadro de hemólisis crónica de intensidad variable según el defecto en la configuración molecular que se acompaña de exacerbaciones debido a infecciones o uso de determinados fármacos oxidantes [8,19].

Para el diagnóstico de una hemoglobinopatía se dispone de diferentes pruebas, entre ellas se incluyen la evaluación de la morfología eritrocitaria (específica para Hb S, pero no en el resto de las

hemoglobinopatías), demostración de la inestabilidad de la Hb mediante incubación con azul Cresil y formación de cuerpos de Heinz, sin embargo éstos hallazgos pueden ser inespecíficos y observarse en otras eritropatías [20]. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar permiten identificar un gran número de variantes, pero estas pruebas pueden tener limitada utilidad si la Hb en estudio presenta un patrón de elución o una carga eléctrica superficial similar a la Hb A normal. Los test de solubilidad e inestabilidad (frente a isopropanolol o calor) de la Hb presentan una sensibilidad y especificidad limitada [21,22].

Hoy en día se conocen muchas de las mutaciones que originan las AHC debidas a alteración en la síntesis de Hb. Con la intención de mejorar su diagnóstico, se han desarrollado en los últimos años diferentes pruebas genéticas, que permiten detectar las mutaciones más frecuentes. Una de las más utilizadas en clínica es la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA), fundamentalmente para el estudio de α -Talasemias. Con el MLPA se detectan fácilmente grandes deleciones muy frecuentes, sin embargo debido a la amplia heterogeneidad alélica la aplicación de este estudio solo es posible para el estudio de las variantes más frecuentes. Otra estrategia que se ha planteado es la utilización de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis por secuenciación Sanger, aunque esto permitiría la identificación de las variantes conocidas y nuevas supone un consumo de tiempo y coste económico que ha limitado su implementación en la rutina asistencial [20,21,22].

1.2. AHC por alteraciones de proteínas de membrana (membranopatías).

La membrana es el componente estructural responsable de las características mecánicas, del transporte iónico y de la diversidad antigénica del hematíe. Su estructura está formada por una capa lipídica y proteínas divididas en proteínas integrales (Banda 3, Complejo Rh) y estructurales o periféricas (α -Espectrina, β -Espectrina, Anquirina, Proteína 4.1 y Proteína 4.2) [23].

Esta estructura aporta al hematíe sus dos propiedades específicas:

- a) Deformabilidad reversible
- b) Permeabilidad que mantiene en el eritrocito un alto contenido en K^+ y bajo en Na^+ .

Las alteraciones en los diferentes genes que codifican estas proteínas son la base etiológica de las anemias secundarias a membranopatías, presentando típicamente un patrón hereditario autosómico dominante en la mayoría de los casos, sin embargo pueden ocurrir formas “de novo” o recesivas [24].

a) Membranopatías por alteración de la deformabilidad.

La Esferocitosis, Eliptocitosis, Piroipoikilocitosis y Ovalocitosis hereditarias son entidades que adquieren su nombre según la forma que adquiere el hematíe (Figura 2).

- Esferocitosis Hereditaria.

La Esferocitosis Hereditaria (EH) se produce por interrupción de las interacciones verticales que implican a α ó β -Espectrina, Anquirina, Proteína 4.2, Banda 3 y Complejo Rh (Figura 3). Es la membranopatía más frecuente, con mayor incidencia en Europa del Norte que en otros grupos

étnicos, siendo una entidad muy heterogénea tanto en el aspecto genético como clínico [24]. Durante el periodo neonatal suele ser más sintomática que en el adulto, con datos clínicos de hemólisis en el 65% de los recién nacidos [25].

La frecuencia de las diferentes mutaciones aunque es muy variable según los autores se estima: Anquirina (50-60%), β -Espectrina (20%), Banda 3 (10-15%) [24-26]. Se han publicado casos donde la coherencia de polimorfismos de baja expresión en α -Espectrina pueden conducir a formas recesivas graves [27].

La esplenectomía que es la estrategia terapéutica dirigida para reducir la hemólisis de los hematíes defectuosos, se recomienda que se retrase hasta pasado los 6 años de edad por el riesgo de adquirir infecciones por gérmenes encapsulados, lo que hace que la anemia se prolongue en un período importante para el desarrollo de los niños afectados [9,28].

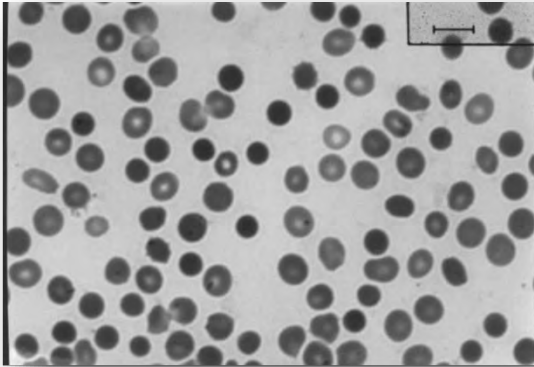
- Eliptocitosis y Piroplasmocitosis Hereditaria.

La interrupción de las interacciones horizontales entre α -Espectrina y β -Espectrina y entre β -Espectrina y la Proteína 4.1 son la causa de la Eliptocitosis Hereditaria [23]. La enfermedad se caracteriza por un gran polimorfismo clínico, genético y molecular, presentando una frecuencia estimada de mutaciones en *SPTA1* (α -Espectrina) 65%, *SPTB* (β -Espectrina) 30%, y *EPB41* (Proteína 4.1) 5% [26]. La clínica es similar a la de la EH pero el número de casos asintomáticos es superior. Las formas leves son heterocigotas siempre con eliptocitos superior al 30%. La mayoría de los pacientes afectados de Eliptocitosis muestran una herencia autosómica dominante y su alta prevalencia en zonas endémicas de Paludismo presuponen un mecanismo de protección del eliptocito frente al Plasmodium cuyo mecanismo se desconoce [24].

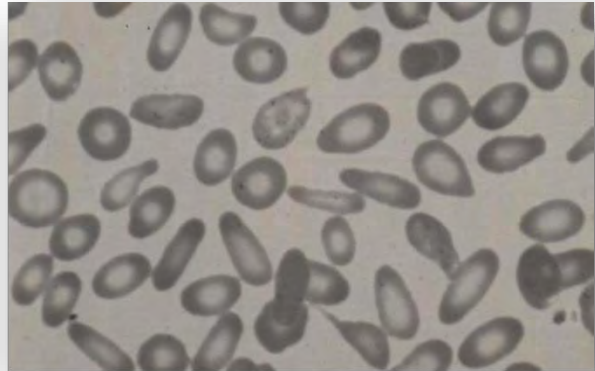
La Piropoiquilocitosis hereditaria supone la expresión más severa de Eliptocitosis, con una afectación bialélica de la Espectrina y por tanto de transmisión autosómica recesiva. Los pacientes afectados presentarán mutaciones homocigotas o doble heterocigotas en α -Espectrina. Se presenta como una anemia hemolítica severa al nacer o en infancia temprana, que requiere transfusiones periódicas y que la única alternativa curativa es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Esta entidad es más frecuente en población africana (1-2% de portadores en África Ecuatorial), y presenta una morfología eritrocitaria muy patente de microesferocitos extremos, marcada microcitosis 50-60 fL, poiquilocitosis y eliptocitosis [26].

- Ovalocitosis del Sudeste Asiático.

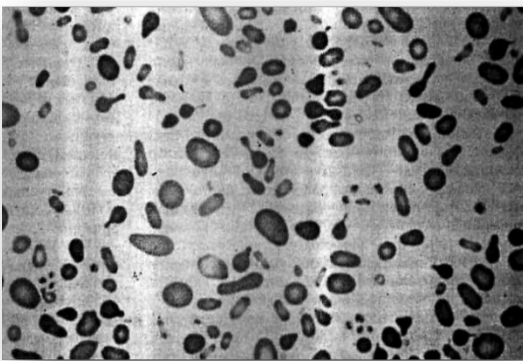
Es un trastorno de la deformabilidad muy frecuente en zonas endémicas de malaria del sudeste de Asia (5-25%). Los hematíes se caracterizan por su forma de ovalocitos atravesados por 1 o 2 líneas o estomas. Es una condición autosómica dominante y los pacientes presentan mínima hemólisis sin anemia. Es una entidad específica donde a diferencia de las membranopatías previamente descritas, un único defecto el gen *SLC4A1* (delección de 27 pares de bases) que codifica la Banda 3 es responsable de la enfermedad [23,29].



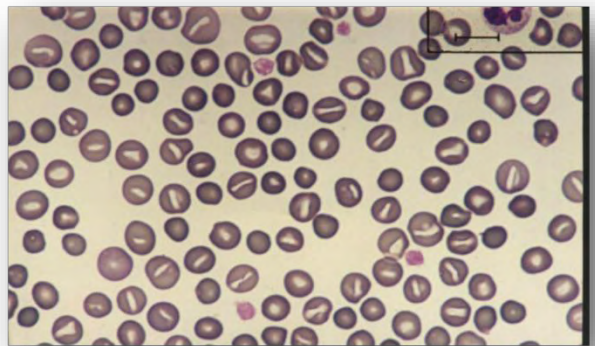
Esferocitosis Hereditaria



Eliptocitosis Hereditaria



Piropoiquilocitosis hereditaria



Estomatocitosis Hereditaria

Figura 2. Morfología eritrocitaria en las membranopatías por alteración de la deformabilidad y permeabilidad iónica.

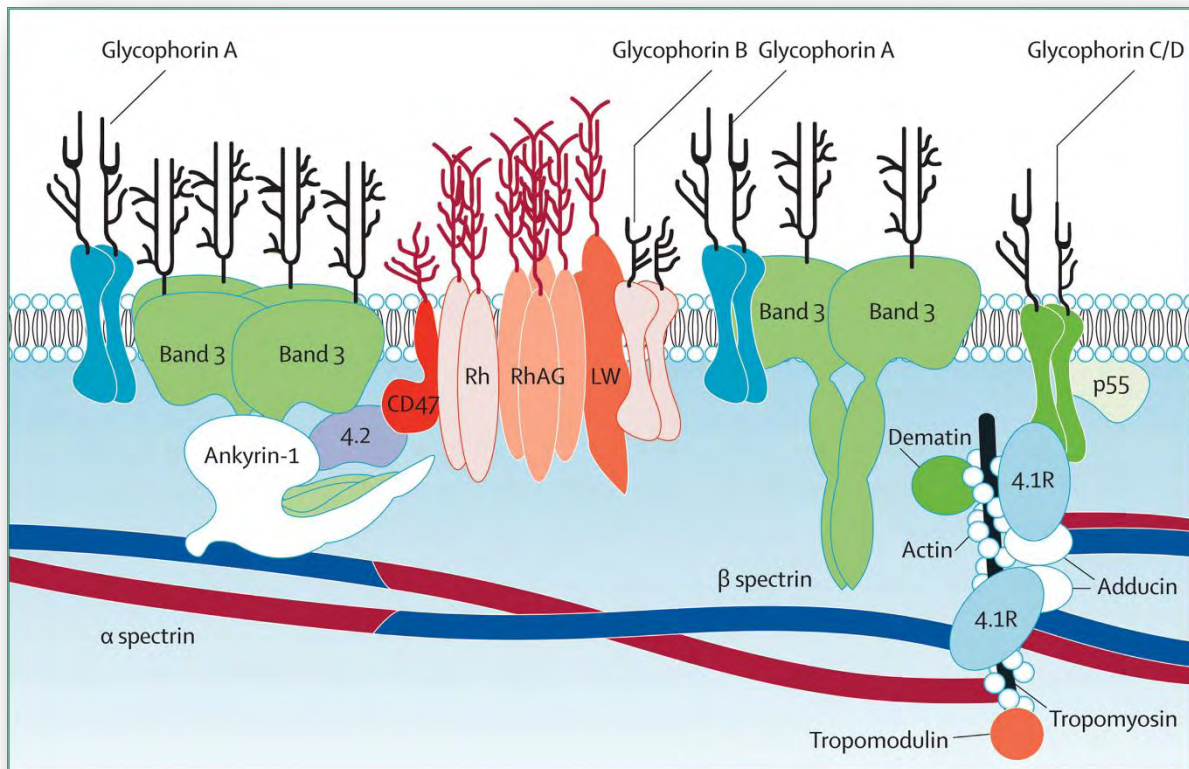


Figura 3. Estructura del citoesqueleto de la membrana eritrocitaria. Tomado de Lancet 2008, Vol 372, n°9647, p1411–1426.

b) Membranopatías por alteración de la permeabilidad iónica.

Es un grupo complejo de entidades donde existen diferentes tipos de alteraciones de la permeabilidad basal al Na^+ y K^+ cuyas bases moleculares y genéticas son motivo de investigación en la actualidad. Dependiendo de la alteración primaria de transporte de cationes se originará deshidratación (Xerocitosis o Estomatocitosis deshidratada) o en otros casos sobrehidratación (Estomatocitosis hiperhidratada) de los hematíes [30,31].

- Estomatocitosis deshidratada (Xerocitosis).

Es el desorden más frecuente. El trastorno primario se debe a un incremento de permeabilidad que favorece la salida del K^+ , disminuyendo el contenido neto de cationes y consecuentemente de agua en el interior del hematíe. Se han identificado mutaciones en el gen *PIEZO1* como causantes de Estomatocitosis deshidratada [32]. Más recientemente, se han descubierto mutaciones puntuales en el gen *KCCN4*, que codifica al canal Gardos relacionadas con la patogénesis de la Xerocitosis [33].

La Xerocitosis se hereda de forma autosómica dominante y se manifiesta como una hemólisis crónica que puede ser severa incluso en periodo perinatal. Se considera un síndrome pleiotrópico porque además de la morfología anormal y la hemólisis crónica puede acompañarse de hiperpotasemia familiar y/o un cuadro transitorio de ascitis perinatal, ya que la proteína *PIEZO1* se encuentra en el endotelio peritoneal de los vasos linfoides del feto y no en el adulto [32,34].

- Estomatocitosis hiperhidratada.

El trastorno primario es un aumento de permeabilidad a la entrada del Na^+ . La forma clásica es muy infrecuente habiéndose publicado no más de 20 casos. Se hereda de forma autosómica dominante y se comporta como una anemia moderada o severa con marcada macrocitosis y muy frecuentes estomatocitos 40-60%. En la Estomatocitosis hiperhidratada no se han encontrado alteraciones genéticas responsables, aunque se ha observado variantes en el gen *RHAG*, que codifica a la glicoproteína asociada al Rh [35,36].

c) Diagnóstico de las Membranopatías:

Una anemia hemolítica extravascular, con historia clínica familiar y alteraciones morfológicas eritrocitarias características, aunque no siempre específicas, van a orientar el diagnóstico hacia una membranopatía.

En el laboratorio diferentes pruebas nos acercan gradualmente al diagnóstico específico de cada entidad.

- Frotis de sangre periférica. Esencial valorar la morfología eritrocitaria, VCM y CHCM.
- Pruebas clásicas para valorar la relación superficie/volumen del hematíe, como la Fragilidad/Resistencia osmótica, o de su mayor fragilidad a la temperatura como la criohemólisis. En neonatos se presenta la dificultad de que la morfología y el test de fragilidad osmótica pueden presentar resultados controvertidos.
- Citometría de Flujo. Test EMA (Eosin 5´Maleimide), esta molécula se liga de forma covalente a un residuo de lisina de la Banda 3. Este test presenta una sensibilidad de 92% y especificidad del 99% para diagnóstico de Esferocitosis, independiente que el defecto este en Banda 3, β -Espectrina o Proteína 4.2, aunque es menos sensible en alteraciones de la Anquirina.
- Estudio de la deformabilidad por Ektacitometría, que es la técnica de referencia para la valoración de la capacidad de deformación que tiene el hematíe en un gradiente osmótico. Los específicos perfiles de curvas que se establecen permite hacer el diagnóstico diferencial entre Esferocitosis, Eliptocitosis, Piropoikilocitos, Ovalocitosis y Estomatocitosis Hereditarias. Se requiere una pequeña muestra de 100 μ l y se puede realizar en neonatos, sin embargo la disponibilidad de Ektacitómetros en centros asistenciales es muy limitada. De hecho en España sólo se dispone de un instrumento.

- Estudios de Permeabilidad iónica de la membrana. Al igual que los estudios por Ektacitometría no están disponibles para su realización de manera rutinaria.
- Electroforesis de las proteínas de membrana. La identificación de la proteína afecta en Esferocitosis y Eliptocitosis es el paso previo al estudio molecular del gen implicado.

Todas estas pruebas descritas tienen limitada sensibilidad y especificidad para cada tipo de membranopatía, además requieren que la muestra sea de reciente extracción y condiciones propias del paciente como no haber sido transfundido recientemente, pero sobre todo son pruebas que requieren laboratorios de alta especialización que realizan estas determinaciones muchas veces dentro de proyectos de investigación y que no están disponibles para su uso en la rutina asistencial [28,30].

Por todo ello, muchas veces se ha de recurrir al estudio molecular de los genes implicados para lograr establecer un correcto diagnóstico. Ya que hoy en día se conocen los genes implicados en esta patología, el estudio genético provee una herramienta clave en el diagnóstico [24,26], sin embargo mediante la secuenciación directa de cada uno de los genes implicados supondría la realización de numerosos experimentos en el laboratorio con el correspondiente coste económico y de tiempo, por lo que la aplicación de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento podrían solventar este problema.

1.3. AHC debidas a alteraciones del sistema enzimático eritrocitario (enzimopatías).

Las enzimopatías eritrocitarias son desordenes hereditarios que afectan a los genes que codifican a las enzimas del glóbulo rojo y son comúnmente asociadas con anemia hemolítica normocítica-normocrómica [37]. A diferencia de otras anemias hemolíticas congénitas como las membranopatías, la morfología eritrocitaria no muestra anormalidades específicas y no hay antecedentes familiares por ser de herencia recesiva (excepto los casos de deficiencia de Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa y Fosfoglicerato-Kinasa, asociadas al cromosoma X).

Otro dato específico respecto a otras causas de AHC, es que en muchas de ellas hay afectación del SNC y muscular [38, 39].

Las enzimopatías afectan el sistema metabólico del hematíe, que depende de 4 vías fundamentales: 1) glucólisis anaerobia, 2) metabolismo del glutatión, 3) metabolismo nucleotídico y 4) sistema diaforásico (Figura 4).

En todas ellas, el sistema enzimático es formado durante la etapa de eritroblasto nucleado y reticulocito, sin posibilidad de regenerarse durante la vida del hematíe [40].

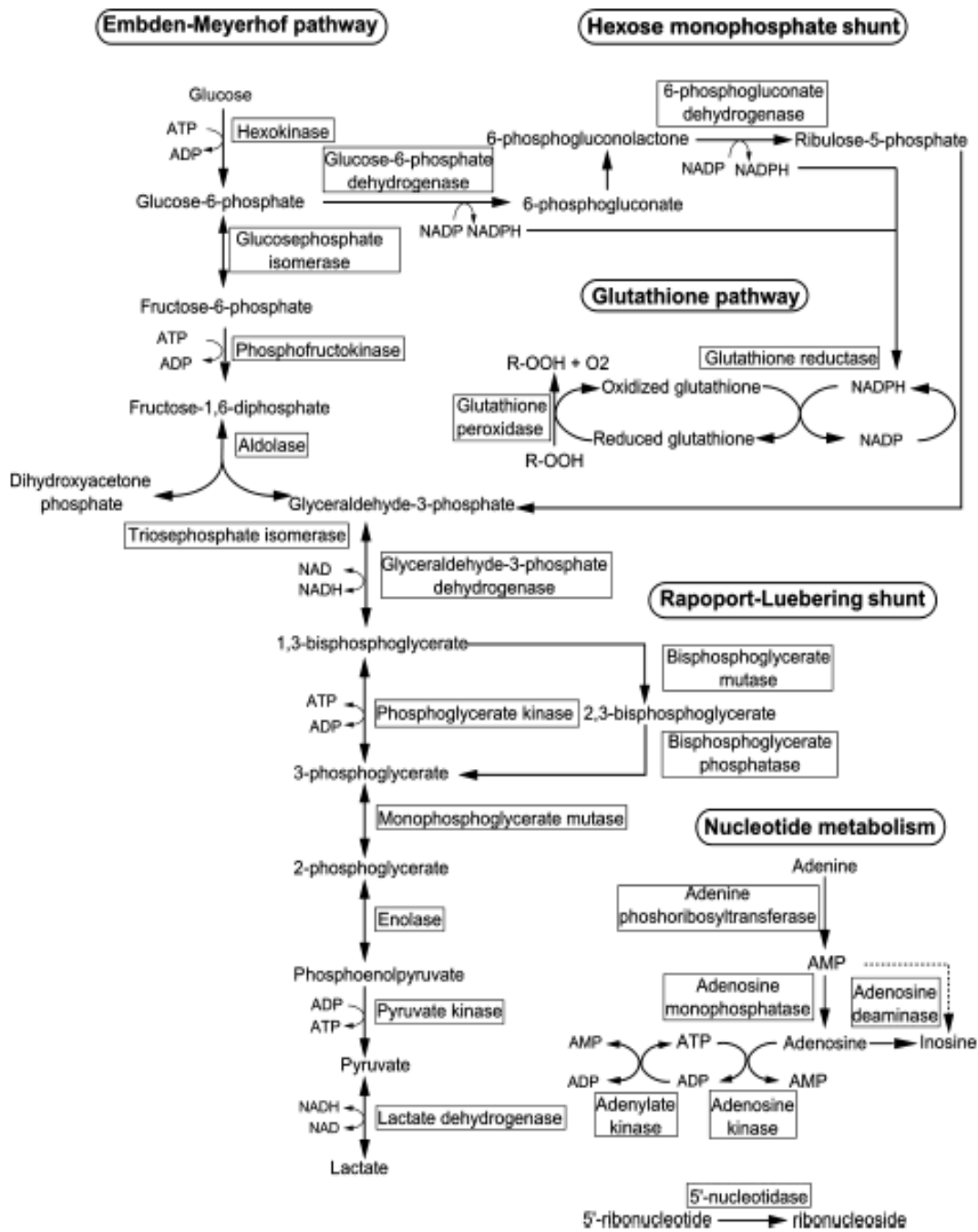


Figura 4. Representación esquemática de las principales vías metabólicas del glóbulo rojo. Tomado de Koralkova P et al. Int Jnl Lab Hem. 2014, 36, 388–397.

Se han descrito déficits enzimáticos en todas las vías metabólicas, algunos de los cuales cursan con hemólisis generalmente crónica y en algunos casos con alteraciones sistémicas neurológicas o musculares generalmente graves y susceptibilidad a infecciones (Tabla 1).

Tabla 1. Alteraciones enzimáticas eritrocitarias causantes de AHC.

Enzima (gen)	Función enzimática en el hematíe	Herencia	Nº de casos reportados	Nº Mutaciones
Adenilano-quinasa (AK1)	Metabolismo nucleotídico	AR	12 familias	7
Aldolasa (ALDOA)	Glucólisis anaerobia	AR	6 casos	4
Fosfofructokinasa (PFKFB1)	Glucólisis anaerobia	AR	50 – 100 casos	17
Fosfoglicerato-Kinasa (PGK1)	Glucólisis anaerobia	Ligado al cromosoma X	40 casos	19
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD)	Shunt Hexosa-monofosfato	Ligado al cromosoma X	>400 x 10 ⁶	>100
Glucosa-fosfato-isomerasa (GPI)	Glucólisis anaerobia	AR	>50 familias	31
Glutation-reductasa (GSR)	Metabolismo del Glutati6n	AR	2 familias	3
Glutati6n-sintetasa (GSS)	Metabolismo del Glutati6n	AR	>50 familias	32
Hexokinasa (HK1)	Glucólisis anaerobia	AR	20 casos	5
Pirimidina 5'-nucleotidasa (NT5C3A)	Metabolismo nucleotídico	AR	>60 familias	26
Piruvato-quinasa (PKLR)	Glucólisis anaerobia	AR	>500 familias	> 200
Triosa-fosfato-isomerasa (TPI1)	Glucólisis anaerobia	AR	50 – 100 casos	18

AD: Autos6mica dominante. AR: Autos6mica recesiva.

Adaptado de Koralkova P et al. Int Jnl Lab Hem. 2014, 36, 388–397.

El diagnóstico de una anemia hemolítica por déficit enzimático se basa generalmente en la exclusión: test de Coombs directo negativo, fragilidad osmótica normal, ausencia de alteraciones morfológicas específicas y ausencia de hemoglobina anormal. El diagnóstico diferencial requiere la demostración de una actividad reducida en la enzima específica y la caracterización molecular del defecto a nivel del ADN de modo confirmatorio. Es importante destacar que no hay una relación entre el grado de deficiencia de la actividad enzimática y la severidad clínica [41, 42].

La determinación de la actividad enzimática eritrocitaria está influenciada por varios factores: a) condiciones durante el almacenamiento y transporte de la muestra; b) una apropiada depleción de los leucocitos y plaquetas de la muestra sanguínea, ya que los leucocitos y las plaquetas pueden expresar isoenzimas codificadas por otros genes que pueden interferir con la medición de la actividad enzimática en el hematíe; c) transfusiones sanguíneas; d) edad del paciente, ya que la expresión de muchas enzimas está relacionada con la edad y e) la presencia de un elevado número de reticulocitos en la muestra de sangre [39].

En caso de sospecha de un déficit enzimático, la caracterización molecular del defecto a nivel de ADN es esencial para la confirmación del diagnóstico. Las mutaciones son usualmente únicas, lo que hace necesario secuenciar la región codificante completa, incluyendo regiones intrónicas flanqueantes que afectan al splicing. La identificación de una mutación causal de enfermedad permite realizar un adecuado consejo genético y diagnóstico prenatal. Además, el estudio genético puede ser la única forma de establecer un diagnóstico en neonatos o pacientes con dependencia transfusional [37,39].

Es por ello que la caracterización molecular es necesaria para un mejor entendimiento de la compleja correlación genotipo-fenotipo en las enzimopatías eritrocitarias, por lo que proponemos que el empleo de la "Next Generation Sequencing" en este campo puede ser de gran utilidad como herramienta diagnóstica.

2. AHC Medulares.

2.1. Anemias Diseritropoyéticas Congénitas.

Las Anemias Diseritropoyéticas Congénitas (ADC) abarcan un grupo de entidades raras que se originan durante las fases tardías de la eritropoyesis [43]. Se caracterizan por eritropoyesis inefectiva con distintas características morfológicas en la médula ósea (Figura 5) y se acompañan de un componente hemolítico. Los pacientes presentan usualmente anemia, ictericia, esplenomegalia y una respuesta reticulocitaria sub-óptima para el grado de anemia [44].

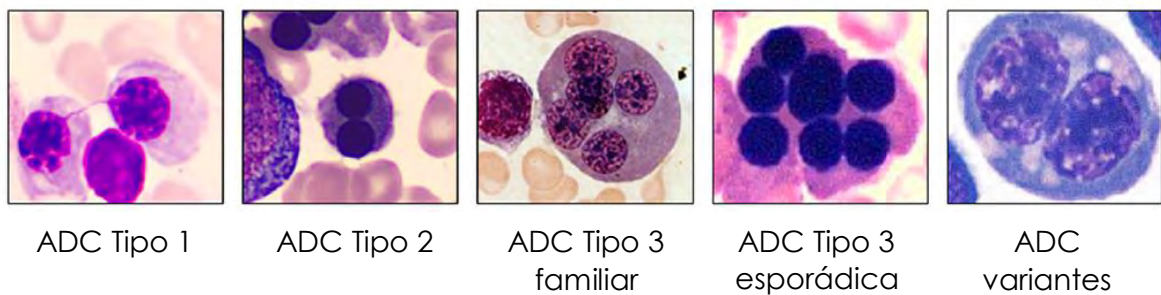


Figura 5. Morfología de eritroblastos patognomónicos en médula ósea en los diferentes tipos de ADC. Tomado de Iolascon A. et al. Blood. 2013;122(13):2162-2166.

El término diseritropoyesis fue utilizado por primera vez por Crookston (1969) y posteriormente Wendt y Heimpel establecieron una clasificación basada en las características morfológicas en la médula ósea, que aún sigue vigente. Sin embargo, la identificación de las alteraciones genéticas en cada una de estas entidades ha permitido una mejor caracterización de cada una de ellas (tabla 2) [44].

La diseritropoyesis es un fenómeno común observado en varias condiciones tanto congénitas como adquiridas, lo que puede dificultar el diagnóstico de las ADC. De hecho, en la actualidad, el diagnóstico de una ADC requiere de valoración por microscopía electrónica para una mejor valoración de los defectos a nivel del núcleo celular [43], lo que dificulta aún más un correcto diagnóstico por su escasa disponibilidad en centros asistenciales.

Además, en muchas familias hay solo un individuo afecto, lo que enmascara el patrón hereditario. De hecho, la herencia recesiva, mutaciones *de novo* y alelos de baja expresión son difíciles de distinguir sin evaluación molecular [45].

Tabla 2. Alteraciones genéticas en los diferentes tipos de ADC.

Tipo ADC	I	II	III Familiar	III Esporádica	Variantes
Herencia	AR	AR	AD	Variable	AD ligada al cromosoma X AR
Casos reportados	>300	>450	2 familias	<20	~70
Gen mutado	CDAN1 C15ORF41	SEC23B	KIF23	desconocido	KLF1 GATA-1 desconocido
Morfología en médula ósea	Estructura cromatínica anormal, puentes internucleares	Eritroblastos maduros binucleados o multinucleados	Eritroblastos multinucleados gigantes	Eritroblastos multinucleados gigantes	Similar a ADC-I, ADC-II, otros

Adaptado de Iolascon A. et al. Blood. 2013;122(13):2162-2166.

- ADC tipo I:

Suele manifestarse en la primera década de la vida con anemia moderada, asociada a ictericia intermitente, esplenomegalia y posible hepatomegalia. En la edad adulta se observa colelitiasis y desarrollo de sobrecarga férrica y ocasionalmente puede ser necesaria la transfusión sanguínea [46].

El patrón de herencia de la ADC tipo I es autosómico recesivo. El gen responsable es el *CDAN1* que codifica a la proteína Codanina-1. Esta proteína está localizada en la heterocromatina durante la interfase y su cantidad aumenta durante la fase S. No se ha observado mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuestas en mutaciones graves (ej: codón stop prematuro), lo que sugiere el carácter letal de dichas combinaciones. Recientemente, estudios de secuenciación del genoma han permitido identificar en un paciente de una familia pakistaní afecta de ADC tipo I un nuevo gen causante de la enfermedad: *C15ORF41*. Se ha reportado que la proteína codificada por este gen interactúa con Asf1, una histona-chaperona que participa en el ensamblaje del nucleosoma [44-45].

- ADC tipo II:

La anemia diseritropoyética congénita de tipo II es la forma más frecuente de ADC. La prevalencia de ADC tipo II varía ampliamente entre regiones europeas, con valores mínimos de 0,04 casos/1 millón habitantes en Escandinavia y 2,49 casos/1 millón habitantes en Italia. Los hallazgos principales son anemia, ictericia y esplenomegalia y las complicaciones más comunes son sobrecarga férrica y litiasis biliar [43].

La ADC de tipo II puede confundirse con la Esferocitosis Hereditaria. El indicador más útil para el diagnóstico de la ADC tipo II es la respuesta reticulocitaria inadecuada para el grado de anemia [44].

El gen *SEC23B*, involucrado en la patogénesis de la ADC tipo II, codifica a la proteína SEC23B que es un componente del complejo proteico citoplasmático COPII, que interviene en la vía secretoria de las células eucariotas. Este complejo de múltiples sub-unidades media la acumulación de la carga secretoria, deformación de la membrana y el transporte anterogrado desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi [45].

La mayoría de las ADC tipo II son causadas por mutaciones con sentido erróneo (52%), mientras que el 20% se deben a mutaciones sin sentido, 13% intrónicas y 13% a pequeñas inserciones o deleciones. El patrón de herencia es típicamente autosómico recesivo, sin embargo en 13% de los casos se ha observado una única mutación en *SEC23B*, lo que sugiere la presencia de un segundo evento mutacional no identificado, probablemente en una región regulatoria no codificante. Las mutaciones con sentido erróneo en doble heterocigosis y las mutaciones sin sentido tienden a producir cuadros clínicos más graves [44-45].

- ADC Tipo III:

La ADC tipo III es una entidad extremadamente rara. Puede estar asociada a estrías angioides, gammapatías y mieloma múltiple. El tipo de referencia es una condición transmitida de forma dominante, reportada en una familia Sueca en la cual se identificó una mutación en el gen *KIF23* (c.2747C.G; p.P916R). *KIF23* codifica una molécula de la superfamilia de las kinesinas: MKLP1 (mitotic kinesin-like protein 1), que es una proteína mitótica esencial para la citocinesis. MKLP1 interactúa con Arf6 (adenosine 5'-diphosphate-ribosylation factor 6) formando un complejo

que interactúa con la superficie de la membrana en el surco de segmentación [43-46].

2.2. ADC Variantes:

- ADC asociadas a mutaciones en GATA1:

Mutaciones específicas en el gen *GATA1*, que codifica al factor de transcripción GATA-1 producen anemia diseritropoyética y otras manifestaciones. GATA-1 desempeña un rol integral en el desarrollo de las líneas megacariocítica y eritroide. Con la ayuda de su cofactor FOG-1 (Friend of GATA-1), coordina la diferenciación de la célula madre hematopoyética pluripotencial activando formas maduras linaje-específicas y reprimiendo genes asociados con estados indiferenciados. Todas las mutaciones identificadas en *GATA1* afectan la interacción GATA-1:FOG-1. Otras mutaciones en *GATA1* no producen diseritropoyesis pero generan un síndrome de macro-trombocitopenia ligada al X, otras pueden causar un síndrome de plaqueta gris ligado al X, porfiria congénita entre otras [43-46].

- ADC asociadas a mutaciones en KLF1:

KLF1 es un factor de transcripción eritroide involucrado en la promoción de la eritropoyesis y la atenuación de la diferenciación megacariocítica. Adicionalmente, toma parte en la regulación del cambio de síntesis de Hb fetal a Hb adulta. También KLF1 es necesaria para la regulación del ciclo celular durante la maduración eritroide. Las mutaciones identificadas en el gen *KLF1* se han relacionado con alteraciones morfológicas en el núcleo del eritroblasto, expresión incrementada de la hemoglobina fetal y reducción en la expresión de CD44 [43-46].

3. AHC Extrínsecas.

Entre ellas se incluyen las anemias secundarias a microangiopatías trombóticas. El término microangiopatía trombótica (MAT) se designa a aquellas enfermedades en las cuales ocurre la diseminación de microtrombos compuestos por plaquetas aglutinadas que ocluyen las arteriolas y capilares. La Púrpura Trombótica Trombocitopénica (PTT) y el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) son las dos enfermedades principales asociadas con MAT y se caracterizan por anemia hemolítica, trombocitopenia severa y daño orgánico [47] (Figura 6). Por la gravedad del cuadro y por la importancia que tiene iniciar un pronto tratamiento, la rápida identificación de factores genéticos asociados en esta patología es de vital importancia.

3.1. Púrpura Trombótica Trombocitopénica.

La PTT puede ser congénita como resultado de mutaciones en ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats), que codifica a una proteasa que corta los multímeros de Factor von Willebrand, o adquirida por desarrollo de autoanticuerpos dirigidos contra la proteína ADAMTS13 [48].

La PTT congénita, también conocida como Síndrome de Upshaw-Schulman, se presenta habitualmente entre el período neonatal y los 5 años en contraste con los casos de PTT idiopática, que presenta un pico de incidencia entre los 30 – 50 años [48,49]. El patrón de herencia es autosómico recesivo y su incidencia estimada es de 2 casos por 1.000.000 personas por año. Los niños con PTT congénita usualmente presentan trombocitopenia, anemia hemolítica e hiperbilirrubinemia no conjugada [49,50].

3.2. Síndrome Hemolítico Urémico.

El SHU es causado principalmente por la toxina Shiga, producida por la infección de *E. coli*. Afecta principalmente al riñón causando fallo renal y se asocia con diarrea. El SHU atípico (SHUa) está asociado con mutaciones o polimorfismos que disminuyen la actividad de las proteínas reguladoras del sistema del complemento [47,51].

El SHUa se considera una enfermedad ultra-rara. Existen muy pocos datos acerca de su incidencia y prevalencia, siendo limitados los conocimientos de la epidemiología real de la enfermedad. El SHUa afecta mayoritariamente a niños y adultos jóvenes, aunque puede aparecer en cualquier edad de la vida. El cuadro se caracteriza por la tríada de anemia hemolítica microangiopática no inmune, trombocitopenia y fracaso renal agudo. Aunque las lesiones en el SHUa afectan predominantemente a los vasos renales, el carácter difuso del fenómeno de microangiopatía trombótica conduce a la afectación de la microvasculatura de otros órganos (cerebro, corazón, intestinos, páncreas y pulmones), lo que explica la aparición frecuente de síntomas extrarrenales. La variabilidad de la sintomatología dificulta el diagnóstico diferencial con otras causas de MAT [51].

Estudios diversos han establecido que un 40-60 % de los pacientes con SHUa son portadores de mutaciones en genes del complemento (gen del factor H del complemento [CFH], gen de la proteína cofactor de membrana [MCP/CD46], gen del factor I del complemento [CFI], gen de la trombomodulina [THBD], gen del factor B del complemento [CFB] y gen del C3 [C3]) que se relacionan con la desregulación de la vía alternativa [52,53]. Además se ha descrito que la presencia de diferentes polimorfismos en los genes *CFH*, *CFHR1* y *CFHR3*, pueden ser factores de riesgo para desarrollar un SHUa [54]. Por otra parte, mutaciones recesivas en el gen *DGKE* también se han reportado como causa del SHUa [55].

Tomando en cuenta esta gran heterogeneidad alélica en la patogenia de las MAT es conveniente el estudio paralelo de todos los genes implicados en ésta patología en un mismo procedimiento analítico, por lo que la aplicación de la NGS en éste aspecto supondría una mejora en el proceso diagnóstico de éstas enfermedades.

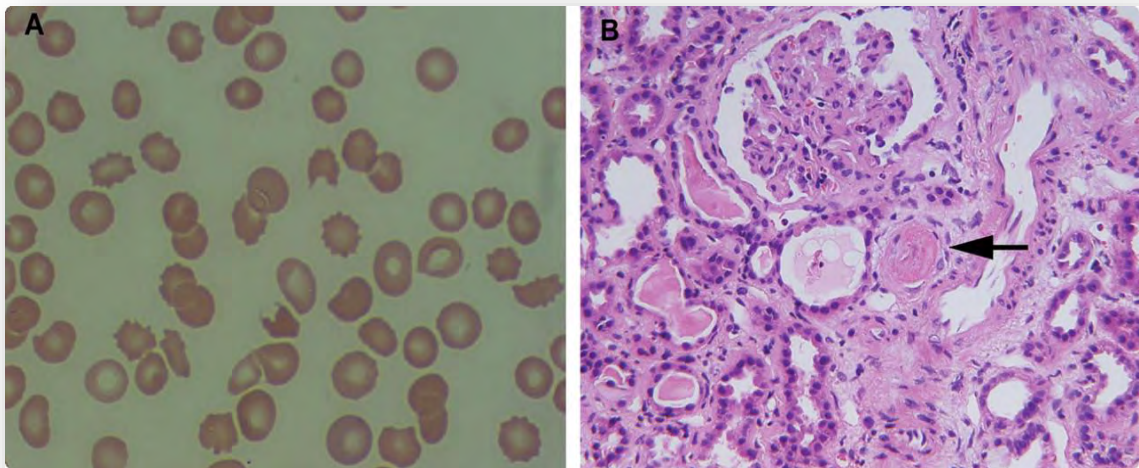


Figura 6. A. Frotis de sangre periférica donde se observan múltiples esquistocitos. B. Corte histológico renal. La flecha señala la oclusión vascular en la microcirculación. Adaptado de Munoz et al. *Blood* 2012 119:5620; doi:10.1182.

- APLICACIONES DE LA NEXT GENERATION SEQUENCING EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO.

Hasta hace pocos años el estudio molecular de las AHC ha sido realizado, típicamente secuenciando gen a gen por la metodología ideada por Sanger [56] y con una capacidad de lectura entre 400-800 pares de bases por carrera. Aunque éste método proporciona la resolución para detectar variantes genéticas de pequeño tamaño, propicia que la ejecución de experimentos basados en esta técnica se prolongue mucho tiempo y que el coste sea elevado.

Los avances tecnológicos de los últimos años han conducido al desarrollo de la secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS), logrando que se puedan secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela con un coste razonable, con la capacidad de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones) [57]. Las diferentes plataformas de NGS comercializadas (Roche, Illumina, Life Technologies) difieren entre sí según la química de secuenciación utilizada, sin embargo todas siguen una misma estrategia técnica: la miniaturización de las reacciones químicas para superar la escalabilidad limitada de la secuenciación Sanger [58].

En la actualidad existen diferentes aplicaciones de la NGS que permiten la identificación de alteraciones moleculares causantes de enfermedades. Entre ellas se incluyen la secuenciación del genoma completo del individuo, o de los exones de cada uno los genes codificantes (exoma) y secuenciación dirigida a genes candidatos [57].

1. Secuenciación del genoma completo (Whole Genome Sequencing, WGS).

La secuenciación del genoma completo puede ser utilizada para determinar la secuencia completa de nucleótidos de una muestra entera de ADN, incluyendo todas las regiones codificantes y no codificantes. A través de esta tecnología los investigadores pueden obtener una visión exhaustiva de la información genética de un individuo y asociarlas a sus implicaciones biológicas [57].

La mayor ventaja de esta estrategia es que se dispone de toda la información genómica con la única limitación del tiempo requerido para la preparación de la muestra. Sin embargo, la principal desventaja es que al proveer una gran cantidad de información hace que la manipulación de los datos sea laboriosa y la interpretación de los mismos muy compleja, sobre todo por la detección de numerosas variantes de significado incierto o mutaciones patológicas no relacionadas con la enfermedad que haya motivado el estudio [59].

2. Secuenciación del exoma completo (Whole Exome Sequencing, WES).

En contraste con el WGS, el cual básicamente analiza cada nucleótido del genoma, la secuenciación del exoma está dirigida al análisis de la porción codificante de todo el genoma humano. Esto permite el análisis simultáneo de las regiones codificantes de los genes cuya alteración condiciona una enfermedad así como aquellos que sean potencialmente patogénicos. Debido a que estos estudios están más centrados a regiones codificantes, la cantidad de datos a ser analizados es menor que en la secuenciación del genoma, sin embargo sigue siendo compleja [59-60].

Para llevar a cabo un WES, es necesario que todos los exones del genoma sean enriquecidos mediante diferentes metodologías (microarrays en fase sólida, PCR multiplexada o hibridación en fase soluble). No obstante, existen ciertas dificultades ya que en muchos casos existen regiones del exoma que no quedan incluidas en los métodos de enriquecimiento, ya sea por diseño del fabricante o por problemas en la amplificación por ser regiones con secuencias ricas en GC (Guanina-Citosina), dando origen a zonas de baja cobertura. Esta representación incompleta permite que mutaciones que pueden ser clínicamente relevantes no sean identificadas, lo que supone un punto débil de esta estrategia para su uso rutinario en el diagnóstico clínico [60].

Al igual que en el WGS, pueden encontrarse numerosas mutaciones patológicas o potencialmente patogénicas no relacionadas con la enfermedad en estudio, que añaden consideraciones éticas que deben ser tomadas en cuenta al momento de aplicar estas estrategias diagnósticas.

3. Secuenciación dirigida a genes candidatos.

Es una estrategia que actualmente está siendo propuesta para el diagnóstico genético de diferentes enfermedades. Mediante esta metodología solamente se enriquecen las regiones codificantes de los genes de interés para una enfermedad específica o categoría diagnóstica. La secuenciación dirigida a paneles de genes candidatos puede ser aplicada para el estudio de enfermedades monogénicas hereditarias así como también en la caracterización molecular de los tumores [61].

Existen varias ventajas del uso de los paneles de genes: 1) el enriquecimiento delimitado a las regiones de interés y la posterior secuenciación provee una calidad de representación superior y una

mayor profundidad de lecturas en comparación con el WGS y WES, que según la plataforma utilizada permitirá el estudio en paralelo de un gran número de pacientes en un tiempo relativamente corto, 2) Como el estudio se limita a un grupo de genes, el manejo de los datos y la interpretación de las variantes encontradas es mucho más accesible, 3) Con el uso de paneles de genes se reduce la posibilidad de encontrar alteraciones genéticas no relacionadas con la patología en estudio, lo que facilita a pacientes y familiares la decisión de utilizar esta herramienta de diagnóstico [59-61].

En la actualidad son muchos los paneles de genes que se han implementado en el diagnóstico clínico en diferentes patologías. Uno de los primeros en implementar su uso en la práctica clínica fue Lemke y col. (2012), quien empleó un panel de 265 genes para el diagnóstico genético de desórdenes epilépticos, logrando identificar mutaciones patogénicas en 16 de 33 pacientes [62]. De igual manera, Sikkema-Raddatz y colaboradores (2013), desarrollaron un panel de genes para el estudio de miocardiopatías hereditarias que incluía 48 genes, con el cual estudiaron a 84 individuos con mutaciones ya conocidas, demostrando una sensibilidad del procedimiento del 100% [63]. Otros paneles de genes han sido desarrollados para el estudio de sordera hereditaria [64], fibrosis quística [65], fenilcetonuria y otros trastornos congénitos del metabolismo [66], entre otras.

En el campo de la eritropatología también se han observado avances en el empleo de la NGS para mejorar el diagnóstico, pero quizás no con tanta rapidez como en otras áreas de la medicina. Ameziane (2012) empleó la secuenciación dirigida a 8 genes (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCE*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCN*) causantes de Anemia de Fanconi (AF), demostrando su utilidad diagnóstica en un subgrupo de pacientes con AF no clasificable [67].

Posteriormente Gerrard (2013) enfocaba su estudio en el diagnóstico de la Anemia de Blackfan-Diamond (ABD) las cuales se originan por defectos en los genes que codifican las proteínas ribosomales. El 50-60% de los casos presentan mutaciones en 13 de los 80 genes que codifican dichas proteínas, lo que supone que el estudio molecular mediante secuenciación Sanger sea prácticamente inviable. Mediante el uso de un panel que incluía los 80 genes codificantes de las proteínas ribosomales, logró identificar mutaciones patogénicas en el 88% de la población estudiada diagnosticada de ABD [68].

A pesar de la progresiva incorporación de la NGS en el estudio de las eritropatías, hasta la fecha en que iniciamos nuestro estudio no se han observado avances en el campo de las AHC, por lo que consideramos que el estudio de un panel de genes involucrados en la patogénesis de éste tipo de anemias sería de gran utilidad en la mejora del diagnóstico en estos pacientes. Esto supondrá un avance no solo en el diagnóstico sino en la prevención de nuevos casos, ya que facilitará la identificación de portadores en los progenitores, lo que conllevaría a un mejor control de la morbi-mortalidad en estos pacientes que suponen un alto impacto al sistema sanitario.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

El diagnóstico preciso de las AHC requiere no sólo de la evaluación de expertos clínicos, sino también de diferentes estudios funcionales y bioquímicos eritrocitarios que deben ser realizados en laboratorios especializados.

Con los métodos disponibles en la actualidad no es posible alcanzar un diagnóstico definitivo en un grupo importante de pacientes. Esto puede ser debido a condiciones propias del enfermo (ej.: crisis hemolítica reciente, necesidad transfusional) o por condiciones relativas al procesamiento y conservación de las muestras. Estas circunstancias no afectan el estudio genético, por lo que éste se convierte en la única alternativa viable para la identificación de la etiología.

Recientemente se ha demostrado la eficacia de la utilización de paneles de genes en diferentes patologías para la detección de mutaciones con significado clínico mediante NGS. Sin embargo este campo ha sido muy poco explorado en el área de las AHC.

Por lo tanto, consideramos de gran interés en la clínica de las AHC desarrollar un panel de genes que mejore el diagnóstico y prevención de ésta patología.

OBJETIVOS:

El objetivo principal de este estudio fue mejorar el diagnóstico de las de las AHC mediante la detección de mutaciones patogénicas utilizando secuenciación dirigida a un panel de genes candidatos por NGS.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar un panel de genes involucrados en la patogénesis de AHC para su implementación en el diagnóstico molecular mediante NGS.
2. Valorar la utilidad clínica del panel de genes diseñado en el diagnóstico molecular de las AHC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño del panel de genes.

1.1. Selección de genes candidatos.

Para seleccionar los genes que se incluyeron en el panel se realizó una búsqueda informatizada para identificar las publicaciones que estudiaban las variantes genéticas como etiopatogenia de las Anemias Hemolíticas Congénitas. Para ello se utilizó la base de datos PUBMED (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

Con el fin de identificar todos los estudios realizados hasta el momento, se fijaron los siguientes criterios de búsqueda:

- “hemolytic anemia” AND “RBC membrane”
- “hemolytic anemia” AND “RBC enzyme”
- “hemolytic anemia” AND “HBB”
- “Congenital Dyserythropoietic Anemia” AND “diagnosis”
- “Thrombotic Microangiopathy” AND “diagnosis”

En la búsqueda se incluyeron todos los registros publicados hasta el 15 de Enero del 2014.

Dado que se conocen la mayoría de los genes causantes de las AHC y que existe una amplia disponibilidad de literatura sobre el tema, decidimos restringir los parámetros de la búsqueda con la finalidad de obtener un número adecuado de artículos para ser sometidos a evaluación.

Para ello se establecieron unos criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta fueron:

- Artículos de investigación
- Artículos de revisión

- Meta-análisis
- Guías clínicas

Una vez obtenido el resultado de la búsqueda, se aplicaron los siguientes criterios de exclusión para depurarlo. Los criterios de exclusión se aplicaron en el siguiente orden:

- Estudios experimentales.
- Artículos duplicados.
- Referidos a otra patología: Artículos que estudiaban otras enfermedades.
- No información sobre el diagnóstico molecular.
- Estudio no en humanos: Estudios realizados en otro tipo de organismos.
- No disponible en idioma inglés.
- Ensayos clínicos.

La primera fase de selección se basó en la lectura del resumen de las publicaciones. Posteriormente los artículos seleccionados y aquellos que no disponían de resumen fueron leídos en su totalidad.

1.2. Delimitación de regiones de interés a secuenciar.

Mediante la utilización de herramientas informáticas: Ion Torrent-Life Technologies (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com/welcome>, www.ampliseq.com), se seleccionaron las regiones codificantes, zonas de splicing, regiones no trasladadas (UTR) 5´ y 3´ y regiones promotoras de todos los genes incluidos. Además se incluyeron un 20% de amplicones adicionales en diferentes regiones del genoma (no solapante con los genes incluidos en el panel), con el fin de tener controles internos de normalización de los datos en la búsqueda de CNVs. El diseño de los experimentos para detectar mutaciones puntuales y CNVs utiliza un

algoritmo matemático que obliga a realizar los experimentos con una cobertura mínima de cada amplicón igual a 20X.

El diseño de los primers para la creación de la librería se realizó mediante el software Ampliseq Designer, el cual proporciona una estimación de cobertura de las regiones a secuenciar.

En las áreas del genoma con baja cobertura se aumentó el número de amplicones para garantizar que fuera secuenciada toda la región de interés.

2. Proceso de valoración de la utilidad clínica en el diagnóstico molecular de las Anemias Hemolíticas Congénitas.

2.1. Población de estudio.

La población de estudio incluyó un total de 65 individuos: 3 controles sanos, 16 pacientes diagnosticados de Anemia Hemolítica Congénita en los cuales ya se había identificado la mutación patogénica causante de la enfermedad y 46 sin diagnóstico molecular.

Estas muestras fueron obtenidas de colecciones de pacientes del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Cruces y Servicio de Hematología del Centro Hospitalar de Coímbra (Portugal). Todos los casos fueron diagnosticados por expertos Hematólogos Clínicos de ambos servicios. Se obtuvo el consentimiento informado del paciente o su representante, exceptuando aquellos pacientes de los cuales se había obtenido muestra previo al año 2007, fecha en que entró en vigor la Ley 14/2007 que regula los procedimientos de Investigación en Biomedicina.

Las muestras de estos pacientes fueron incorporadas como colección de muestras al Biobanco Vasco de manera anonimizada con

la aprobación del Comité Ético de Investigaciones Científicas de Euskadi (INC14-13/INC14-12).

Los datos clínicos disponibles fueron el diagnóstico y la mutación hallada anteriormente mediante técnicas convencionales.

2.2. Procesamiento de las muestras.

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre periférica (Ver protocolo de procesamiento de las muestras).

Todas la muestras de ADN se registraron correctamente y fueron almacenadas a -20°C.

Se cuantificó el ADN de cada paciente mediante espectrofotometría usando un NanoDrop® y fluorimetría utilizando un equipo Qbit®. Su calidad en cuanto a integridad se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa y en cuanto a pureza con el NanoDrop®.

Protocolo de procesamiento de las muestras.

Extracción de ADN a partir de sangre periférica:

Se siguió el método de Fenol-Cloroformo estándar [69]

1. Añadir 250µl de SP en un tubo de 1,5ml.
2. Añadir 500µl de buffer de Lisis (Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 0,1M, SDS 2%, DTT 40mM y Proteinasa K 0,2mg/ml) e incubar en baño termostático con agitación a 37°C toda la noche ó a 56°C durante 2-3 horas.
3. Añadir 200µl de fenol-cloroformo-isoamiloalcohol en proporción 25:24:1. Homogeneizar invirtiendo suavemente los tubos.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm. Con ayuda de una pipeta, recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
5. Precipitar el ADN añadiendo acetato sódico 2M en proporción 1/10, 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Homogeneizar invirtiendo suavemente los tubos.
6. Centrifugar durante 20 minutos a 13000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
7. Lavar el pellet de ADN con 1 ml de etanol al 80% frío.
8. Centrifugar de nuevo durante 5 minutos a 13000 rpm.
9. Secar el pellet de ADN al aire y resuspender en 40 µl de H₂O bd estéril.
10. Almacenar a – 20°C.

El ADN se conservó a una concentración de 50ng/ml para la secuenciación.

2.3. Análisis de robustez de la prueba.

Para valorar la robustez de la prueba se aplicaron las fórmulas para el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo tomando en cuenta las muestras analizadas en la fase de validación de la técnica.

- **Sensibilidad (s):** es la capacidad que tiene una prueba diagnóstica para detectar los que tienen la condición buscada en una población (verdaderos positivos).

$$s: \frac{\text{Pacientes con mutación confirmado por NGS}}{\text{Pac. con mutación confirmada y no confirmados por NGS}} \times 100$$

- **Especificidad (e):** la capacidad que tiene una prueba para detectar los que no tienen la condición buscada en una población (verdaderos negativos).

$$e: \frac{\text{Pacientes sin mutación y no hallazgo por NGS}}{\text{Pacientes sin mutación con y sin hallazgo por NGS}} \times 100$$

- **Valor predictivo positivo (VPP):** es la probabilidad cuando la prueba es positiva, que corresponda a un verdadero positivo.

$$VPP: \frac{\text{Pacientes con mutación y confirmado por NGS}}{\text{Pacientes con y sin mutación y hallazgo por NGS}} \times 100$$

- **Valor predictivo negativo (VPN):** es la probabilidad cuando la prueba es negativa, que corresponda a un verdadero negativo.

$$VPN: \frac{\text{Pacientes sin mutación y no hallazgo por NGS}}{\text{Pacientes sin mutación con y sin hallazgo por NGS}} \times 100$$

2.4. Detección de mutaciones patogénicas mediante secuenciación masiva.

Por cada muestra analizada se generó una librería con amplicones de 200 pb, utilizando el kit Ampliseq Library™ (Figura 7), siguiendo las instrucciones del fabricante (Ver protocolos para la creación de librerías).

La verificación de tamaño de ésta se realizó mediante la utilización del Byoanalyzer (Agilent High Sensitivity DNA Kit™) y se cuantificó mediante Q-PCR utilizando el kit de cuantificación específico para librerías Ion Torrent Ion Library Quantitation kit™.

Una vez generada la librería se llevó a cabo el enriquecimiento del “DNA template” en unas esferas (Ion Sphere Particles™) mediante amplificación clonal realizando una PCR en emulsión utilizando la plataforma Ion Torrent OneTouch-2™ (Figura 8). Para comprobar el rendimiento de este último paso fué necesario cuantificar el DNA previo al paso de enriquecimiento y después de este mediante el uso del fluorímetro Qubit® y el kit específico para este fin (Ion Sphere Quality Control kit™).

Una vez que se tenía la muestra preparada se cargaba en un chip semiconductor de formato 316 (300 Mb–1.0 Gb) y se procedía a la secuenciación en un Ion Torrent Personal Genome Machine - Ion PGM™ (Figura 9).

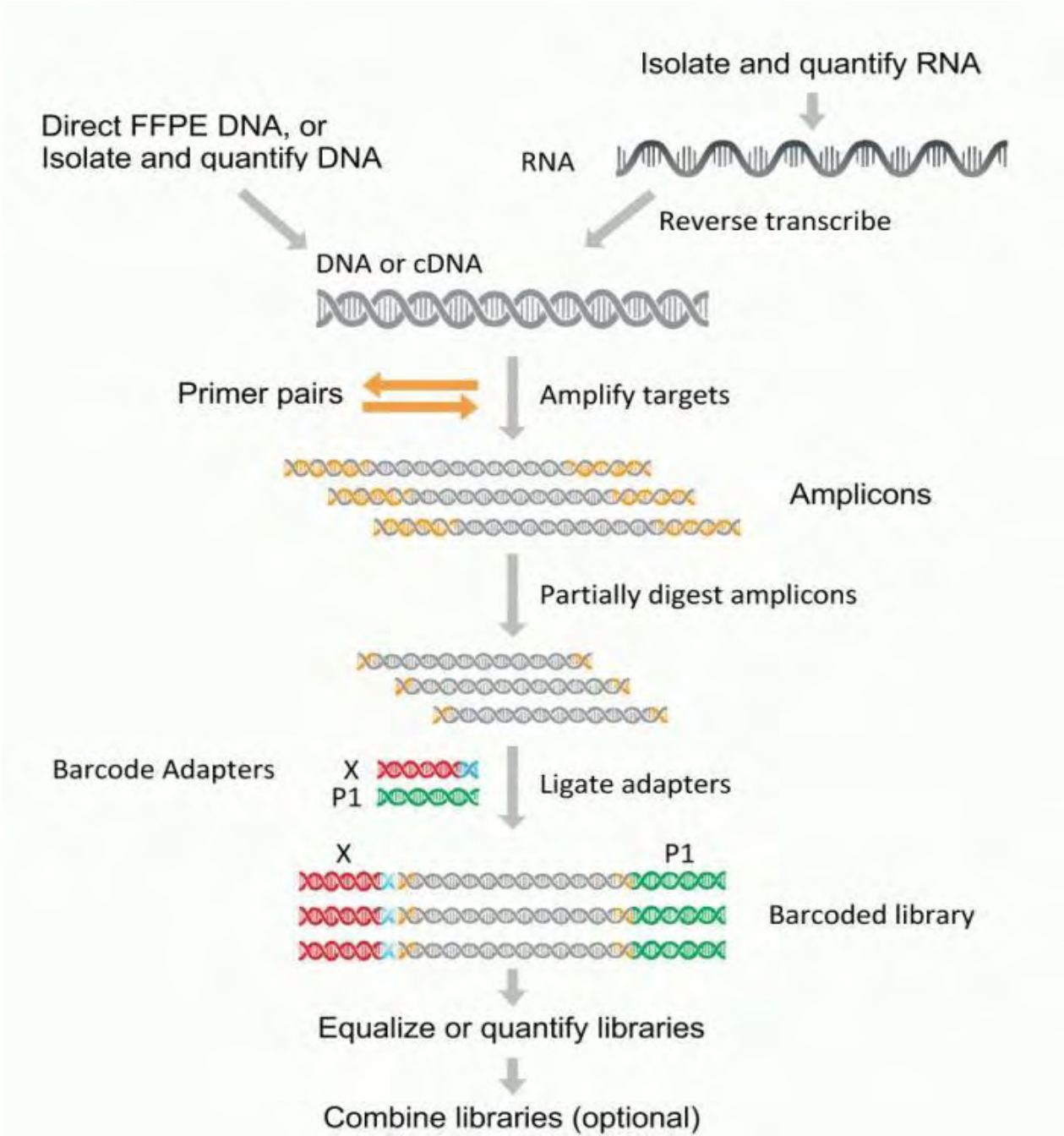


Figura 7. Diagrama de trabajo para la creación de la librería mediante la utilización del Amplicon Library Kit 2.0.

Protocolos para la generación de librerías.

Protocolo de PCR multiplexada para la amplificación de las regiones de interés.

Reactivo del stock	Concentración final	Volumen de la muestra (μL)
Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	5X	5
Ion AmpliSeq™ Primer Pool (1 ó 2)	2X	10
ADN	15 ng	
Agua estéril libre de nucleasas	-	
Volumen final	-	20

Condiciones del termociclador para PCR multiplexada.

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Activación de la Polimerasa	99° C	2 minutos	
Desnaturalización del ADN	99° C	15 segundos	15
Anillamiento y extensión	60° C	4 minutos	

Una vez finalizada la reacción de PCR se procedía a la digestión de los primers, mediante el siguiente protocolo:

- Añadir 2 μL del reactivo *FuPa* a cada muestra amplificada (volumen total 22 μL).
- Aplicar vortex y centrifugar.
- Cargar en el termociclador y programar 10 minutos a 50° C, 10 minutos a 55° C y 20 minutos a 60° C.

Posteriormente se procedía a la ligación de los adaptadores, mediante el siguiente protocolo:

- Añadir 4 μL del reactivo *Switch Solution*.
- Añadir 2 μL del reactivo *Ion Xpress™ barcode adapter mix*.

- Añadir 2 μL del reactivo *DNA Ligase* (volumen total de la muestra 30 μL).
- Cargar en el termociclador y programar 30 minutos a 22° C, 5 minutos a 68° C y 5 minutos a 72° C.

Finalizada la ligación de adaptadores se realizaba la purificación de la librería, mediante el siguiente esquema:

- Añadir 45 μL del reactivo *Angecourt AMPure™* a cada muestra, pipeteando arriba y abajo para mezclar adecuadamente la solución.
- Incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Colocar la placa o tubo sobre una placa magnética *DynaMag* e incubar 2 minutos o hasta que la solución aclarara.
- Retirar el sobrenadante.
- Añadir 150 μL de etanol al 70% recién preparado y mover la placa o tubo para lavar el pellet.
- Repetir el lavado.
- Retirar el etanol y dejar secar.
- Añadir 50 μL del reactivo *LowTE*, resuspender el pellet y fijar nuevamente sobre la placa magnética.
- Retirar el sobrenadante y almacenar.

Protocolo para la cuantificación de la librería mediante PCR cuantitativa, mediante el *Ion Library TaqMan® Quantitation Kit*).

- Preparar una dilución 1/100 de la librería para cuantificación.
- Preparar 3 diluciones seriadas 1/10 del reactivo *E. coli DH10B Ion Control Library*, e introducir los datos en el instrumento de qPCR.
- Preparar la mezcla de la reacción, utilizando los reactivos del Kit: 20 μ L de 2X *TaqMan® MasterMix* and 2 μ L de 20X *Ion TaqMan® Assay*, por cada muestra, y dispensar 11 μ L en cada pocillo de la placa.
- Añadir 9 μ L de la dilución de la librería.

Condiciones del instrumento qPCR para cuantificación de la librería (ABI 7900).

Paso	Temperatura	Tiempo
Incubación UDG	50° C	2 minutos
Activación de la polimerasa	95° C	2 minutos
Anillamiento y extensión (40 ciclos)	95° C	15 segundos
	60° C	1 minuto

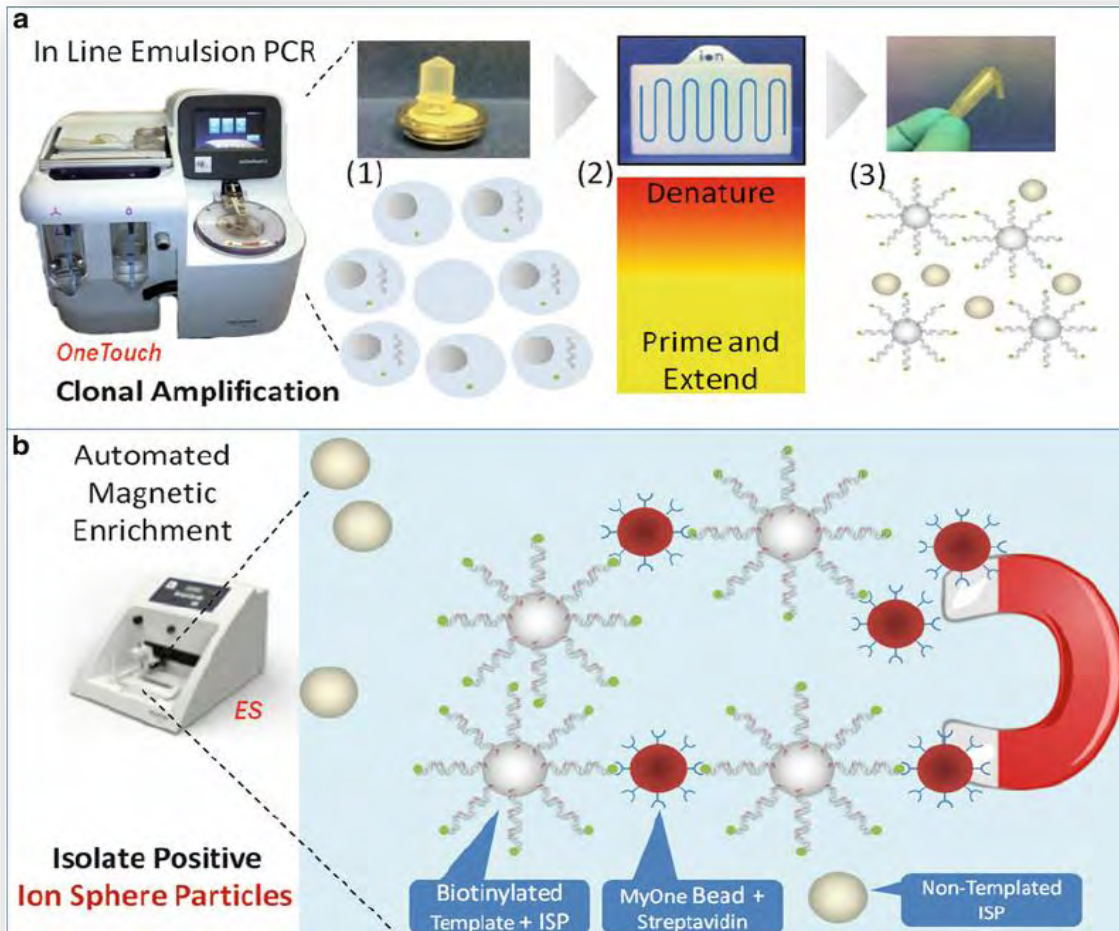


Figura 8. Representación esquemática del proceso de enriquecimiento de la librería mediante el uso del instrumento Ion OneTouch-2™. En la figura (a) se muestra la tecnología que permite la unión de los amplicones ("DNA template") a las esferas (Ion Sphere™ particles). La primera reacción (a-1) consiste en una amplificación clonal. La segunda (a-2) es una PCR en emulsión en línea llevada a cabo en unos micro-reactores. La tercera es una centrifuga integrada (a-3) que permite recuperar las esferas en las cuales ya se producido la amplificación del ("DNA Template"). Posteriormente mediante el uso del Ion Touch ES™ (b) se eliminan las esferas en las cuales no se logró una correcta amplificación del DNA Template mediante la PCR en emulsión.

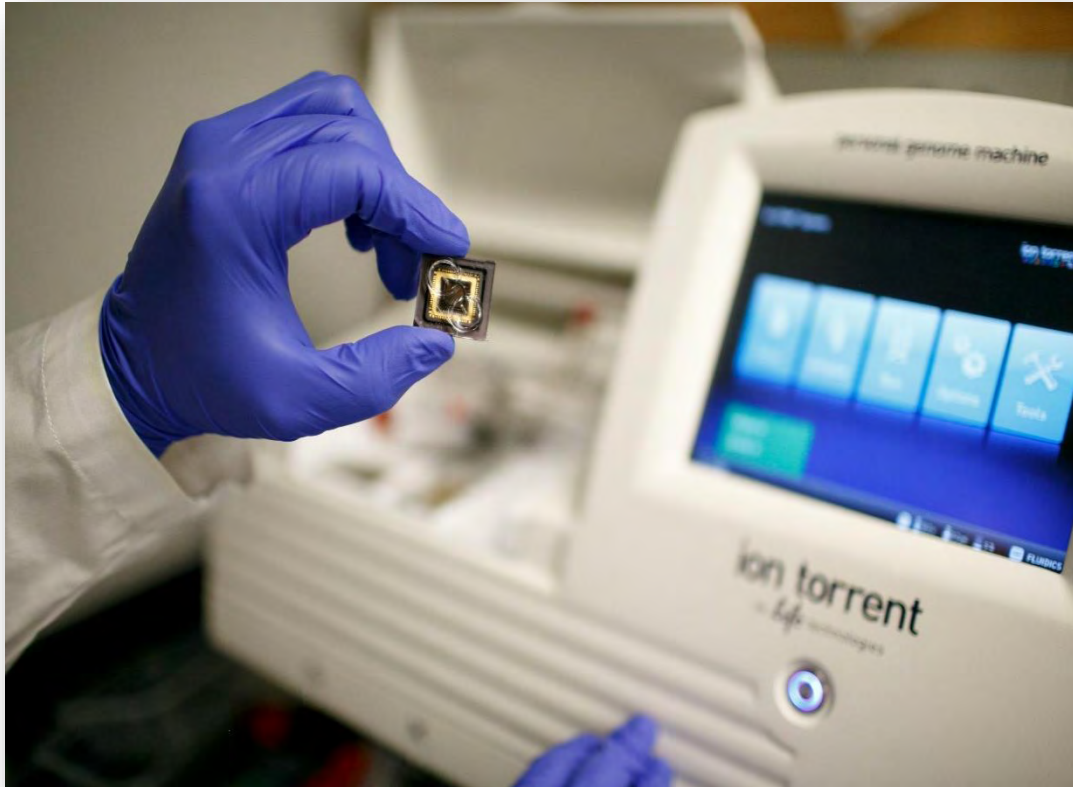


Figura 9. En la imagen se muestra un chip semiconductor que será cargado en el secuenciador Ion Torrent PGM™ para llevar a cabo la secuenciación de las librerías previamente enriquecidas en el sistema Ion OneTouch-2™.

2.5. Análisis de datos.

El análisis bioinformático se llevó a cabo mediante la utilización del Software Ion Reporter™, instrumento informático que permite el análisis de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y CNVs.

El software permite eliminar las variaciones comunes mediante la utilización de algoritmos que permite hacer un filtrado, reduciendo significativamente el número de variantes, integrando los resultados obtenidos en la secuenciación con las bases de datos que aportan información sobre las variantes comunes en la población, entre ellos la frecuencia alélica mínima (MAF, "*minor allele frequency*"), 1000 Genome Project y UCSC common variants.

En primer lugar, aplicamos un filtro para seleccionar los genes relacionados por cada grupo de AHC, por lo que creamos el filtro Hemoglobinopatías (que incluía el gen *HBB*), Membranopatías (que incluía los genes *SPTA1*, *SPTB*, *ANK1*, *EPB72*, *PIEZO1*, *GYPA*, *GYPC*, *SLC4A1*, *EPB41*, *EPB42*), Enzimopatías (*G6PD*, *HK1*, *GPI*, *AK1*, *GSS*, *PKLR*, *PGK*, *TP11*, *ALDOA*, *PFKFB1*, *BPGM*, *NT5C3A*), ADC (*CDAN1*, *SEC23B*, *GATA1*, *KLF1*) y MAT (*CFH*, *CFHR1*, *CFHR3*, *CFHR4*, *CFI*, *CFB*, *CD46*, *THBD*, *C3*, *DGKE*, *ADAMTS13*, *PIGA*, *PIGT*). En caso de que los datos clínicos dieran una orientación a cada una de los grupos de patologías a estudiar nos dirigíamos directamente al análisis del subgrupo de genes, en caso de no presentar una etiología identificada de la AHC se analizaban todos los genes. En segundo lugar excluíamos las variantes según la prevalencia en la población, para ello aplicando el filtro MAF (Minor Allele Frequency), separamos las variantes que se encontraban en más de un 20% de la población. Por último aquellas variantes que no presentaran una profundidad de lectura mínima de 20X también se excluían del análisis.

2.6. Análisis de secuencias.

Antes de realizar el alineamiento específico contra las secuencias de referencia de los genes incluidos en el panel, los resultados de la secuenciación fueron filtrados para detectar aquellas secuencias que pudieran haber tenido una calidad baja mediante la herramienta informática FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>), eliminando los *reads* y *trimming* de extremo 3' mediante un filtrado de calidad. Este programa permite la obtención de información acerca de la composición y calidad de la secuenciación. La calidad de los datos de secuenciación se mide utilizando la medida Phred Score, empleada rutinariamente en la metodología de secuenciación Sanger, e indica la fiabilidad de la base asignada en el proceso de secuenciación.

Los archivos de secuenciación filtrados se alinearon frente a la secuencia de referencia (GRCh37) usando programas de alineamiento masivo como BWA. Aquellos alineamientos que no superaron un umbral de calidad fueron eliminados de posteriores análisis. El alineamiento resultante se estudió con el fin de detectar posibles variantes génicas, para ello se empleó el software Samtools y Annovar para la anotación de variantes.

Las variantes detectadas se enfrentaron a las bases de datos disponibles y se evaluó la relación de dicha variante con posibles cambios estructurales.

Para la interpretación del significado clínico de las mutaciones y las variantes estructurales encontradas, se consultaron diferentes bases de datos como son:

- HGMD (The Human Gene Mutation Database; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)
- Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)
- Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>).
- ExAC (Exome Aggregation Consortium; <http://exac.broadinstitute.org>)
- 1000 Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org>)
- dbSNP (The Database of Short Genetic Variations; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Además en aquellas nuevas variantes identificadas de sentido erróneo (missense) se realizó el análisis in silico de su patogenicidad mediante las herramientas informáticas:

- Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
- SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>).
- PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer; <http://provean.jcvi.org>)

En el caso de las mutaciones identificadas en regiones de splicing se utilizó el software BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

2.7. Validación de las variantes obtenidas por secuenciación masiva.

Cada nueva mutación encontrada, diferente a la esperada en las muestras analizadas, en los genes seleccionados, se validó mediante el método molecular más apropiado en cada caso:

- Secuenciación de fragmentos.

Mediante la secuenciación Sanger convencional se secuenciaron determinadas regiones del DNA en los genes que se encontró mutaciones

puntuales, lo cual nos ayudó a interpretar el significado de la mutación y su posible patogenicidad.

- MLPA o Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.

Se trata de una técnica molecular que permite realizar el screening de determinadas regiones del ADN mediante el análisis de un conjunto de sondas que hibridan simultáneamente en diferentes puntos de la región de interés. La diferencia entre las distintas sondas, es un fragmento de distinto tamaño que permite diferenciarlas mediante un análisis de fragmentos. Existen múltiples kits de MLPA cada uno de ellos con una aplicación específica.

- PCR cuantitativa a tiempo real.

Dado que no están disponibles sondas de MLPA para todas las posibles variaciones encontradas por NGS, incluimos dentro de las técnicas de validación de las CNVs la PCR cuantitativa de DNA. Para llevar a cabo esta tecnología fué necesario amplificar las regiones en las cuales se detectó una CNV y clonarlo en un vector que fué el plásmido de *E.coli*, pUC18, gracias a la gran estabilidad que presentan estas pequeñas moléculas de DNA, son fácilmente cuantificables. Una vez obtenido el plásmido con el inserto de interés se obtuvo una recta patrón con diferentes concentraciones del plásmido y por lo tanto diferente número de copias del inserto, de forma que se pudo extrapolar el valor del Ct de nuestras muestras de interés, obteniendo el número de copias presente en ellas. Para el análisis de los resultados utilizamos los dos métodos descritos en la bibliografía. Uno de ellos, el más rápido, se conoce como “método relativo” ya que el número de copias del amplicón objeto de estudio se determina relativizándolo con el número de copias conocido en la muestra control usando el método comparativo de Ct. El método DeltadeltaCt ($\Delta\Delta Ct$) usa la fórmula:

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{muestra}} - (Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{control}}$

El número de copias relativo es determinado mediante la fórmula:
 $2^{-(\Delta\Delta Ct \pm SD)}$

Por otro lado se encuentra el "método absoluto", el cual da el número absoluto de copias de la secuencia de DNA estudiada. Para llevar a cabo este análisis es necesario realizar la recta patrón con las diferentes concentraciones del plásmido que porta la región de interés y de la cual obtendremos el número de copias mediante el método adaptado de Weksberg (2005), derivado de la fórmula:

$$KCt_i = (\Delta Ct_R - Ct_{Ri}/SR) * ST_i + Ct_i$$

De donde:

KCt_i : Ct corregido del cebador del gen diana contra el cebador del gen de referencia.

ΔCt_R : Valor de Ct medio del gen de referencia para todas las muestras (muestras problema y de referencia)

Ct_{Ri} : Valor de Ct que toma el gen de referencia en cada placa de Q-PCR de cada gen analizado.

SR : Valor de la pendiente (en la recta patrón) del gen de referencia.

ST_i : Valor de la pendiente (en la recta patrón) del gen analizado en cada caso.

Ct_i : Valor del Ct que toma cada gen en cada muestra analizada.

El valor final de ΔKCt se obtiene a partir de la resta entre el valor medio de Ct obtenido de la muestra de referencia control en todos los genes analizados y el valor de KCt_i en cada muestra problema. Todos los valores de ΔKCt se analizaron a partir del valor relativo de KCt en el gen problema y del KCt en el gen de referencia en una muestra control. Este valor obtenido implicará la normalidad, es decir una condición diploide con dos copias del alelo. Una unidad más de ΔKCt implica una copia más y así sucesivamente para las ganancias. Para las deleciones, una

unidad por debajo, significa la pérdida de un alelo (en heterocigosis) y dos unidades por debajo, implicaría la pérdida en homocigosis de la secuencia estudiada.

RESULTADOS

RESULTADOS.

1. Diseño del panel.

1.1. Selección de genes:

La búsqueda bibliográfica en la base de datos PUBMED, permitió identificar 247 publicaciones.

Tras la revisión de los resúmenes de éstas publicaciones se descartaron 204 que no cumplían con los criterios de inclusión y que presentaban criterios de exclusión, quedando un total de 43 artículos de los cuales se realizó una lectura completa. En esta ocasión se excluyeron 8 artículos que se referían a terapéutica y que no aportaban información relevante sobre la etiopatogenia genética de la enfermedad (Figura 10).

De los 35 artículos elegidos se obtuvo la información correspondiente para la selección de los genes a incluir en el panel. Una vez hecha la revisión de los artículos se seleccionaron los siguientes 40 genes: (Tabla 3).

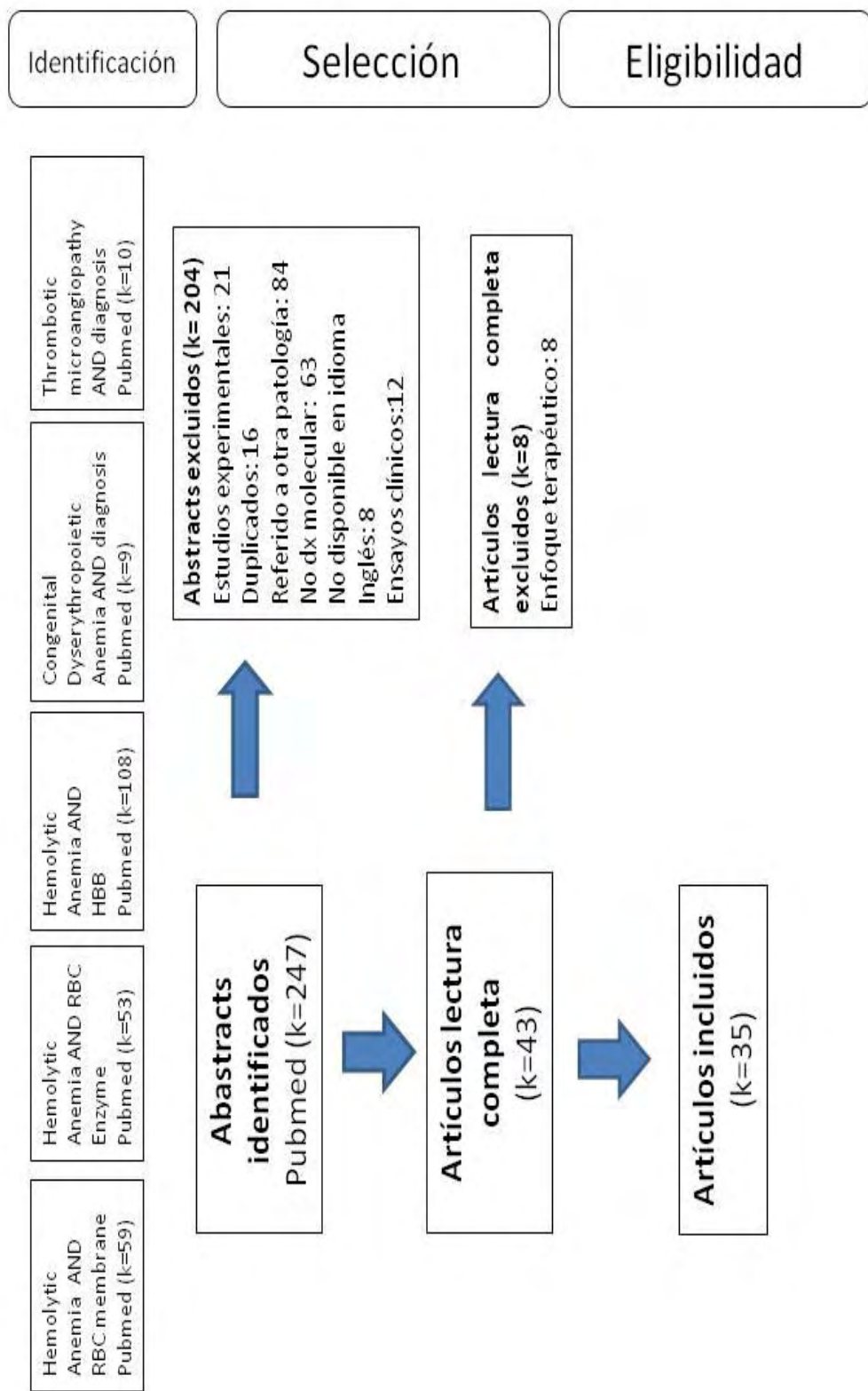


Figura 10. Diagrama de flujo en la búsqueda bibliográfica.

Tabla 3. Artículos revisados para la selección de los genes incluidos en el panel.

Gen	Enfermedad asociada	Ref.Bibliog.
CDAN1	Anemia Diseritropoyética congénita tipo I	Iolascon A. [43]
SEC23B	Anemia Diseritropoyética congénita tipo II	Iolascon A. [44]
KLF1, GATA1	Otras anemias diseritropoyéticas congénitas	Iolascon A. [45] Jaffray JA. [71] Punzo F. [72] Russo R. [73]
HBB	Hemoglobinopatías, Beta-talasemias	Cao A. [15] Thom CS. [17] Clarke. [70]
SPTA1, SPTB	Eliptocitosis, Esferocitosis, Piropoiquilocitosis hereditarias (Espectrina alfa y beta)	An X. [23] Delaunay J. [24]
ANK1	Esferocitosis hereditaria (Ankirina-1)	Da Costa L. [26]
EPB72, PIEZO1	Estomatocitosis hereditaria (Estomatina, Piezo 1)	Bolton-Maggs P. [28]
GYPA, GYPC	Eliptocitosis hereditaria (Glicoforina A y C)	Gallagher P. [31]
SLC4A1	Esferocitosis hereditaria (Banda-3)	Andolfo I. [32]
EPB41	Eliptocitosis hereditaria (Proteína 4.1)	Bruce LJ. [35]
EPB42	Esferocitosis hereditaria (Proteína 4.2)	Barcellini W. [74] King MJ. [75]
G6PD	Deficiencia de Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	Prchal JT. [37] Zanella A. [41]
HK1	Deficiencia de Hexokinasa	Mason PJ. [42]
GPI	Deficiencia de Glucosa-6-fosfato-isomerasa	Manco L. [77] Martinov MV. [78]
AK1	Deficiencia de Adenilato-kinasa	Orosz F. [79]
GSS	Deficiencia de Glutation-sintetasa	Spiegel R. [80]
PKLR	Deficiencia de Piruvato-Kinasa	
PGK1	Deficiencia de Fosfoglicerato-Kinasa	
TPI1	Deficiencia de Triosefosfato-isomerasa	
ALDOA	Deficiencia de Aldolasa.	
PFKFB1	Deficiencia de Fosfofructokinasa	
BPGM	Deficiencia de Bifosfoglicerato-mutasa	
NT5C3A	Deficiencia de Pirimidina 5'-nucleotidasa	
CFH, CFHR1, CFHR3, CFHR4, CFI, CFB, MCP (CD46), THBD, C3, DGKE	Microangiopatías trombóticas <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome Hemolítico Urémico Atípico - Púrpura Trombótica Trombocitopénica 	Lotta L. [49] Trachtman H. [50] Cataland SR. [51] Lemaire M. [55] Loirat C. [76] Krawitz PM. [81] Johnston JJ. [82] Kavanagh D. [83] Campistol JM. [85] Laurence J. [87]
ADAMTS13		
PIGA, PIGT		

1.2. Delimitación de regiones de interés a secuenciar.

Una vez aplicados los criterios de delimitación de las regiones de interés a estudiar utilizando el software Ampliseq designer™, se obtuvo un total de 988 pares de primers divididos en 2 pools, que permitirían amplificar el ADN para la creación de las librerías mediante una PCR multiplexada, con una cobertura global de 98,26%, lo que permitía secuenciar 263,5 Kilobases por cada muestra analizada (Tabla 4). En los anexos se detallan las regiones secuenciadas, número de bases por amplicón y porcentaje de cobertura.

Tabla 4. Coordinada genómica y cobertura de los genes incluidos en el panel.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Coordenada genómica (GRCh37)	Cobertura
<i>CDAN1</i>	Codanin 1	15:43015757-43029324	100%
<i>SEC23B</i>	Sec23 homolog B	20:18488137-18542059	100%
<i>KLF1</i>	Kruppel-like factor 1	19:12995237-12997995	99.88%
<i>GATA1</i>	GATA binding protein 1	X:48644962-48652716	92.33%
<i>HBB</i>	Hemoglobin, beta	11:5246694-5250625	100%
<i>SPTA1</i>	Spectrin, alpha, erythrocytic 1	1:158580496-158656488	100%
<i>SPTB</i>	Spectrin, beta, erythrocytic	14:65213002-65346601	98.78%
<i>ANK1</i>	Ankyrin 1, erythrocytic	8:41510739-41754280	96.71%
<i>EPB72</i>	Stomatin (EPB72)-like 1	9:124101355-124132531	99.15%
<i>PIEZO1</i>	Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1	16:88781751-88851619	96.96%
<i>GYPC</i>	Glycophorin C	2:127413509-127454246	99.34%
<i>GYPA</i>	Glycophorin A	4:145030457-145061904	100%
<i>SLC4A1</i>	Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1	17:42325753-42345509	96.57%
<i>EPB41</i>	Erythrocyte membrane protein band 4.1	1:29213603-29446553	94.11%
<i>EPB42</i>	Erythrocyte membrane protein band 4.2	15:43398423-43513481	100%
<i>G6PD</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	X:153759606-153775787	99.47%
<i>HK1</i>	Hexokinase 1	10:71029740-71161638	97%
<i>GPI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	19:34850385-34893061	100%
<i>AK1</i>	Adenylate kinase 1	9:130628759-130640022	83.73%
<i>GSS</i>	Glutathione synthetase	20:33516236-33543620	100%
<i>PKLR</i>	Pyruvate kinase, liver and RBC	1:155259630-155271225	97.41%
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	X:77320685-77384793	100%
<i>TP11</i>	Triosephosphate isomerase 1	12:6976283-6980112	100%
<i>ALDOA</i>	Aldolase A, fructose-bisphosphate	16:30064411-30081778	97.01%
<i>PFKFB1</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 1	X:54959394-55024967	100%
<i>BPGM</i>	2,3-bisphosphoglycerate mutase	7:134331560-134364565	100%
<i>NT5C3A</i>	5,-nucleotidase, cytosolic IIIA	7:33053742-33102409	100%
<i>CFH</i>	Complement factor H	1:196621008-196716634	100%
<i>CFHR1</i>	Complement factor H-related 1	1:196788887-196801319	100%
<i>CFHR3</i>	Complement factor H-related 3	1:196743925-196763203	100%
<i>CFHR4</i>	Complement factor H-related 4	1:196819371-196888102	100%
<i>CFI</i>	Complement factor I	4:110661852-110723335	100%
<i>CFB</i>	Complement factor B	6:31895475-31919861	100%
<i>CD46 (MCP)</i>	CD46 molecule, complement regulatory protein	1:207925402-207968858	100%
<i>THBD</i>	Thrombomodulin	20:23026270-23030378	100%
<i>C3</i>	Complement component 3	19:6677715-6730573	99.29%
<i>DGKE</i>	Diacylglycerol kinase, epsilon 64kDa	17:54911460-54946036	93.74%
<i>ADAMTS13</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13	9:136279478-136324508	99.24%
<i>PIGA</i>	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A	X:15337573-15353676	100%
<i>PIGT</i>	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T	20:44044717-44054884	100%

2. Valoración de la utilidad clínica del panel en el diagnóstico de las Anemias Hemolíticas Congénitas.

2.1. Población de estudio.

Se analizaron 65 pacientes:

- 3 controles sanos.
- 16 pacientes diagnosticados de Anemia Hemolítica Congénita en los cuales ya se tenía el diagnóstico molecular (Tabla 5).
- 46 pacientes sin diagnóstico genético (Figura 11).
 - 25 tenían una orientación de la etiología de la AHC (19 Corpuscular, 1 Medular, 5 Extrínseca).
 - 21 presentaban Anemia Hemolítica Congénita de etiología no identificada.

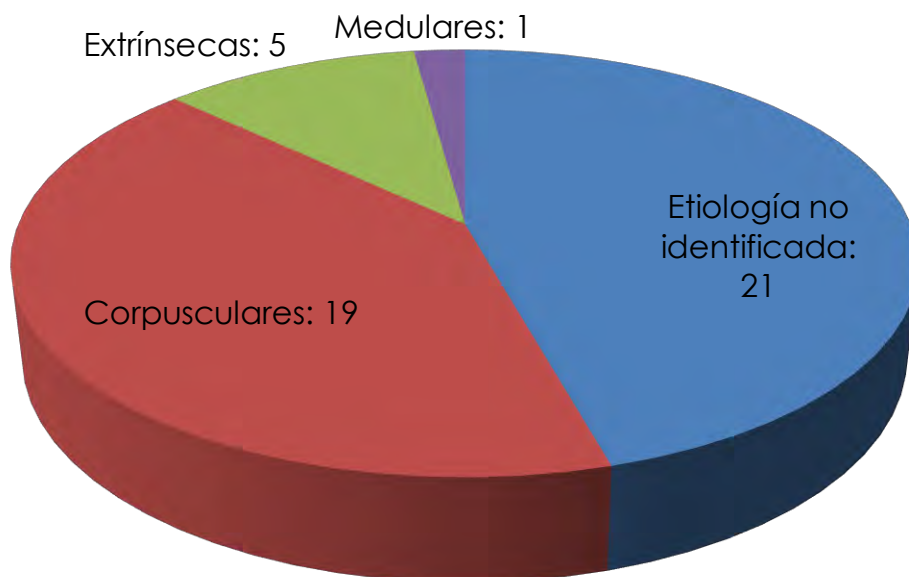


Figura 11. Distribución de los pacientes estudiados mediante NGS según orientación etiológica de la AHC.

2.2. Análisis de robustez de la prueba.

En esta fase de validación se incluyeron 19 muestras para confirmar la capacidad de detección de mutaciones del panel: 3 controles sanos en los cuales no se esperaban encontrar mutaciones patogénicas y 16 de pacientes ya diagnosticados de AHC en los que se tenía identificada la mutación responsable de la enfermedad, que incluían mutaciones puntuales, inserciones y deleciones.

Se confirmó la presencia de la mutación ya detectada previamente en el 93,75% de los casos (15/16). Ninguno de los individuos sanos incluidos en el grupo control presentó mutaciones patogénicas asociadas a AHC (Tabla 5).

Con estos resultados se procedió a determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

s: $\frac{\text{Casos con mutación previa y confirmado por el panel (15)}}{\text{Casos con mutación previa confirmada y no por el panel (16)}} \times 100$

e: $\frac{\text{Casos sin mutaciones previas y no detección por el panel (3)}}{\text{Casos sin mutaciones previas, detectadas y no por el panel (3)}} \times 100$

VPP: $\frac{\text{Casos con mutación previa confirmados por el panel (15)}}{\text{Casos con y sin mutación previa detectados por el panel (15)}} \times 100$

VPN: $\frac{\text{Casos sin mutación previa sin detección por el panel (3)}}{\text{Casos sin mutación previa detectados y no por el panel (3)}} \times 100$

De los resultados obtenidos se puede concluir que la prueba presenta:

- Sensibilidad: 93.75%
- Especificidad: 100%
- VPP: 100%
- VPN: 100%

Tabla 5. Muestras control utilizadas en la fase de validación y detección de mutaciones por el panel.

Caso	Diagnóstico	Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Detección de mutaciones por el panel
001	Control sano	-	-	-	NO
003	Deficiencia G6PD	G6PD	c.653C>T	p.Ser218Phe	SI
005	Control sano	-	-	-	NO
006	Deficiencia G6PD	G6PD	c.292G>A;c.466A>G	p.Val98Met; p.Asn156Asp	SI
008	Deficiencia G6PD	G6PD	c.352_354delITC	p.Phe118del	SI
010	Hb D	HBB	c.364G>C	p.Glu122Gln	SI
011	β -0-Talasemia	HBB	c.126_129delCTT	p.Phe42fs*	SI
012	Hb S	HBB	c.20A>T	p.Glu7Val	SI
016	Control sano	-	-	-	NO
022	Talasemia mayor	HBB	c.118C>T; c.93-21G>A	p.Gln40Ter; Splicing	SI
026	Hb Jhonstown	HBB	c.328G>C	p.Val110Leu	SI
029	Deficiencia G6PD	G6PD	c.683G>A	p.Arg228His	SI
030	Deficiencia G6PD	G6PD	c.1250G>A	p.Arg417His	SI
033	Hb C/ β -Talasemia	HBB	c.19G>A; c.92+6T>C	p.Glu7Lys; Splicing	SI
C01	β -Talasemia	HBB	c.404_405delITG c.411_414delITGTG	p.Val135fs p.Val138fs	SI
C03	Deficiencia PK	PKLR	c.-72A>G	R. promotora	SI
C04	β -Talasemia	HBB	c.92+6T>C	-	SI
C05	Deficiencia PK	PKLR	c.1063A>G; c.1064T>C	p.Met355Val; p.Met355Thr	NO
C06	ADC	GATA1	c.866 A>G	p.His289Arg	SI

2.3. Detección de mutaciones patogénicas mediante NGS.

- Detección de mutaciones en pacientes con AHC Corpuscular.

En este grupo se incluyeron 19 pacientes:

- 9 tenían diagnóstico de AHC secundaria a membranopatía, de los cuales 5 correspondían a Esferocitosis Hereditaria, 2 Eliptocitosis Hereditaria y 2 casos de Estomatocitosis deshidratada (Xerocitosis).
- 7 casos presentaban una variante de Hemoglobina detectada por electroforesis pero no identificada.
- 3 pacientes estaban diagnosticados de Anemia hemolítica secundaria a déficit enzimático, de los cuales 2 padecían deficiencia de G6PD y 1 deficiencia de 5-Pirimidin-nucleotidasa.

- Detección de mutaciones en pacientes con membranopatías.

- Casos de Esferocitosis Hereditaria:

En este grupo se estudiaron 5 pacientes (casos 034, 073, 074, 075, 081). Dos de los pacientes (casos 034 y 081) no presentaban antecedentes familiares de Esferocitosis Hereditaria (Tabla 6).

Se detectaron mutaciones patogénicas en el 100% de los casos estudiados, observándose mutaciones no sinónimas con sentido erróneo (*missense*) y deleciones con alteración del marco de lectura, siendo el gen *ANK1* donde más se detectaron (3/5).

Todas las mutaciones identificadas en éste grupo se encontraban en heterocigosis y se trataban de mutaciones no identificadas previamente (excepto el caso 034) con una prevalencia en la población inferior al 1%

(MAF < 0.01) y con un potencial patogénico evaluado por los modelos de predicción in silico SIFT y Polyphen-2.

En el caso 034 se identificó la presencia de dos polimorfismos de baja expresión en el *SPTA1* en heterocigosis asociados a casos recesivos de Esferocitosis Hereditaria: c.2909C>A (p.Ala970Asp) conocido como aBugHill y c.5572C>G (p.Leu1858Val) conocido como aLELY. La presencia de este genotipo heterocigoto compuesto nos justifica la etiopatogenia de éste caso de EH sin antecedentes familiares.

El caso 073 presentaba una delección en heterocigosis en el gen *ANK1* c.1196_1196delC. Esta delección del nucleótido citosina en la posición 1196 ocasiona un desplazamiento del marco de lectura con la consecuente aparición de un codón stop prematuro que genera una proteína truncada de 406 aminoácidos. Esta mutación causa la alteración de la estructura de la membrana debido a la ausencia del dominio de unión a la Espectrina y del dominio regulador C-terminal.

En el caso 074 se detectó una delección heterocigota de 4 nucleótidos en el gen *SPTB* (c.2571_2574delAGAC). Esta variante produce un desplazamiento del marco de lectura codificando un codón stop prematuro que genera una proteína truncada de 858 aminoácidos. Éste cambio de conformación de la proteína supondría una alteración de la unión a la Espectrina-Alfa y a la Anquirina lo que ocasionaría la deformación de los eritrocitos.

En el caso 075 observamos una mutación missense en heterocigosis en el gen *ANK1*, donde la sustitución de la adenina por guanina en la posición 3596 produce el cambio de aminoácido Asparagina por Serina en el codón 1199. Este residuo se encuentra altamente conservado y se localiza en la región de los dominios en tándem ZU5 que son los responsables de la unión de la Anquirina a la Espectrina-Beta. Los

modelos de predicción in silico atribuyen patogenicidad a esta variante, por lo que la atribuimos como causante de la EH.

El caso 081 identificamos una mutación en heterocigosis en el gen *ANK1* localizada en el intron 16-17 (c.1800+1C>T). Esta variante no descrita previamente y tampoco identificada en los progenitores produce una alteración en el splicing, resultando en un transcrito 315 pares de bases más largo que el canónico, lo que supone la adición de 105 aminoácidos a la proteína, tal y como lo refleja la base de datos consultada (Center of Biological Sequence Analysis; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>).

Tabla 6. Mutaciones detectadas en pacientes diagnosticados de Esferocitosis Hereditaria.

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo
034	<i>SPTA1</i>	c.2909C>A	p.Ala970Asp	Heterocigosis
	<i>SPTA1</i>	c.5572C>G	p.Leu1858Val	Heterocigosis
073	<i>ANK1</i>	c.1196_1196delC	p.Arg399fs*7	Heterocigosis
074	<i>SPTB</i>	c.2571_2574delAGAC	p.Asp858fs	Heterocigosis
075	<i>ANK1</i>	c.3596A>G	p.Asn1199Ser	Heterocigosis
081	<i>ANK1</i>	c.1800+1C>T	splicing	Heterocigosis

- Casos de Eliptocitosis Hereditaria.

Se analizaron dos casos diagnosticados de Eliptocitosis Hereditaria (019 y 051), detectándose mutaciones patogénicas en un caso (Tabla 7).

En el caso 019 se identificó la presencia de un genotipo heterocigoto compuesto en el gen *SPTA1* (c.5992G>C; c.6046C>T; c.1817A>G), que

ocasionaban los cambios de los aminoácidos Ala1998Pro, Arg2016Cys y Asp606Gly respectivamente. Las variantes c.5992G>C y c.6046C>T son polimorfismos de baja expresión que han sido descritas previamente en casos de Eliptocitosis hereditaria asociados a otras variantes patogénicas [89]. La mutación c.1817A>G (p.Asp606Gly) es una variante de muy baja frecuencia (MAF < 0.01) que los modelos in silico (Polyphen-2 y MutationTaster) predicen ser patogénica.

Tabla 7. Mutaciones detectadas en pacientes diagnosticados de Eliptocitosis Hereditaria.

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo
019	<i>SPTA1</i>	c.5992G>C	p.Ala1998Pro	Heterocigosis
	<i>SPTA1</i>	c.6046C>T	p.Arg2016Cys	Heterocigosis
	<i>SPTA1</i>	c.1817A>G	p.Asp606Gly	Heterocigosis
051	No se detectaron mutaciones patogénicas			

- Casos de Estomatocitosis deshidratada (Xerocitosis).

En este subgrupo se incluyeron 2 pacientes (caso 066 y 072) con diagnóstico de Estomatocitosis deshidratada (Tabla 8), con historia clínica de hemólisis larvada compensada y fundamentado en las pruebas de permeabilidad iónica eritrocitaria con evidencia de fuga de potasio intraeritrocitario.

En el caso 066 se detectó una mutación *missense* en heterocigosis en el gen *PIEZO1*. Esta variante ocasionada por la sustitución del nucleótido citosina por timina en la posición 1789, ocasiona el cambio de aminoácido Leucina por Fenilalanina en el codón 597. Esta mutación no

había sido descrita con anterioridad y no se encontró en las bases de datos consultadas (1000 Genomes, ExAC y dbSNP), igualmente los modelos in silico consultados predecían su patogenicidad.

En el caso 072 no se identificaron mutaciones patogénicas en el gen *PIEZO1* ni en los demás genes incluidos en el panel que justificaran el cuadro clínico.

Tabla 8. Mutaciones detectadas en pacientes diagnosticados de Estomatocitosis deshidratada (Xerocitosis).

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo
066	<i>PIEZO1</i>	c.1789C>T	p.Leu597Phe	Heterocigosis
072	No se detectaron mutaciones patogénicas			

- Detección de mutaciones en pacientes con Hemoglobinopatías.

Se incluyeron 7 pacientes portadores de una variante de Hb de migración anómala detectada por electroforesis capilar (casos 049, 055, 057, 060, 061, 088 y 089). Ninguno de los casos mostraba datos de hemólisis intra o extravascular.

El panel permitió realizar el diagnóstico molecular en 3 de los 7 casos (Tabla 9).

En el caso 049 se identificó la mutación missense c.19G>A en heterocigosis en el gen *HBB*, que condiciona la sustitución del aminoácido Acido Glutámico por Lisina en el codón 7, originando la variante de hemoglobina Hb-C.

El caso 061 mostró la mutación missense c.364G>C en heterocigosis en el gen *HBB*, que provoca el cambio de aminoácido Ácido Glutámico por Glutamina en el codón 122 dando origen a la Hb-D Agri.

En el caso 089 se observó la mutación missense c.230C>A en heterocigosis en el gen *HBB* en la que se produce la sustitución del aminoácido Alanina por Acido Aspártico en el codón 77, lo que conlleva a la síntesis de la variante Hb-J Chicago.

Las mutaciones identificadas se encontraban descritas en las bases de datos consultadas.

Tabla 9. Mutaciones detectadas en pacientes diagnosticados de Hemoglobinopatía.

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo	Variante de Hb
049	<i>HBB</i>	c.19G>A	p.Glu7Lys	Heterocigosis	Hb-C
055	No se detectan mutaciones				
057	No se detectan mutaciones				
060	No se detectan mutaciones				
061	<i>HBB</i>	c.364G>C	p.Glu122Gln	Heterocigosis	Hb-D Agri
088	No se detectan mutaciones				
089	<i>HBB</i>	c.230C>A	p.Ala77Asp	Heterocigosis	Hb-J Chicago

- Detección de mutaciones en pacientes con déficits enzimáticos.

Los tres pacientes incluidos en este grupo (casos 031, 032 y 084) tenían identificado el déficit enzimático por alteración en la dosificación de su actividad. El panel detectó mutaciones patogénicas en todos los casos, permitiendo una caracterización molecular de la enfermedad (Tabla 10).

En los casos 031 y 032 diagnosticados de Anemia Hemolítica por deficiencia de G6PD y en el caso 084 diagnosticado de deficiencia de 5-Pirimidin-nucleotidasa se detectaron mutaciones en los genes respectivos ya conocidas como causantes de la enfermedad.

En el caso 031 se identificó la mutación missense c.233T>C en hemicigosis en el gen *G6PD*, que condiciona la sustitución del aminoácido Isoleucina por Treonina en el codón 78, originando el déficit conocido como G6PD Aures [90].

Respecto al caso 032, detectamos la mutación missense c.827C>T en hemicigosis en el gen *G6PD* la cual provoca el cambio de aminoácido Prolina por Leucina en el codón 276 y origina la variante descrita como G6PD Hamburg [91]. De igual manera, dada la forma de presentación inusual de éste caso y tratarse de una mutación de novo, hemos publicado los hallazgos clínico-genéticos de este paciente y hemos propuesto los mecanismos biológicos del fallo enzimático [92].

El caso 084 presentaba la mutación missense c.542T>C en homocigosis en el gen *NT5C3A*, que conlleva a la sustitución del aminoácido Leucina por Prolina en el codón 181 y que ha sido descrita como causante de AHC [93].

Tabla 10. Mutaciones detectadas en pacientes con déficits enzimáticos.

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo
031	<i>G6PD</i>	c.233T>C	p.Ile78Thr	Hemicigosis
032	<i>G6PD</i>	c.827C>T	p.Pro276Leu	Hemicigosis
084	<i>NT5C3A</i>	c.542T>C	p.Leu181Pro	Homocigosis

- Detección de Mutaciones en pacientes AHC Medular.

Se estudió un caso (048) de una paciente diagnosticada de Anemia Diseritropoyética Congénita no clasificable, con alteraciones morfológicas tanto en sangre periférica como en médula ósea, y un ligero componente hemolítico compensando, sin embargo no cumplía los criterios diagnósticos para ser clasificada como una ADC (Tabla 11).

En este caso no se identificaron mutaciones patogénicas en los genes implicados en la fisiopatología de las diferentes entidades de ADC, sin embargo se identificó una nueva mutación missense en el gen *PIEZO1* (c.7505A>G) que condicionaba el cambio de aminoácido Lisina por Arginina en la posición 2502, que los modelos in silico predecían ser patológica.

Posteriormente se realizaron los estudios de permeabilidad iónica de la membrana, corroborando la fuga de potasio intraeritrocitario que permitieron establecer el diagnóstico definitivo de Estomatocitosis deshidratada.

Estos hallazgos fueron publicados por nuestro grupo demostrando la utilidad del panel para alcanzar un diagnóstico correcto en anemias congénitas de diagnóstico controvertido utilizando otras técnicas [94].

Tabla 11. Mutaciones detectadas en pacientes diagnosticados de AHC medular.

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo
048	<i>PIEZO1</i>	c.7505A>G	p.Lys2502Arg	Heterocigosis

- Detección de Mutaciones en pacientes AHC Extrínseca.

Se incluyeron 5 casos diagnosticados de AHC Extrínseca secundaria a Microangiopatía Trombótica (039, 063, 064, 071 y 086), detectándose mutaciones patogénicas en el 100% de los casos (Tabla 12).

4 casos correspondían a pacientes con Purpura Trombótica Trombocitopénica y actividad de la enzima ADAMTS13 inferior al 5% y 1 caso de Síndrome hemolítico urémico atípico, con antecedente de trasplante renal y disminución de los niveles séricos del Factor H del complemento. De los 4 casos de PTT, 3 de ellos eran consanguíneos (casos 039, 063, 064).

Los casos 039, 063 y 064 presentaban una mutación con cambio de sentido en el gen *ADAMTS13* (c.3728T>C), que provoca la sustitución del aminoácido Leucina por Prolina en la posición 1243.

En relación al caso 071, paciente diagnosticado de SHUa, se identificó una mutación missense en el gen *CFH* (c.2071T>C) originando el cambio del aminoácido Cisteína por Arginina en el codón 691.

Las mutaciones identificadas en los casos 039, 063 y 064 en el gen *ADAMTS13*, así como también la variante identificada en el gen *CFH* en el caso 071, no habían sido descritas previamente y no se encontraron en las bases de datos consultadas ExAC, 1000 Genomes y dbSNP y su frecuencia alélica mínima fue < 0.01. De igual manera los modelos in silico consultados las determinaron como patogénicas.

En el caso 086 se detectó la presencia de un polimorfismo en heterocigosis en el gen *ADAMTS13* (c.1342C>G; p.Gln448Glu), el cual

parece estar implicado en una reducción de la actividad proteolítica del Factor von Willebrand [96].

Tabla 12. Mutaciones detectadas en pacientes con AHC Extrínseca.

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo
039	<i>ADAMTS13</i>	c.3728T>C	p.Leu1243Pro	Homocigosis
063	<i>ADAMTS13</i>	c.3728T>C	p.Leu1243Pro	Heterocigosis
064	<i>ADAMTS13</i>	c.3728T>C	p.Leu1243Pro	Heterocigosis
071	<i>CFH</i>	c.2071 T>C	p.Cys691Arg	Heterocigosis
086	<i>ADAMTS13</i>	c.1342C>G	p.Gln448Glu	Heterocigosis

- Detección de Mutaciones en pacientes AHC de etiología no identificada.

En este grupo se incluyeron 21 casos correspondientes a pacientes en los cuales no se había identificado la etiología de la AHC con las pruebas de laboratorio disponibles (Tabla 13). En 19 de 21 de los pacientes estudiados (90%) se identificaron mutaciones patogénicas atribuibles como causales de la enfermedad (Tabla 13).

En los 19 pacientes en los que se identificaron mutaciones, se diagnosticaron:

- 10 AHC debidas a Membranopatías.
- 7 AHC debidas a enzimopatías.
- 2 AHC secundaria a Microangiopatías trombóticas.

El caso 017 se trataba de una niña de 6 años de edad, con episodios intermitentes de anemia hemolítica intravascular y con morfología eritrocitaria no informativa. No presentaba historia familiar de hemólisis. Se detectó un genotipo heterocigoto compuesto en el gen *G6PD* (c.292G>A; c.466A>G) que condiciona la deficiencia de la actividad de dicha enzima y que ha sido reportado previamente [97].

En el caso 020 se identificó la mutación c.167A>G (*missense*) en el gen *SPTB* en heterocigosis, que condiciona la sustitución del aminoácido Arginina por Glicina en el codón 56. Este aminoácido (Gln56) se observa conservado en mamíferos y las herramientas informáticas consultadas (Mutation Taster, PolyPhen y SIFT) predicen que ésta variante es deletérea. La mutación p.Gln56Arg está ubicada en el dominio homólogo calponina el cual es un dominio de unión de la actina esencial para la regulación de la forma celular y señalización de las proteínas [88]. Esta variante no se encontró en las bases de datos 1000 Genomes ni en dbSNP.

En el caso 021 identificamos la mutación c.2803C>T (*non-sense*) en el gen *ANK1* en heterocigosis, que condiciona la aparición de un codón stop prematuro en la posición 935, ocasionando que la proteína pierda 945 aminoácidos en la región C-terminal, incluyendo el dominio ZU5 que tiene como función la unión de la Anquirina a la Espectrina Beta. Esta variante no se encontró en las bases de datos consultadas Ensembl, 1000 Genomes y dbSNP.

El caso 023 presentó la mutación c.1250T>C (*missense*) en heterocigosis en el gen *SLC4A1* (Banda 3), que produce la sustitución del aminoácido Leucina por Prolina en el codón 417. La mutación p.Leu417Pro se ubica en el dominio transmembrana 1 y se ha sugerido que este es uno de los varios dominios de esta proteína que provee acceso al medio extracelular, siendo afectado de manera negativa el intercambio aniónico. La sustitución del residuo de Leucina por Prolina en este caso se localiza en una estructura alfa-hélice de la proteína, lo que puede originar dobleces en la estructura y cambios conformacionales importantes, de hecho el residuo Leu417 se encuentra altamente conservado, como lo indican las bases consultadas PhyloP y PhastCons.

El caso 025 presentaba una mutación missense en Homocigosis en el gen *ADAMTS13* (c.3070C>G), que ocasionaba el cambio de aminoácido Cisteína por Glicina en la posición 1024, y ya se había reportado como causante de PTT congénita [95]. El fenotipo fue confirmado mediante medición de actividad de la enzima ADAMTS13, la cual fue inferior al 5%.

El caso 037 se trataba de un paciente varón de 40 años de edad, con datos de hemólisis crónica larvada y en la morfología periférica se observaban microesferocitos, sin embargo los test de fragilidad osmótica, EMA y criohemólisis no eran concluyentes para Esferocitosis hereditaria. Se identificaron dos mutaciones en heterocigosis en el gen *SPTA1*, una

non-sense (c.2671C>T; p.Arg891Ter) y una missense (c.7104G>T; p.Lys2368Asn). La mutación c.2671C>T codifica la aparición de un codón stop prematuro lo que origina una proteína truncada y la mutación c.7104G>T da origen al cambio de aminoácido Lisina por Asparagina en el codón 2638, lo que supone cambios conformacionales de la estructura de la proteína y su consecuente defecto de ensamblaje, lo que suponemos que da origen a la membranopatía.

En el caso 040 se detectaron dos mutaciones en heterocigosis en el *GPI* que codifica la síntesis de la enzima Glucosa-Fosfato-Isomerasa. Se observó una mutación missense en la posición 242 en la que ocurrió la sustitución del nucleótido guanina por adenina, originando el cambio de aminoácido Arginina por Glutamina en el codón 81 y que los modelos in silico predicen ser patogénica. Adicionalmente se observó la delección del nucleótido adenina en la posición 1238, lo que ocasiona desplazamiento del marco de lectura y da origen a la aparición de un codón stop prematuro, llevando a la pérdida de 111 aminoácidos en la región C-Terminal de la proteína que se encuentra altamente conservada.

En relación al caso 042, detectamos la presencia de una mutación non-sense en heterocigosis en el gen *EPB41* no descrita en la que ocurre la sustitución del nucleótido timina por adenina en la posición 1326. Esta variante origina la aparición de un codón stop prematuro lo que supone la síntesis de una proteína truncada de 442 aminoácidos en lugar de 864, carente de funcionalidad.

El caso 045 se trataba de una lactante hija de padres consanguíneos, con episodios intermitentes de hemólisis intravascular y mínimas alteraciones de la morfología eritrocitaria (en ocasiones equinocitos). Los estudios realizados con anterioridad habían descartado la posibilidad de Hemoglobinopatía, membranopatía y deficiencia de

Piruvato-kinasa o G6PD. Mediante el uso del panel identificamos una mutación missense en homocigosis en el gen *TPI1* (c.315G>C) que condiciona el cambio del aminoácido Ácido Glutámico por Acido Aspártico en el codón 105, originando el déficit de la enzima Triosa-fosfato-Isomerasa. Se realizó el estudio genético en los padres y ambos eran portadores de la mutación en heterocigosis. Ésta mutación es la más frecuente descrita en los casos de deficiencia de TPI.

El caso 052 se trata de un varón adulto con hemólisis crónica leve-moderada, sin alteraciones morfológicas eritrocitarias significativas. Se detectaron dos mutaciones missense en heterocigosis en el gen *GSS* (c.374G>T; c.653T>G) que originan los cambios de aminoácidos Arg125Leu y Phe218Cys respectivamente. Ninguna de estas dos mutaciones habían sido descritas con anterioridad y tampoco se encontraron en las bases de datos consultadas, adicionalmente los modelos in silico predecían su potencial patogénico. Para confirmar su efecto patogénico se realizó la determinación de Glutathion en sangre observando una marcada disminución respecto a los controles sanos [98], concluyéndose que la AHC se debe a deficiencia de Glutathion sintetasa.

En el caso 062 detectamos la presencia de una mutación missense en heterocigosis en el gen *PIEZO1* (c.7505A>G) que condicional el cambio de aminoácido Lisina por Arginina en el codón 2502 y que se predice patológica en los modelos in silico consultados. Esta mutación descrita por nuestro grupo, se ha identificado como causa de Xerocitosis Hereditaria.

En el caso 067 se identificaron 2 mutaciones en heterocigosis en el gen *PKLR*. Una non-sense (c.721G>T; p.Glu241Ter) y una missense (c.1288G>A; p.Ala430Thr). El potencial patogénico de la mutación missense fue valorado en los modelos in silico siendo considerada como

deletérea. La determinación de la actividad enzimática de PKLR en este caso se encontraba en el límite inferior de la normalidad fuera de las crisis hemolíticas, sin embargo creemos que pudiera verse artefactada por el elevado recuento reticulocitario. Se realizó también el estudio molecular a los progenitores identificando en cada uno de ellos una de las variantes encontradas en el probando.

El caso 070 corresponde a una niña con datos de hemólisis crónica y alteraciones neuromusculares. Logramos identificar una mutación missense en homocigosis en el gen *HK1* (c.293G>A) que condiciona el cambio del aminoácido Arginina por Glutamina en el codón 98. Ésta mutación ya se encontraba descrita como causal de AHC por deficiencia de la enzima Hexokinasa.

El caso 076 mostraba datos de hemólisis crónica con presencia de microesferocitos, pero los test de EMA y fragilidad osmótica no eran compatibles con Esferocitosis hereditaria. La secuenciación identificó la presencia de una mutación non-sense en heterocigosis en el gen *SPTA1* (c.2173C>T; p.Arg725Ter) no descrita, además de ser portador de un polimorfismo de baja expresión en el mismo gen relacionado con Esferocitosis hereditaria (c.5572C>G; p.Leu1858Val) conocido como aLELY. La mutación Arg725Ter producirá una proteína truncada de 725 aminoácidos, lo que alteraría su estructura y por consiguiente la formación de dímeros con la Espectrina-Beta.

El caso 082 se trata de un niño diabético tipo 1, que en sus controles rutinarios siempre presentaba niveles disminuidos de Hemoglobina glicosilada (HbA1c), que es un marcador de control metabólico. En casos de hemólisis los valores HbA1c se encuentran disminuidos, por lo que en este caso se inició un estudio para descartar AHC, sin lograr identificarse ninguna alteración con las técnicas convencionales. En el estudio del

panel se identificó una mutación en el gen *PIEZO1* en heterocigosis (c.7367G>A; p.Arg2456His), descrita como causal de Xerocitosis [32].

Los casos 085 y 087 son de pacientes con mínima anemia y datos crónicos de hemólisis. La morfología mostraba la presencia de microesferocitos, sin embargo ninguna de las pruebas diagnósticas para Esferocitosis hereditaria fue concluyente. Se pudo identificar en ambos casos un genotipo heterocigoto compuesto en el gen *SPTA1*. En el caso 085 se detectaron las mutaciones c.5992G>C y c.6046C>T. En el caso 087 se identificó una mutación non-sense (c.2671C>T; p.Arg891Ter) asociada al polimorfismo de baja expresión aLELY (c.5572C>G; p.Leu1858Val).

El caso C07 corresponde a una mujer joven con historia de hemólisis crónica compensada con episodios de crisis intermitentes desencadenadas por procesos infecciosos. En la morfología eritrocitaria se observaba punteado basófilo, sin alteraciones en la forma de los hematíes. Los estudios realizados para descartar la presencia de Hb inestable así como también la determinación de la actividad de la enzima Pirimidin-5-nucleotidasa fueron normales. Mediante el uso del panel se identificó la presencia de una mutación en homocigosis en el gen *GPI* (c.1648 A>G; p.Lys550Glu) conocida como GPI-Catalonia, causante de AHC por déficit de Glucosa-fosfato isomerasa. Confirmamos el efecto patogénico de esta mutación evidenciando una reducción de la actividad de la enzima GPI en esta paciente.

En el caso C08, con datos clínicos de anemia hemolítica microangiopática, el estudio molecular puso de manifiesto una mutación en heterocigosis en el gen *C3* (c.2203C>T) que condiciona el cambio de aminoácido Arginina por Triptófano en el codón 735. La presencia de ésta mutación ha sido descrita previamente como causa de Síndrome Hemolítico Urémico atípico.

Tabla 13. Mutaciones detectadas en pacientes con AHC de etiología no identificada.

Caso	Gen	Variante	Cambio de aa	Genotipo
017	<i>G6PD</i>	c.292G>A	p.Val98Met	Heterocigosis
	<i>G6PD</i>	c.466A>G	p.Asn156Asp	Heterocigosis
020	<i>SPTB</i>	c.167A>G	p.Gln56Arg	Heterocigosis
021	<i>ANK1</i>	c.2803C>T	p.Arg935Ter	Heterocigosis
023	<i>SLC4A1</i>	c.1250T>C	p.Leu417Pro	Heterocigosis
025	<i>ADAMTS13</i>	c.3070C>G	p.Cys1024Gly	Homocigosis
037	<i>SPTA1</i>	c.2671C>T	p.Arg891Ter	Heterocigosis
	<i>SPTA1</i>	c.7104G>T	p.Lys2368Asn	Heterocigosis
040	<i>GPI</i>	c.242G>A	p.Arg81Gln	Heterocigosis
	<i>GPI</i>	c.1238_1238delA	p.Gln413fs	Heterocigosis
042	<i>EPB41</i>	c.1326T>A	p.Tyr442Ter	Heterocigosis
045	<i>TPI1</i>	c.315G>C	p.Glu105Asp	Homocigosis
046	No se detectaron mutaciones patogénicas			
052	<i>GSS</i>	c.374G>T	p.Arg125Leu	Heterocigosis
	<i>GSS</i>	c.653T>G	p.Phe218Cys	Heterocigosis
062	<i>PIEZO1</i>	c.7505A>G	p.Lys2502Arg	Heterocigosis
067	<i>PKLR</i>	c.721G>T	p.Glu241Ter	Heterocigosis
	<i>PKLR</i>	c.1288G>A	p.Ala430Thr	Heterocigosis
070	<i>HK1</i>	c.293G>A	p.Arg98Gln	Homocigosis
076	<i>SPTA1</i>	c.2173C>T	p.Arg725Ter	Heterocigosis
	<i>SPTA1</i>	c.5572C>G	p.Leu1858Val	Heterocigosis
082	<i>PIEZO1</i>	c.7367G>A	p.Arg2456His	Heterocigosis
085	<i>SPTA1</i>	c.5992G>C	p.Ala1998Pro	Heterocigosis
	<i>SPTA1</i>	c.6046C>T	p.Arg2016Cys	Heterocigosis
087	<i>SPTA1</i>	c.2671C>T	p.Arg891Ter	Heterocigosis
	<i>SPTA1</i>	c.5572C>G	p.Leu1858Val	Heterocigosis
C02	No se detectaron mutaciones patogénicas			
C07	<i>GPI</i>	c.1648 A>G	p.Lys550Glu	Homocigosis
C08	<i>C3</i>	c.2203C>T	p.Arg735Trp	Heterocigosis

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la mayoría de las AHC el diagnóstico se fundamenta en los datos clínicos, la morfología eritrocitaria, las pruebas básicas de laboratorio y en los antecedentes familiares que permitirán determinar el patrón de herencia. En estos casos en los que está claro el diagnóstico, el estudio molecular nos servirá para efectuar un consejo genético prenatal y para un mayor conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

Sin embargo, cuando el diagnóstico por estos medios no es suficiente, el estudio genético será necesario, ya que permitirá determinar la etiología de la anemia, será de utilidad en el diagnóstico prenatal o preimplantacional y en algunos casos como en la Xerocitosis Hereditaria, en la que está contraindicada la esplenectomía, será de utilidad en las decisiones terapéuticas.

El objetivo principal de este estudio fue mejorar el diagnóstico de las Anemias Hemolíticas Congénitas mediante el estudio de los genes implicados en esta patología utilizando la Next Generation Sequencing. Para ello en primer lugar realizamos una revisión de la literatura con el fin de seleccionar los genes candidatos a ser incluidos en el panel y una vez escogidos procedimos a su diseño mediante la herramienta informática Ampliseq Designer. A continuación validamos su capacidad de detección de mutaciones utilizando un grupo de pacientes diagnosticados en los cuales ya se había identificado el defecto molecular por técnicas convencionales, detectándose las mutaciones en 15 de 16 pacientes y posteriormente estudiamos a un grupo de pacientes con diagnóstico clínico y otros sin etiología definida, logrando identificar el defecto genético en el 82% de los casos (38/46).

Diseño del panel:

El estudio de paneles de genes mediante NGS ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de diferentes patologías. A pesar de las enormes ventajas que ofrece la NGS dirigida a paneles de genes, existen limitaciones propias de la técnica que hay que tener en cuenta al momento del diseño del panel. Es sabido que mediante la NGS no es posible la detección de grandes deleciones, ya que los fragmentos a ser secuenciados oscilan entre 150 y 300 pares de bases. En nuestro caso el conocimiento de ésta limitación nos ha llevado a excluir del panel los genes *HBA1* y *HBA2* que codifican la alfa-globina, ya que la mayoría de las alteraciones presentes en estos genes se deben a grandes deleciones que no pueden ser detectadas por esta técnica y a la alta homología entre ambos genes, que dificultan la secuenciación mediante este método.

Por otra parte la selección de genes en nuestro panel la realizamos con la información obtenida en la búsqueda bibliográfica hasta Enero del año 2014, sin embargo durante estos últimos dos años se han descubierto nuevos genes implicados en las AHC y que no fueron incluidos en el diseño inicial. Entre ellos el gen *KCCN4* que codifica para el canal Gardos se ha asociado a casos de Xerocitosis Hereditaria [99]. De manera más reciente se ha publicado la implicación de mutaciones en el gen *ATP11C*, que codifica una de las principales flipasas eritrocitarias y cuya función es el transporte de la fosfatidilserina desde el exterior de la membrana eritrocitaria al interior, como causante de anemia hemolítica congénita [100]. Probablemente con el auge de los estudios de genoma y exoma completo en la investigación de mecanismos patogénicos aún no conocidos, se irán descubriendo más genes implicados en ésta patología y la actualización de los paneles y su posible ampliación es una necesidad.

En nuestro panel hemos incluido los genes *PIGA* y *PIGT*, los cuales codifican proteínas de anclaje de membrana asociadas a Glucosil-fosfatidil-inositol. La presencia de clonas con alteraciones en éstos genes conllevan a desarrollar Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN). Aunque la HPN presenta clínicamente un cuadro de hemólisis intravascular adquirido, se trata de una enfermedad clonal, por lo que no está incluida dentro de las anemias estudiadas por nuestro panel, sin embargo se han descrito casos muy raros, en los cuales mutaciones de la línea germinal en estos genes pueden cursar con cuadros dismorfogenéticos graves acompañados de hemólisis, generalmente incompatibles con la vida [81,82].

La implementación del estudio de paneles de genes mediante NGS en el diagnóstico clínico en AHC es un tema que ha despertado interés en la actualidad, de hecho en el momento en que hemos publicado la utilidad de nuestro panel [98], se han publicado otras dos similares en el mismo campo [101,102].

La principal diferencia entre nuestro panel que incluye 40 genes y los presentados por Argawal [101] y Roy [102], es que agrupamos a un grupo más homogéneo de enfermedades que comparten una característica clínica común, la hemólisis, y que permite establecer un diagnóstico diferencial entre las AHC de origen corpuscular, medular y extrínseco.

En el panel diseñado por Agarwal, se incluyeron solo 28 genes implicados en la patogénesis de las membranopatías, déficit enzimático y alteraciones del metabolismo de la bilirrubina. Por otra parte, el panel diseñado por Roy se incluyeron 33 genes, entre ellos los implicados en la patogénesis de las Anemias Diseritropoyéticas Congénitas, Anemias Sideroblásticas congénitas, déficit enzimáticos (G6PD, PKLR y 5-Pirimidin nucleotidasa) y anemias por Insuficiencia Medular (Anemia de Blackfan-

Diamond, Síndrome de Schwachman-Diamond y Disqueratosis Congénita), recogiendo éste panel un grupo muy heterogéneo de enfermedades con características clínicas muy diversas.

Utilidad clínica del panel en el diagnóstico de las AHC.

Detección de mutaciones:

Para validar la capacidad de detección de mutaciones de nuestro panel empleamos 16 muestras de pacientes diagnosticados de AHC, en los cuales ya se había identificado el defecto genético causante de la enfermedad. Entre ellas se incluían mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. El panel logró detectar las mutaciones previamente identificadas en 15 de los 16 pacientes, fallando en la identificación de 2 mutaciones en heterocigosis en el exón 3 del gen que codifica la enzima Piruvato-Kinasa (*PKLR*: c.1063A>G; c.1064T>C).

Como hemos mencionado con anterioridad, para la secuenciación de paneles de genes el primer paso a seguir es el enriquecimiento de las regiones de interés, que en nuestro caso lo hemos realizado mediante PCR-Multiplexada. Si existen polimorfismos o regiones ricas en GC puede ocurrir un defecto en la hibridación de los primers, lo que origina una inadecuada amplificación de la región a ser secuenciada. Por ello es necesario un óptimo control de calidad de las secuencias antes de proceder a su interpretación y realizar secuenciación directa mediante Sanger de las regiones no cubiertas para asegurar un diagnóstico correcto. Para solventar este fallo del procedimiento hemos procedido a secuenciar de forma universal las regiones no cubiertas de manera adecuada.

En nuestro estudio incluimos 46 pacientes, de ellos 25 con una orientación clínica de la causa de la AHC y 21 pacientes con hemólisis

crónica sin etiología identificada. De los 25 pacientes con diagnóstico clínico se logró identificar la alteración molecular en 19 de ellos (76%), siendo altamente eficaz para los pacientes afectados de una membranopatía y enzimopatías. Observamos que en el grupo de pacientes que presentaban variantes de hemoglobina el panel logró identificar la alteración molecular en 3 de los 7 casos. En los 4 pacientes no diagnosticados por el panel, se identificó posteriormente la alteración molecular en estudios dirigidos a los genes *HBA1* o *HBA2* que codifican la cadena α de la globina, que como se mencionó con anterioridad no fueron incluidos en el panel. En el grupo de pacientes con AHC de etiología no identificadas se alcanzó un diagnóstico en 19 de los 21 casos (90%) lo que demuestra una alta sensibilidad de éste método. En todos los casos las mutaciones detectadas por el panel fueron confirmadas por secuenciación Sanger. No fue necesario adquirir sondas MLPA ni realizar PCR Cuantitativa para la validación de las mutaciones detectadas.

En comparación con los paneles utilizados por Agarwal y Roy, nuestro panel presenta una mayor capacidad diagnóstica respecto a ellos. Agarwal logra realizar un diagnóstico molecular en el 70% de los casos, siendo la mayoría de ellos pacientes con membranopatías. Al igual que nosotros, gran parte de las mutaciones detectadas corresponden a mutaciones no descritas previamente.

Respecto al panel de Roy, llamado ORCP (Oxford Red Cell Panel), el rendimiento es mucho menor. Mediante la aplicación del ORCP se alcanza un diagnóstico molecular solo en el 38.6% de los casos, en probable relación a que incluye enfermedades más heterogéneas en las que probablemente hay un menor conocimiento de los genes causales. En concreto, en el caso de las enzimopatías sólo están incluidos los genes correspondientes a 3 enzimas.

Otro punto importante al que hacer referencia, es que la aplicación de nuestro panel permite una correcta clasificación etiológica en casos con diagnóstico incierto. Como lo hemos descrito con anterioridad, en un caso etiquetado de Anemia Diseritropoyética Congénica variante, donde no encontramos mutaciones en los genes involucrados en la patogénesis de las ADC, hemos detectado una mutación no descrita con valor predictivo patológico en el gen *PIEZO1*. En este caso confirmamos posteriormente la fuga de potasio intracelular por medio de estudios de permeabilidad de membrana, estableciéndose el diagnóstico de Xerocitosis Hereditaria. De esta manera demostramos que el estudio simultáneo de los genes implicados en la patogénesis de las AHC nos muestra un panorama genético global que permite un adecuado diagnóstico diferencial.

Interpretación de las variantes detectadas:

En la era de la medicina genómica la interpretación de las variantes más que la detección de las mismas representa el principal reto, ya que supone la atribución o no a la variante detectada de la causalidad de enfermedad que vemos en la práctica clínica [103]. Mediante el uso de nuestro panel como una herramienta diagnóstica nos encontramos con un gran número de variantes por cada paciente estudiado (en promedio 300). Entre ellas se incluían variantes polimórficas, con efecto sinónimo, mutaciones patogénicas y variantes de significado incierto. Con el fin de seleccionar las variantes de interés utilizamos el software Ion Reporter, con el cual mediante la aplicación de filtros permitían un análisis rápido y adecuado en cada caso. Una vez obtenidas las variantes ya filtradas investigamos cada una de ellas en las bases de datos Ensembl y ClinVar, para obtener información de su patogenicidad. En caso de mutaciones no descritas previamente, si eran mutaciones missense que producían cambio de aminoácidos se consultaban los modelos de predicción *in silico* PROVEAN, Polyphen-2 y

SIFT para valorar su potencial patogénico. En caso de inserciones y deleciones consultamos la base de datos Mutation Taster y en casos de mutaciones que afectaban el splicing se consultó el software Fruitfly.

En nuestro estudio identificamos un total de 49 mutaciones, de ellas 23 fueron mutaciones no descritas, atribuibles como patogénicas y causales de la enfermedad. En el caso de las AHC, al ser enfermedades “monogénicas”, en las que se supone que la presencia de una única mutación en homocigosis (o heterocigosis en aquellas con herencia dominante) o un genotipo heterocigoto compuesto dará origen a la enfermedad, determinar la causalidad de la enfermedad a una mutación por primera vez identificada es un proceso complejo. Todas las herramientas de software consultadas para la predicción *in silico* del efecto de las variantes encontradas tienen limitaciones y como su nombre indica, sólo predicen posible patogenicidad. Por lo tanto, se necesitan pruebas funcionales, que son relativamente sencillas en los casos de los déficits enzimáticos o mucho más complejas si se incluyen las mediciones cuantitativas de los respectivos niveles de ARNm o proteína en los otros genes implicados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las pruebas funcionales concluyentes no están disponibles para la mayoría de las proteínas codificadas por el genoma humano [103,104].

En todos los casos en que se detectaron estas nuevas mutaciones, se realizaron las determinaciones disponibles para confirmar la sospecha diagnóstica y poder demostrar la correlación genotipo-fenotipo. De igual manera, en los casos en los que fue posible se realizaron los estudios genéticos para valorar la segregación familiar de la mutación y poder determinar su efecto patogénico en los familiares portadores de la mutación, y ausencia de enfermedad en los familiares que no poseen la mutación.

Nuestro panel constituye una poderosa herramienta que permitirá diagnosticar pacientes afectados de AHC así como también de descubrir nuevas mutaciones implicadas en la patogénesis de las mismas, lo que mejorará el conocimiento de los mecanismos biológicos de la enfermedad y que servirán como marcadores diagnósticos en futuros pacientes.

CONCLUSIONES

En resumen:

- Hemos diseñado y validado una nueva herramienta diagnóstica para pacientes con AHC, basada en la detección de mutaciones mediante NGS en un panel de 40 genes.
- Hemos demostrado que éste panel tiene una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, y
- Hemos comprobado que por medio de la aplicación de nuestro panel podemos detectar nuevas mutaciones patogénicas causantes de AHC.

Por lo tanto, concluimos:

1. El panel que hemos desarrollado en este trabajo resuelve el problema diagnóstico de pacientes con AHC cuya etiología no era posible identificar por métodos convencionales.
2. La detección de mutaciones mediante este panel facilitará la prevención de nuevos casos de AHC.

Quiero hacer constar que gracias a este trabajo nos hemos convertido en un centro de referencia para el estudio genético de las AHC. Este hecho nos va a permitir analizar un alto número de pacientes de estas enfermedades raras, y en consecuencia detectar nuevas mutaciones que nos llevarán a alcanzar un mayor conocimiento de esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008;372(9647):1411-26.
2. Christensen RD, Nussenzveig RH, Yaish HM, Henry E, Eggert LD, Agarwal AM. Causes of hemolysis in neonates with extreme hyperbilirubinemia. *J Perinatol*. 2014;34:616–9.
3. Melnikova I. Rare diseases and orphan drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:267–8.
4. Kato GJ, Taylos JG. Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis. *Br J Haematol* 2009;148:690-701.
5. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. *JAMA*. 2005;293:1653-62.
6. Vives Corrons JL. Anemias hemolíticas. Aspectos generales. Anemias hemolíticas hereditarias. En: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. *Hematología Clínica*. 5 ed. Madrid: Elsevier; 2006. p. 187–221.
7. Goodman MA, Malik P. The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges. *Ther Adv Hematol*. 2016;7(5):302-15.
8. Gallagher PG. Diagnosis and management of rare congenital nonimmune haemolytic disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:392-9.
9. Schilling RF. Risks and benefits of splenectomy versus no splenectomy for hereditary spherocytosis: a personal view. *Br J Haematol*. 2009;145:728-32.
10. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre y post-natal. *Diagnóstico Prenatal*. 2012;23(2):56-66.
11. Vives Corrons JL. Introducción al estudio de la patología eritrocitaria. En: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. *Hematología clínica*. 5 ed. Madrid: Elsevier; 2006. p. 81–106.

12. Gulbis B, Eleftheriou A, Angastiniotis M, Ball S, Surrallés J, Castella M, et al. Epidemiology of rare anaemias in Europe. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:375–96.
13. Weatherall DJ. The Thalassemias: Disorders of Globin Synthesis. En: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology.* 8 ed. Mc Graw-Hill; 2010. p. 675–707.
14. Hartevelde C, Higgs D. α -Thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:13.
15. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 2010;12(2):61-76.
16. Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DHK, Anagnou NP, et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D537-41.
17. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(3):a011858.
18. Chaturvedi S, DeBaun MR. Evolution of sickle cell disease from a life-threatening disease of children to a chronic disease of adults: The last 40 years. *Am J Hematol.* 2016;91(1):5-14.
19. Yates AM, Mortier NA, Hyde KS, Hankins JS, Ware RE. The diagnostic dilemma of congenital unstable hemoglobinopathies. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(7):1393-5.
20. Ghosh K, Colah R, Manglani M, Choudhry VP, Verma I, Madan N, et al. Guidelines for screening, diagnosis and management of hemoglobinopathies. *Indian J Hum Genet.* 2014;20(2):101-19.
21. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Biomark Med.* 2014;8(1):119-31.
22. Greene DN, Vaughn CP, Crews BO, Agarwal AM. Advances in detection of hemoglobinopathies. *Clin Chim Acta.* 2015;439:50-7.
23. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol.* 2008;141:367–75.

24. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2007;21:1-20.
25. Christensen RD, Lambert DK, Henry E, Eggert LD, Yaish HM, Reading NS, et al. Unexplained extreme hyperbilirubinemia among neonates in a multihospital healthcare system. *Blood Cells Mol Dis.* 2013;50(2):105-9.
26. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2013;27(4):167-78.
27. Dhermy D, Steen-Jhonsen J, Bournier O, Hetet G, Cynober T, Tchernia G, et al. Coinheritance of two alpha-spectrin gene defects in a recessive spherocytosis family. *Clin Lab Haematol.* 2000;22(6):329-36.
28. Bolton-Maggs P, Langer J, Iolascon A, Tittensor P, King M. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol.* 2012;156:37-49.
29. Wrong O, Bruce LJ, Unwin RJ, Toye AM, Tanner ML. Band 3 mutations, distal renal tubular acidosis and Southeast Asian Ovalocytosis. *Kidney Int.* 2002;62(1):10-9.
30. King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. International Council for Standardization in Haematology. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol.* 2015;37:304-25.
31. Gallagher PG. Disorders of red cell volume regulation. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(3):201-7.
32. Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, Auriemma C, Russo R, De Falco L, et al. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood.* 2013;121(19):3925-35.
33. Glogowska E, Lezon-Geyda K, Maksimova Y, Schulz VP, Gallagher PG. Mutations in the Gardos Channel (KCCN4) are associated with hereditary xerocytosis. *Blood.* 2015;126(11):1281-4.
34. Grootenboer S, Schischmanoff PO, Laurendau I, et al. Pleiotropic syndrome of dehydrated hereditary stomatocytosis, pseudohyperkalemia, and perinatal edema maps to 16q23-q24. *Blood.* 2000;96(7):2599-605.
35. Bruce LJ. Hereditary stomatocytosis and cation-leaky red cells: recent developments. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;42(3):216-22.

36. Bruce LJ, Guizouarn H, Burton NM, Gabillat N, Poole J, Flat JF, et al. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from aminoacid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood*. 2009;113(6):1350-7.
37. Prchal JT, Gregg XT. Red cell enzymes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:19-23.
38. van Solinge WW, van Wijk R. Disorders of red cells resulting from enzyme abnormalities. En: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology*. Eighth. McGraw-Hill Medical Publishing; 2010. p. 647–74.
39. Koralkova P, Van Solinge WW, Van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia – pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol*. 2014;36:388-97.
40. Coutinho R, Bento C, Almeida H, et al. Complex inheritance of chronic haemolytic anaemia. *British Journal of Haematology* 2008;144:613-24.
41. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G. Pyruvate Kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 2007;21(4):217-31.
42. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Reviews* 2007;21:267-83.
43. Iolascon A, Russoa R, Delaunay J. Congenital dyserythropoietic anemias. *Curr Opin Hematol*. 2011;18:146-51.
44. Iolascon A, Esposito MR, Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica*. 2012;97:1786-94.
45. Iolascon A, Heimpel H, Wahlin A, Tamary H. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. *Blood*. 2013;122(13):2162-6.
46. Camaschella C, Nai A. Ineffective erythropoiesis and regulation of iron status in iron loading anaemias. *Br J Haematol*. 2016;172(4):512-23.

47. Shenkman B, Einav Y. Thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathic hemolytic anemias: diagnosis and classification. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4-5):584-6.
48. Mariotte E, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura: from diagnosis to therapy. *Curr Opin Crit Care.* 2015;21(6):593-601.
49. Lotta L, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F. ADAMTS13 Mutations and Polymorphisms in Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hum Mutat.* 2010;31:11-9.
50. Trachtman H. HUS and TTP in Children. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(6):1513-26.
51. Cataland SR, Wu HM. Atypical hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: clinically differentiating the thrombotic microangiopathies. *Eur J Intern Med.* 2013;24(6):486-91.
52. Franchini M. Atypical hemolytic uremic syndrome: from diagnosis to treatment. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(11):1679-88.
53. Campistol J, Arias M, Ariceta G, Blasco M, Espinosa M, Grinyó J, et al. An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia.* 2015;35:421-47.
54. Bernabéu-Herrero ME, Jiménez-Alcázar M, Anter J, Pinto S, Sánchez Chinchilla D, Garrido S, et al. Complement factor H, FHR-3 and FHR-1 variants associate in an extended haplotype conferring increased risk of atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol.* 2015;67(2 Pt B):276-86.
55. Lemaire M, Frémeaux-Bacchi V, Schaefer F, Choi M, Tang WH, Le Quintrec M, et al. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet.* 2013;45(5):531-6.
56. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5463-7.
57. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.
58. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, et al. Next-Generation Sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11(3):333-43.

59. Danielsson K, Jun M, Lordemann A, Mao J, Lin C. Next-Generation Sequencing applied to rare diseases genomics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(4):469-87.
60. Zhang J, Barbaro P, Guo Y, Alodaib A, Li J, Gold W, et al. Utility of next-generation sequencing technologies for the efficient genetic resolution of haematological disorders. *Clin Genet.* 2016;89(2):163-72.
61. Koning T, Jongbloed J, Sikkema-Raddatz B, Sinke R. Targeted next-generation sequencing panels for monogenic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(1):61-70.
62. Lemke JR, Riesch E, Scheurenbrand T, Schubach M, Wilhelm C, Steiner I, et al. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia.* 2012;53(8):1387-98.
63. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 2013;34(7):1035-42.
64. Sivakumaran TA, Husami A, Kissell D, et al. Performance evaluation of the next-generation sequencing approach for molecular diagnosis of hereditary hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;148:1007-16.
65. Trujillano D, Ramos MD, González J, et al. Next generation diagnostics of cystic fibrosis and CFTR-related disorders by targeted multiplex high-coverage resequencing of CFTR. *J Med Genet.* 2013;50:455-62.
66. Trujillano D, Perez B, González J, et al. Accurate molecular diagnosis of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemias using high-throughput targeted sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:528-34.
67. Ameziane N, Sie D, Dentro S, Ariyurek Y, Kerkhoven L, Joenje H, et al. Diagnosis of fanconi anemia: mutation analysis by next-generation sequencing. *Anemia.* 2012;2012:132856.
68. Gerrard G, Valgañón M, Foong HE, Kasperaviciute D, Iskander D, Game L, et al. Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2013;162(4):530-6.

69. Sambrook J RD. Molecular cloning: A laboratory manual. 3 ed. USA: CSHL Press; 2001. 4–12p.
70. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt B): 1284-90.
71. Jaffray JA, Mitchell WB, Gnanapragasam MN, Seshan SV, Guo X, Westhoff CM, et al. Erythroid transcription factor EKLF/KLF1 mutation causing congenital dyserythropoietic anemia type IV in a patient of Taiwanese origin: review of all reported cases and development of a clinical diagnostic paradigm. *Blood Cells Mol Dis*. 2013;51(2):71-5.
72. Punzo F, Bertoli-Avella AM, Scianguetta S, Della Ragione F, Casale M, Ronzoni L, et al. Congenital dyserythropoietic anemia type II: molecular analysis and expression of the SEC23B gene. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:89.
73. Russo R, Esposito MR, Asci R, Gambale A, Perrotta S, Ramenghi U, et al. Mutational spectrum in congenital dyserythropoietic anemia type II: identification of 19 novel variants in SEC23B gene. *Am J Hematol*. 2010;85(12):915-20.
74. Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus*. 2011;9(3):274-7.
75. King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(3):237-43.
76. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:60.
77. Manco L, Ribeiro ML. Novel human pathological mutations: gene symbol: PKLR. Disease: pyruvate kinase deficiency. *Hum Genet*. 2009;125(3):340.
78. Martinov MV, Plotnikov AG, Vitvitsky VM, Ataullakhanov FI. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1474(1):75-87.
79. Orosz F, Olah J, Ovadi J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into a enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(12):1168-74.

80. Spiegel R, Gomez EA, Akman HO, Krishna S, Horovitz Y, DiMauro S. Myopathic form of phosphoglycerate kinase (PGK) deficiency: a new case and pathogenic considerations. *Neromuscul Disord*. 2009;19(3):207-11.
81. Krawitz PM, Höchsmann B, Murakami Y, Teubner B, Krüger U, Klopocki E, et al. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood*. 2013;122(7):1312-5.
82. Johnston JJ, Gropman AL, Sapp JC, Teer JK, Martin JM, Liu CF, et al. The phenotype of a germline mutation in PIGA: the gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hum Genet*. 2012;90(2):295-300.
83. Kavanagh D, Goodship TH. Atypical hemolytic uremic syndrome, genetic basis, and clinical manifestations. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:15-20.
84. Papasavva T, van Ijcken WF, Kockx CE, van den Hout MC, Kountouris P, Kythreotis L, et al. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to β -thalassaemia. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(12):1403-10.
85. Campistol JM, Arias M, Ariceta G, Blasco M, Espinosa M, Grinyó JM, et al. An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia*. 2013;33(1):27-45.
86. Shooter C, Rooks H, Lay S, Clark B. Next Generation Sequencing Identifies a Novel Rearrangement in the HBB Cluster Permitting to-the-Base Characterization. *Hum Mutat*. 2015;36:142-50.
87. Laurence J. Atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS): making the diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2012;10(10 Suppl 17):1-12.
88. An X, Debnath G, Guo X, Liu S, Lux SE, Baines A, et al. Identification and functional characterization of protein 4.1R and actin-binding sites in erythrocyte beta spectrin: regulation of the interactions by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biochemistry*. 2005;44:10681-8.
89. Christensen RD, Nussenzveig RH, Reading NS, Agarwal AM, Prchal JT, Yaish HM. Variations in both α -spectrin (SPTA1) and β -spectrin (SPTB) in a neonate with prolonged jaundice in a family where nine individuals had hereditary elliptocytosis. *Neonatology*. 2014;105(1):1-4

90. Nafa K, Reghis A, Osmani N, Baghli L, Benabadji M, Kaplan JC, et al. G6PD Aures: a new mutation (48 Ile-->Thr) causing mild G6PD deficiency is associated with favism. *Hum Mol Genet.* 1993;2(1):81-2.
91. Kordes U, Richter A, Santer R, Sch€afer H, Singer D, Sonntag J, et al. Neonatal cholestasis and glucose - 6 - P -dehydrogenase deficiency. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54:758–60.
92. Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, de la Hoz AB, Aragües P, Garcia-Ruiz JC, Arrieta A, et al. Severe neonatal jaundice due to a de novo glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient mutation. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(2):e27-9.
93. Zanella A, Bianchi P, Fermo E, Valentini G. Hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Br J Haematol.* 2006;133(2):113-23.
94. Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz Rastrollo AB, García-Orad A, Gonzalez Vallejo I, Bento C, et al. Hereditary xerocytosis, a misleading anemia. *Ann Hematol.* 2016;95(9):1545-6.
95. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 2001;413(6855):488-94.
96. Lotta LA, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F. ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Mutat.* 2010;31(1):11-9.
97. Beutler E, Kuhl W. Linkage between a PvuII restriction fragment length polymorphism and G6PD A- (202A/376G): evidence for a single origin of the common G6PD A- mutation. *Hum Genet.* 1990;85:9-11.
98. Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz AB, García-Orad Á, Tejada MI, Garcia-Ruiz JC, et al. Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing. *Int J Lab Hematol.* 2016; Jul 17. doi: 10.1111/ijlh.12551. [Epub ahead of print].
99. Andolfo I, Russo R, Manna F, Shmukler BE, Gambale A, Vitiello G, et al. Novel Gardos channel mutations linked to dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis). *Am J Hematol.* 2015;90(10):921-6.

100. Arashiki N, Takakuwa Y, Mohandas N, Hale J, Yoshida K, Ogura H, et al. ATP11C is a major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia. *Haematologica*. 2016;101(5):559-65.
101. Agarwal AM, Nussenzveig RH, Reading NS, Patel JL, Sangle N, Salama ME, et al. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias. *Br J Haematol*. 2016;174(5):806-14.
102. Roy NB, Wilson EA, Henderson S, Wray K, Babbs C, Okoli S, et al. A novel 33-Gene targeted resequencing panel provides accurate, clinical-grade diagnosis and improves patient management for rare inherited anaemias. *Br J Haematol*. 2016;175(2):318-30.
103. Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics*. 2014;11(4):699-707.
104. Singh R, Luthra R, Routbort M, Patel K, Medeiros J. Implementation of next generation sequencing in clinical molecular diagnostic laboratories: advantages, challenges and potential. *Expert Rev Precis Med Drug Dev*. 2016;1(1):109-20.

ANEXOS

Tabla anexa 1. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen C3
(Complement component 3; 19:6677715-6730573).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
735607	6677840	6678039	2	199	1.000
446891	6678157	6678303	2	146	1.000
446897	6678377	6678471	1	94	1.000
446900	6679130	6679224	2	94	1.000
446916	6679412	6679512	1	100	1.000
446893	6680163	6680279	1	116	1.000
446906	6681946	6682046	2	100	1.000
446903	6682147	6682245	1	98	1.000
446913	6684393	6684455	2	62	1.000
446887	6684565	6684666	2	101	1.000
446896	6684780	6684850	1	70	1.000
446910	6684993	6685162	1	169	1.000
446908	6686129	6686303	1	174	1.000
446899	6686751	6686918	1	167	1.000
446911	6690634	6690743	1	109	1.000
446904	6692929	6693099	1	170	1.000
446918	6693417	6693503	2	86	1.000
446885	6694436	6694650	1	214	1.000
446919	6696384	6696481	1	97	1.000
446923	6696598	6696675	2	77	1.000
446921	6697349	6697572	2	223	1.000
446917	6697657	6697810	2	153	1.000
446888	6702132	6702228	1	96	1.000
446895	6702476	6702595	1	119	1.000
446924	6707081	6707289	2	208	1.000
446920	6707471	6707553	2	82	1.000
446894	6707805	6707945	1	140	1.000
446925	6709689	6709858	2	169	1.000
446901	6710644	6710861	3	217	1.000
446922	6710992	6711212	3	220	1.000
446886	6712262	6712422	2	160	1.000
446902	6712513	6712639	2	126	1.000
446898	6713194	6713331	2	137	1.000
446907	6713412	6713525	2	113	1.000
446909	6713997	6714098	2	101	1.000
446912	6714171	6714264	2	93	1.000
446889	6714357	6714462	2	105	1.000
446915	6718099	6718180	2	81	1.000
446890	6718252	6718428	2	137	0.778
446892	6719216	6719419	1	203	1.000
735606	6720521	6720667	1	146	1.000

Tabla anexa 2. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *TPI* (Triosephosphate isomerase 1; 12:6976283-6980112).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
449954	6976578	6976850	2	272	1.000
449955	6976687	6976850	2	163	1.000
1399414	6977272	6977678	2	406	1.000
449951	6978022	6978156	1	134	1.000
449953	6978257	6978352	1	95	1.000
449956	6978416	6978559	1	143	1.000
449957	6978846	6978942	1	96	1.000
449950	6979207	6979305	1	98	1.000
449952	6979423	6980115	3	692	1.000

Tabla anexa 3. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *KLF1* (Kruppel-like factor 1; 19:12995237-12997995).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
984178	12995231	12995879	3	648	1.000
900790	12996125	12996961	4	836	0.998
984177	12997862	12998022	1	160	1.000

Tabla anexa 4. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *PIGA* (Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A; X:15337573-15353676).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1399426	15337567	15339899	10	2332	1.000
1053109	15342781	15342998	1	217	1.000
1053113	15343136	15343279	1	143	1.000
1053112	15344030	15344173	1	143	1.000
1399428	15349990	15350119	1	129	1.000
1399424	15349706	15350119	2	413	1.000
1399427	15349332	15350119	4	787	1.000
1399425	15353617	15353681	1	64	1.000

Tabla anexa 5. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *SEC23B* (Sec23 homolog B; 20:18488137-18542059).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
984182	18488182	18488318	1	136	1.000
984186	18488182	18488621	3	439	1.000
984181	18488182	18488639	3	457	1.000
984184	18488204	18488639	3	435	1.000
984185	18488601	18488946	3	345	1.000
984180	18491460	18491705	2	245	1.000
481915	18492863	18492931	1	68	1.000
481926	18496288	18496385	1	97	1.000
481934	18505125	18505318	1	193	1.000
481921	18505071	18505318	1	247	1.000
481927	18505573	18505669	1	96	1.000
481925	18506426	18506581	1	155	1.000
481932	18507011	18507180	1	169	1.000
481920	18508134	18508260	1	126	1.000
481933	18511318	18511452	1	134	1.000
481924	18513302	18513393	1	91	1.000
481919	18516291	18516391	1	100	1.000
481923	18522934	18523051	1	117	1.000
481922	18523657	18523821	1	164	1.000
481918	18526594	18526682	1	88	1.000
481930	18529247	18529419	1	172	1.000
481928	18531727	18531824	1	97	1.000
481929	18534873	18535039	1	166	1.000
481931	18535746	18535822	1	76	1.000
984183	18541289	18542055	3	766	1.000
984179	18541289	18542064	3	775	1.000

Tabla anexa 6. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *THBD* (Thrombomodulin; 20:23026270-23030378).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
444627	23026264	23030306	15	4042	1.000

Tabla anexa 7. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *EPB41* (Erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked); 1:29213603-29446553).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1169122	29213597	29213727	2	130	1.000
1169123	29241082	29241285	2	203	1.000
1169120	29313954	29314422	2	468	1.000
1169125	29313937	29314422	2	485	1.000
1169119	29315862	29315952	1	90	1.000
744811	29319836	29320059	1	223	1.000
744814	29323721	29323836	1	115	1.000
744817	29338371	29338424	1	53	1.000
744812	29342198	29342284	1	86	1.000
744804	29344730	29344959	1	229	1.000
744800	29356906	29357004	1	98	1.000
744806	29359599	29359762	1	163	1.000
744805	29362332	29362440	1	108	1.000
744808	29365760	29365943	1	183	1.000
744803	29379610	29379829	1	219	1.000
744815	29385095	29385162	1	67	1.000
744798	29385317	29385369	1	52	1.000
744802	29386928	29387001	1	73	1.000
744797	29391488	29391675	1	187	1.000
1169121	29391488	29391738	1	250	1.000
744810	29424313	29424452	1	139	1.000
744807	29435842	29435954	1	112	1.000
744813	29438874	29438965	1	91	1.000
1169118	29442205	29442320	1	115	1.000
1169124	29443325	29446563	11	3238	0.8814

Tabla anexa 8. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *ALDOA* (Aldolase A, fructose-bisphosphate; 16:30064411-30081778).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
509301	30064405	30064543	1	138	1.000
509295	30064779	30064825	1	46	1.000
509291	30066099	30066253	1	154	1.000
509297	30066487	30066653	1	166	1.000
509300	30075044	30075574	3	530	1.000
509298	30075594	30075831	2	237	1.000
509293	30075739	30075831	1	92	1.000
509294	30075812	30076110	2	298	1.000
509299	30076988	30077253	2	265	1.000
509292	30078200	30078364	1	164	1.000
481643	30078549	30078692	2	143	1.000
481640	30078765	30078987	1	222	0.545
481638	30079961	30080026	1	65	1.000
481637	30080133	30080304	1	171	1.000
481639	30080621	30080715	1	94	1.000
481636	30080814	30080999	2	185	1.000
481634	30081145	30081355	1	210	1.000
509296	30081432	30081746	1	314	1.000

Tabla anexa 9. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *CFB*
(Complement factor B; 6:31895475-31919861)

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
735609	31913715	31914067	3	352	1.000
432043	31914144	31914388	2	244	1.000
432032	31914778	31914974	1	196	1.000
432044	31915119	31915303	1	184	1.000
432034	31915513	31915625	1	112	1.000
432045	31915716	31915863	2	147	1.000
432039	31916145	31916294	1	149	1.000
432042	31916601	31916743	1	142	1.000
432038	31917014	31917126	2	112	1.000
432031	31917191	31917339	2	148	1.000
432041	31917821	31917929	2	108	1.000
432029	31918057	31918185	1	128	1.000
432036	31918390	31918554	2	164	1.000
432033	31918639	31918726	1	87	1.000
432037	31918915	31919026	1	111	1.000
432040	31919112	31919255	3	143	1.000
432035	31919326	31919386	2	60	1.000
735608	31919646	31919866	1	220	1.000

Tabla anexa 10. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *NT5C3A* (5,-nucleotidase, cytosolic IIIA; 7:33053742-33102409).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1399423	33053719	33054448	3	729	1.000
449934	33055276	33055487	1	211	1.000
449943	33057045	33057218	2	173	1.000
449937	33059241	33059341	1	100	1.000
449933	33060878	33060974	1	96	1.000
449942	33061659	33061716	1	57	1.000
449944	33063645	33063725	1	80	1.000
449945	33066423	33066532	1	109	1.000
449940	33069235	33069331	2	96	1.000
449941	33075540	33075605	1	65	1.000
1399422	33080478	33080782	1	304	1.000
449935	33102174	33102414	3	240	1.000

Tabla anexa 11. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *GSS* (Glutathione synthetase; 20:33516236-33543620).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
748268	33516230	33516759	2	529	1.000
710335	33517198	33517398	1	200	1.000
710336	33519133	33519225	1	92	1.000
710330	33519736	33519941	1	205	1.000
710327	33523373	33523450	1	77	1.000
710337	33524560	33524648	2	88	1.000
710334	33524740	33524831	2	91	1.000
710331	33529510	33529637	1	127	1.000
710332	33530285	33530435	1	150	1.000
710333	33530728	33530814	1	86	1.000
710338	33533750	33533906	1	156	1.000
748269	33539521	33539668	1	147	1.000
748267	33543524	33543606	1	82	1.000

Tabla anexa 12. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen ANK1 (Ankyrin 1, erythrocytic; 8:41510739-41754280).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1282701	41510738	41513277	11	2539	1.000
1282702	41518942	41519087	1	145	1.000
741898	41519313	41519464	1	151	1.000
741919	41519388	41519464	1	76	1.000
741928	41521171	41521265	1	94	1.000
1282699	41522317	41522809	3	492	1.000
741902	41525779	41526087	2	308	1.000
741891	41529866	41529949	1	83	1.000
741886	41529866	41530435	3	569	1.000
741903	41542056	41542213	1	157	1.000
741887	41543664	41543806	1	142	1.000
741909	41545668	41545753	1	85	1.000
741888	41546023	41546112	1	89	1.000
741890	41547739	41547869	1	130	1.000
741904	41547986	41548122	1	136	1.000
741894	41550160	41550399	2	239	1.000
741915	41550617	41550724	1	107	1.000
741930	41551410	41551625	2	215	1.000
741913	41552104	41552326	2	222	1.000
741901	41552689	41552854	1	165	1.000
741923	41553875	41554110	2	235	1.000
741911	41554188	41554296	1	108	1.000
741931	41555555	41555644	1	89	1.000
741893	41556964	41557071	2	107	1.000
741918	41557943	41557977	1	34	1.000
741907	41559062	41559145	1	83	1.000
741926	41559564	41559667	2	103	1.000
741917	41561553	41561662	1	109	1.000
741922	41561886	41561995	1	109	1.000
741921	41563655	41563764	1	109	1.000
741916	41566290	41566498	1	208	1.000
741933	41571668	41571777	1	109	1.000
741914	41572488	41572597	1	109	1.000
741896	41573164	41573372	1	208	1.000
741895	41574465	41574574	1	109	1.000
741924	41575116	41575225	1	109	1.000
741925	41575618	41575727	1	109	1.000
741912	41577173	41577381	1	208	1.000
741905	41580637	41580746	1	109	1.000
741929	41581047	41581156	1	109	1.000
741910	41581968	41582077	1	109	1.000

Continuación tabla anexa 12. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *ANK1* (Ankyrin 1, erythrocytic; 8:41510739-41754280).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
741892	41584762	41584871	1	109	1.000
741900	41585420	41585529	1	109	1.000
741932	41591483	41591592	1	109	1.000
741920	41615548	41615660	1	112	1.000
1282698	41655024	41655145	1	121	1.000
1282700	41753867	41754285	1	418	0.234

Tabla anexa 13. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *SLC4A1* (Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1 (Diego blood group); 17:42325753-42345509).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
465985	42325752	42327911	9	2159	0.9180
465976	42328521	42328705	2	184	1.000
465973	42328781	42328961	2	180	1.000
465971	42330480	42330744	2	264	1.000
465970	42331858	42332035	1	177	1.000
465986	42332569	42332669	1	100	1.000
465977	42333035	42333219	1	184	1.000
465967	42334712	42334917	2	205	1.000
465982	42335021	42335180	1	159	1.000
465981	42335348	42335553	1	205	1.000
465980	42335775	42335996	2	221	1.000
465975	42336525	42336717	2	192	1.000
465969	42336859	42336954	2	95	1.000
465974	42337171	42337305	1	134	1.000
465972	42337766	42337912	1	146	1.000
465984	42337997	42338188	1	191	1.000
465979	42338937	42339009	1	72	1.000
465983	42339998	42340099	1	101	1.000
465968	42340214	42340307	1	93	1.000
465978	42345416	42345507	1	91	1.000

Tabla anexa 14. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *CDAN1* (Codanin 1; 15:43015757-43029324).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
984188	43015754	43016819	4	1065	1.000
744882	43017336	43017454	1	118	1.000
744860	43017681	43017873	1	192	1.000
744874	43018289	43018363	1	74	1.000
744879	43018502	43018620	1	118	1.000
744881	43019813	43019972	2	159	1.000
744871	43020147	43020236	2	89	1.000
744873	43020396	43020470	1	74	1.000
744885	43020844	43021013	1	169	1.000
744862	43021215	43021329	2	114	1.000
744863	43021421	43021565	2	144	1.000
744865	43021760	43021825	1	65	1.000
744877	43021988	43022088	1	100	1.000
744869	43022320	43022418	1	98	1.000
744867	43022790	43022967	1	177	1.000
744878	43023117	43023274	1	157	1.000
744859	43023403	43023534	1	131	1.000
744864	43023812	43024028	1	216	1.000
744872	43024525	43024611	1	86	1.000
744880	43025289	43025389	1	100	1.000
744870	43026130	43026250	1	120	1.000
744866	43026418	43026549	1	131	1.000
744876	43027292	43027381	2	89	1.000
744868	43027453	43027577	2	124	1.000
744884	43027702	43027882	1	180	1.000
744875	43028067	43028281	2	214	1.000
744858	43028494	43028983	3	489	1.000
984187	43029205	43029422	1	217	1.000

Tabla anexa 15. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *EPB42* (Erythrocyte membrane protein band 4.2; 15:43398423-43513481).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1282704	43489420	43489667	1	247	1.000
744829	43494036	43494180	1	144	1.000
744828	43495307	43495478	1	171	1.000
744823	43498522	43498832	2	310	1.000
744830	43499391	43499644	1	253	1.000
744821	43500422	43500536	1	114	1.000
744822	43500829	43500978	1	149	1.000
744824	43501466	43501654	1	188	1.000
744826	43502527	43502642	1	115	1.000
744820	43503608	43503737	1	129	1.000
744819	43507287	43507531	2	244	1.000
744827	43508460	43508656	1	196	1.000
1282703	43513008	43513328	2	320	1.000
1282705	43512918	43513328	2	410	1.000

Tabla anexa 16. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *PIGT* (Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T; 20:44044717-44054884).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1399430	44044701	44044988	2	287	1.000
1271819	44045151	44045299	2	148	1.000
1271811	44045151	44045339	2	188	1.000
1271807	44047486	44047624	1	138	1.000
1271810	44047929	44048040	2	111	1.000
1399429	44048107	44048235	2	128	1.000
1271809	44048138	44048235	1	97	1.000
1271813	44048770	44048868	2	98	1.000
1271808	44048966	44049074	1	108	1.000
1271812	44049162	44049338	2	176	1.000
1271818	44050017	44050228	1	211	1.000
1271814	44052850	44053026	2	176	1.000
1271817	44053130	44053224	1	94	1.000
1399431	44054208	44054890	4	682	1.000

Tabla anexa 17. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *GATA1* (GATA binding protein 1; X:48644962-48652716).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
467942	48644976	48645058	1	82	1.000
467944	48649492	48649741	1	249	1.000
439249	48650245	48650633	2	388	1.000
439246	48650724	48650880	1	156	1.000
439248	48651573	48651709	1	136	1.000
467943	48652194	48652722	2	528	0.777

Tabla anexa 18. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *DGKE* (Diacylglycerol kinase, epsilon 64kDa; 17:54911460-54946036).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1149840	54911454	54911626	1	172	0.959
1149841	54912133	54912625	3	492	1.000
585193	54921374	54921544	2	170	1.000
585201	54923045	54923175	1	130	1.000
585197	54925277	54925431	1	154	1.000
585196	54926051	54926219	1	168	1.000
585194	54926536	54926598	1	62	1.000
585192	54933867	54933991	1	124	1.000
585199	54935949	54936031	1	82	1.000
585195	54939146	54939284	1	138	1.000
585202	54939495	54939617	1	122	1.000
1149842	54939967	54946041	23	6074	0.919

Tabla anexa 19. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *PFKFB1* (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1; X:54959394-55024967)

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1399415	54959561	54959900	2	339	1.000
1140415	54960248	54960323	1	75	1.000
1140411	54961374	54961447	1	73	1.000
1140413	54964022	54964162	1	140	1.000
1140409	54971866	54971981	1	115	1.000
1140407	54975502	54975659	1	157	1.000
1140406	54978332	54978550	2	218	1.000
1140417	54982580	54982712	1	132	1.000
1140410	54984733	54984800	1	67	1.000
1140421	54985278	54985363	1	85	1.000
1140416	54986254	54986331	1	77	1.000
1140418	54987251	54987289	1	38	1.000
1140419	54987251	54987355	1	104	1.000
1140412	54989684	54989820	1	136	1.000
1399417	55020338	55020516	1	178	1.000
1399416	55024833	55024972	1	139	1.000

Tabla anexa 20. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *SPTB* (Spectrin, beta, erythrocytic; 14:65213002-65346601).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
466130	65212995	65216196	15	3201	0.985
466122	65216366	65216419	1	53	1.000
466100	65216693	65216877	1	184	1.000
466112	65220249	65220516	1	267	1.000
466124	65233111	65233524	2	413	1.000
466131	65233438	65233524	1	86	1.000
466106	65234015	65234075	1	60	1.000
466110	65234375	65234582	1	207	1.000
466132	65235746	65235841	1	95	1.000
466115	65236302	65236451	1	149	1.000
466111	65237597	65237852	2	255	1.000
466107	65239292	65239677	2	385	1.000
466121	65239932	65240147	1	215	1.000
466135	65241109	65241250	1	141	1.000
466118	65241837	65242126	2	289	1.000
466114	65245869	65245969	2	100	1.000
466134	65246437	65246654	2	217	1.000
466108	65249002	65249276	2	274	1.000
466117	65250959	65251116	1	157	1.000
466102	65252249	65252350	1	101	1.000
466128	65252461	65252674	1	213	1.000
466127	65253116	65253883	3	767	1.000
466120	65258431	65258579	1	148	1.000
466101	65259709	65260590	4	881	0.904
466116	65261179	65261340	1	161	1.000
466126	65262049	65262362	2	313	1.000
466129	65263269	65263438	1	169	1.000
466123	65264441	65264569	1	128	1.000
466109	65266459	65266657	1	198	1.000
466113	65267468	65267591	1	123	1.000
466125	65267997	65268123	1	126	1.000
466105	65268466	65268557	1	91	1.000
466103	65268938	65269040	1	102	1.000
466119	65270319	65270503	2	184	1.000
466133	65271651	65271813	1	162	1.000
466104	65289659	65289871	1	212	1.000

Tabla anexa 21. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *HK1* (Hexokinase 1; 10:71029740-71161638).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
449889	71029750	71029869	1	119	1.000
449890	71042279	71042411	1	132	1.000
449873	71042279	71042465	1	186	1.000
449886	71048421	71048531	1	110	1.000
449887	71055383	71055441	1	58	1.000
449878	71060519	71060622	1	103	1.000
449893	71075604	71075775	2	171	1.000
449881	71078597	71078771	1	174	0.218
449895	71103577	71103750	1	173	1.000
449884	71119647	71119806	1	159	1.000
449880	71124533	71124663	1	130	1.000
449872	71128286	71128392	1	106	1.000
449876	71128987	71129097	1	110	1.000
449885	71129191	71129385	1	194	1.000
449879	71136684	71136850	1	166	1.000
449877	71139612	71139856	1	244	1.000
449875	71142237	71142552	2	315	1.000
449888	71144083	71144242	1	159	1.000
449874	71144546	71144676	1	130	1.000
449871	71146073	71146179	1	106	1.000
449891	71148947	71149057	1	110	1.000
449882	71151875	71152069	2	194	1.000
449883	71154700	71154866	2	166	1.000
449892	71158345	71158589	2	244	1.000
449894	71160741	71161642	4	901	1.000

Tabla anexa 22. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *PGK1* (Phosphoglycerate kinase 1; X:77320685-77384793).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
509328	77359660	77359907	2	247	1.000
483747	77365358	77365419	1	61	1.000
483744	77369235	77369401	1	166	1.000
483746	77369507	77369662	1	155	1.000
483750	77372803	77372917	1	114	1.000
483754	77373542	77373672	1	130	1.000
483748	77378326	77378451	1	125	1.000
483752	77378686	77378876	1	190	1.000
483751	77380365	77380553	1	188	1.000
483753	77380818	77380927	1	109	1.000
509327	77381281	77382329	4	1048	1.000

Tabla anexa 23. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *PIEZO1* (Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1; 16:88781751-88851619).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
466061	88781740	88782267	4	527	1.000
466053	88782335	88782532	1	197	0.198
466072	88782600	88782690	2	90	1.000
466066	88782763	88782896	2	133	1.000
466071	88782961	88783144	3	183	1.000
466087	88783208	88783311	1	103	1.000
466078	88783425	88783624	1	199	1.000
466084	88785976	88786134	2	158	1.000
466074	88786204	88786373	3	169	1.000
466063	88786471	88786696	2	225	1.000
466086	88786787	88786945	2	158	1.000
466094	88787018	88787161	2	143	1.000
466090	88787568	88787843	2	275	1.000
466076	88787940	88788139	2	199	1.000
466089	88788210	88788479	2	269	1.000
466065	88788620	88788810	2	190	1.000
466058	88788985	88789102	2	117	1.000
466099	88789239	88789422	3	183	1.000
466059	88789497	88789564	1	67	1.000
466060	88789628	88789741	1	113	1.000
466062	88790273	88790384	1	111	1.000
466098	88791411	88791493	1	82	1.000
466055	88791818	88791932	2	114	1.000
466054	88791997	88792097	2	100	1.000
466056	88792686	88792868	2	182	1.000
466070	88792949	88793056	2	107	1.000
466097	88793117	88793371	3	254	1.000
466082	88793441	88793605	2	164	1.000
466067	88793959	88794074	1	115	1.000
466051	88798108	88798323	2	215	1.000
466050	88798737	88798948	2	211	1.000
466080	88799009	88799145	2	136	1.000
466049	88799680	88799867	3	187	1.000
466085	88799990	88800158	2	168	0.970
466075	88800308	88800467	1	159	1.000
466088	88800758	88800951	2	193	1.000
466081	88801052	88801211	2	159	1.000
466077	88801277	88801466	2	189	1.000
466079	88801537	88801659	2	122	1.000
466096	88802550	88802821	3	271	1.000

Continuación tabla anexa 23. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *PIEZO1* (Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1; 16:88781751-88851619).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
466091	88803041	88803152	1	111	0.847
466057	88803961	88804059	1	98	1.000
466052	88804130	88804227	2	97	1.000
466093	88804336	88804518	1	182	1.000
466092	88804629	88804853	2	224	1.000
466068	88804970	88805149	2	179	1.000
466069	88807880	88808029	1	149	1.000
466083	88808455	88808508	1	53	1.000
466073	88808702	88808835	1	133	1.000
466095	88815786	88815892	1	106	1.000
466064	88851303	88851377	0	74	0.000

Tabla anexa 24. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *CFI* (Complement factor I; 4:110661852-110723335).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
446978	110661842	110662271	2	429	1.000
446976	110663641	110663756	1	115	1.000
446977	110667372	110667663	2	291	1.000
446979	110670368	110670482	1	114	1.000
446980	110670649	110670763	1	114	1.000
446981	110673618	110673664	1	46	1.000
446970	110678913	110678944	1	31	1.000
446975	110681420	110681541	1	121	1.000
446971	110681673	110681797	1	124	1.000
446974	110682667	110682853	1	186	1.000
446973	110685687	110685851	1	164	1.000
446972	110687704	110687985	2	281	1.000
446982	110723065	110723340	2	275	1.000

Tabla anexa 25. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *EPB72* (Stomatin (EPB72)-like 1; 9:124101355-124132531).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1282709	124101260	124101924	4	664	1.000
1282711	124101260	124103672	9	2412	0.988
1282712	124101260	124103691	9	2431	0.988
1053326	124110287	124110432	1	145	1.000
1146658	124110359	124110432	1	73	1.000
1053325	124111392	124111606	2	214	1.000
1146656	124111431	124111606	1	175	1.000
1053323	124115492	124115585	1	93	1.000
1053328	124116873	124116956	2	83	1.000
1053324	124118325	124118439	1	114	1.000
1282713	124128388	124128528	1	140	1.000
1282710	124132399	124132587	1	188	1.000

Tabla anexa 26. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *GYPC* (Glycophorin C (Gerbich blood group); 2:127413509-127454246).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1282716	127413505	127413893	2	388	0.964
1282718	127443398	127444226	3	828	1.000
878068	127447825	127447892	1	67	1.000
878066	127451434	127451528	2	94	1.000
1282717	127453516	127454256	4	740	1.000

Tabla anexa 27. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *AK1* (Adenylate kinase 1; 9:130628759-130640022).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1399411	130628753	130630360	6	1607	0.7642
1053165	130630594	130630796	2	202	1.000
1053164	130634096	130634223	1	127	1.000
1053162	130634963	130635137	2	174	1.000
1053163	130635299	130635345	2	46	1.000
1399413	130636884	130636933	1	49	1.000
1399412	130639896	130640027	2	131	0.992

Tabla anexa 28. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *BPGM* (2,3-bisphosphoglycerate mutase; 7:134331560-134364565).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1399418	134331525	134331694	1	169	1.000
1399421	134343094	134343425	2	331	1.000
1399419	134346193	134346865	3	672	1.000
1399420	134363599	134364572	4	973	1.000

Tabla anexa 29. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen ADAMTS13 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13; 9:136279478-136324508).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1310804	136279453	136279769	2	316	1.000
446957	136287114	136287673	3	559	1.000
446952	136288215	136288292	1	77	1.000
446963	136289435	136289603	1	168	1.000
446959	136290643	136290737	1	94	1.000
446948	136291052	136291187	1	135	1.000
446958	136291313	136291470	1	157	1.000
446946	136293748	136293896	2	148	0.892
446951	136295146	136295226	1	80	1.000
446941	136295053	136295226	1	173	1.000
446960	136297703	136297818	1	115	1.000
446945	136298492	136298654	1	162	1.000
446943	136298755	136298829	1	74	1.000
446944	136301943	136302080	1	137	1.000
446950	136302863	136303022	1	159	1.000
446954	136303360	136303491	2	131	1.000
446947	136304481	136304572	1	91	1.000
446966	136305459	136305651	1	192	1.000
446961	136307514	136307660	1	146	1.000
446939	136307729	136307869	2	140	1.000
446967	136308491	136308687	2	196	1.000
446956	136309978	136310178	1	200	1.000
446969	136310814	136310945	1	131	1.000
446962	136313714	136313854	1	140	1.000
446965	136314898	136315091	1	193	1.000
446964	136319531	136319746	2	215	1.000
446940	136320401	136320562	2	161	1.000
446953	136320401	136320730	2	329	0.921
446942	136321185	136321342	2	157	1.000
446955	136321659	136321846	2	187	1.000
446968	136323026	136323221	1	195	1.000
1149843	136324090	136324530	2	440	1.000

Tabla anexa 30. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *GYPA* (Glycophorin A (MNS blood group); 4:145030457-145061904).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1282715	145030450	145032568	8	2118	1.000
815270	145035836	145035925	1	89	1.000
815273	145038001	145038097	1	96	1.000
815274	145039861	145039910	1	49	1.000
815275	145040833	145040939	2	106	1.000
815271	145041637	145041746	1	109	1.000
1282714	145061746	145061909	1	163	1.000

Tabla anexa 31. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *G6PD* (Glucose-6-phosphate dehydrogenase; X:153759606-153775787).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
440344	153760397	153760500	2	103	1.000
440350	153760595	153760682	1	87	0.839
440346	153760776	153761022	2	246	1.000
440351	153761151	153761348	2	197	1.000
440347	153761785	153761889	1	104	1.000
440349	153762244	153762380	1	136	1.000
440343	153762547	153762716	1	169	1.000
440354	153763377	153763605	3	228	1.000
440353	153764146	153764265	2	119	1.000
440348	153764350	153764398	1	48	1.000
440352	153774245	153774383	1	138	1.000
449909	153774998	153775238	2	240	1.000
1218785	153775677	153775806	1	129	1.000

Tabla anexa 32. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *PKLR* (Pyruvate kinase, liver and RBC; 1:155259630-155271225).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
449898	155259078	155260474	5	1396	10.000
449897	155261541	155261733	1	192	1.000
449905	155262962	155263139	1	177	1.000
449907	155263223	155263386	1	163	1.000
449904	155264020	155264181	2	161	1.000
449903	155264267	155264548	3	281	1.000
449900	155264901	155265098	2	197	1.000
449906	155265222	155265364	2	142	1.000
449899	155265450	155265552	1	102	0.167
449902	155269883	155270076	1	193	1.000
449901	155270666	155270797	1	131	1.000
449896	155271081	155271230	1	149	1.000

Tabla anexa 33. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *SPTA1* (Spectrin, alpha, erythrocytic 1; 1:158580496-158656488).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
465989	158580490	158581184	3	694	1.000
466001	158582601	158582756	1	155	1.000
466010	158583505	158583662	1	157	1.000
465993	158584037	158584101	1	64	1.000
466031	158585000	158585198	1	198	1.000
466038	158587321	158587383	1	62	1.000
466022	158587823	158587851	1	28	1.000
466000	158589006	158589129	1	123	1.000
466007	158589954	158590261	1	307	1.000
466011	158592767	158592987	1	220	1.000
466027	158595930	158596017	1	87	1.000
465995	158596623	158596802	1	179	1.000
465994	158597409	158597518	1	109	1.000
466034	158604327	158604470	1	143	1.000
466035	158605697	158605829	1	132	1.000
466009	158606425	158606556	1	131	1.000
466016	158607817	158608036	1	219	1.000
466032	158609366	158609481	1	115	1.000
466033	158609654	158609802	1	148	1.000
466029	158612195	158612337	1	142	1.000
466014	158612598	158612771	1	173	1.000
466006	158613106	158613220	1	114	1.000
465999	158614037	158614191	1	154	1.000
466028	158614972	158615180	2	208	1.000
465991	158615279	158615389	1	110	1.000
466018	158617323	158617515	1	192	1.000
465988	158618293	158618448	1	155	1.000
466008	158619640	158619742	1	102	1.000
466020	158621151	158621263	1	112	1.000
465990	158622251	158622448	1	197	1.000
466023	158623058	158623220	1	162	1.000
466003	158624395	158624543	1	148	1.000
466005	158626348	158626451	1	103	1.000
466015	158627261	158627489	1	228	1.000
466030	158631071	158631204	1	133	1.000
466013	158632486	158632740	1	254	1.000
466004	158636100	158636292	1	192	1.000
466025	158637642	158637857	1	215	1.000
466002	158639192	158639358	1	166	1.000
466036	158639493	158639581	1	88	1.000
465992	158641127	158641248	1	121	1.000

Continuación tabla anexa 33. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *SPTA1* (Spectrin, alpha, erythrocytic 1; 1:158580496-158656488).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
466012	158641843	158641991	1	148	1.000
465987	158644113	158644225	1	112	1.000
466017	158644324	158644470	1	146	1.000
466037	158645925	158646090	1	165	1.000
466026	158647474	158647629	1	155	1.000
465997	158648185	158648329	1	144	1.000
466021	158650367	158650524	1	157	1.000
465998	158651311	158651462	1	151	1.000
465996	158653155	158653291	1	136	1.000
466019	158654892	158655142	1	250	1.000
466024	158656278	158656511	2	233	1.000

Tabla anexa 34. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *CFH* (Complement factor H; 1:196621008-196716634).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
446927	196621002	196621310	2	308	1.000
431971	196642102	196642298	2	196	1.000
431975	196642981	196643097	2	116	1.000
431974	196645113	196645200	1	87	1.000
431983	196646600	196646802	2	202	1.000
431990	196648747	196648928	2	181	1.000
431992	196654188	196654372	2	184	1.000
431976	196658544	196658749	2	205	1.000
431978	196659187	196659374	1	187	1.000
446926	196670442	196670700	2	258	1.000
431987	196682859	196683052	2	193	1.000
431981	196684717	196684904	2	187	1.000
431977	196694245	196694432	1	187	1.000
431985	196695594	196695787	3	193	1.000
431989	196695885	196696075	2	190	1.000
431979	196697470	196697657	2	187	1.000
431973	196705948	196706141	2	193	1.000
431980	196706599	196706795	2	196	1.000
431972	196709743	196709927	1	184	1.000
431986	196710999	196711186	2	187	1.000
431988	196712576	196712763	1	187	1.000
431991	196714941	196715134	1	193	1.000
446928	196716235	196716639	2	404	1.000

Tabla anexa 35. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *CFHR3* (Complement factor H-related 3; 1:196743925-196763203).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1149845	196743924	196744079	1	155	1.000
526569	196748286	196748491	1	205	1.000
526564	196748921	196749108	2	187	1.000
526566	196757340	196757533	1	193	1.000
526568	196759169	196759362	1	193	1.000
1149844	196762441	196763208	4	767	1.000

Tabla anexa 36. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *CFHR1* (Complement factor H-related 1; 1:196788887-196801319).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
583957	196788855	196789037	1	182	1.000
526573	196794601	196794806	2	205	1.000
526575	196795953	196796140	1	187	1.000
526572	196797194	196797381	1	187	1.000
526571	196799624	196799817	1	193	1.000
583958	196800921	196801324	2	403	1.000

Tabla anexa 37. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen *CFHR4* (Complement factor H-related 4; 1:196819371-196888102).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
1149847	196857138	196857343	1	205	1.000
829390	196871542	196871750	2	208	1.000
829396	196871545	196871750	2	205	1.000
829398	196874232	196874425	1	193	1.000
829397	196875985	196876172	1	187	1.000
829395	196876440	196876633	2	193	1.000
829389	196879405	196879613	2	208	1.000
829393	196881864	196882057	1	193	1.000
829388	196883619	196883806	1	187	1.000
829394	196884080	196884273	1	193	1.000
1149846	196887334	196887848	3	514	1.000

Tabla anexa 38. Detalle de las regiones secuenciadas en el gen CD46 (CD46 molecule, complement regulatory protein; 1:207925402-207968858).

Target_ID	Chr_Start	Chr_End	Amplicones	Bases	cobertura
735603	207925377	207925659	2	282	1.000
637267	207930353	207930552	2	199	1.000
637255	207930879	207930992	1	113	1.000
637253	207932978	207933074	1	96	1.000
637266	207934588	207934796	1	208	1.000
637261	207940352	207940545	1	193	1.000
637262	207940946	207941001	2	55	1.000
637265	207941118	207941173	1	55	1.000
637257	207943660	207943712	1	52	1.000
637259	207956631	207956680	1	49	1.000
637263	207958410	207958456	1	46	1.000
637264	207958958	207959032	1	74	1.000
735602	207963592	207963695	1	103	1.000
735604	207966858	207968866	8	2008	1.000

Figura anexa 1. Regiones secuenciadas en el gen CDAN1 (Codanin 1; 15:43015757-43029324:-1).

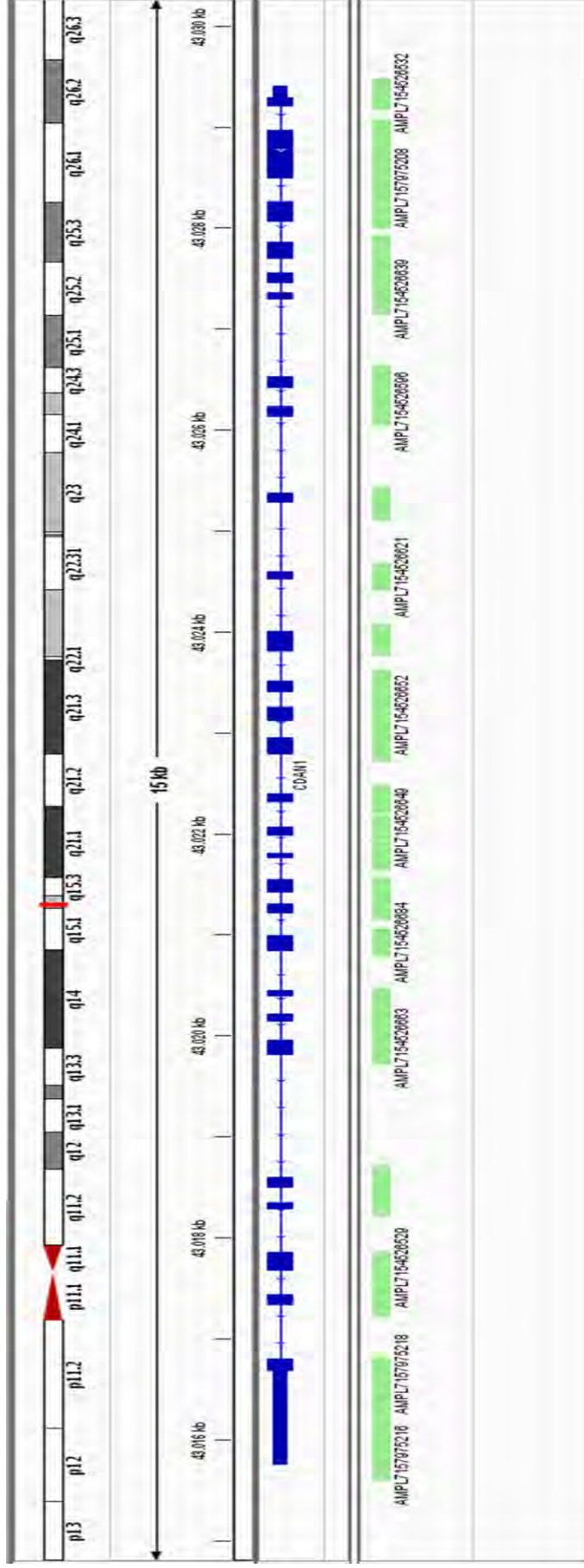


Figura anexa 2. Regiones secuenciadas en el gen SEC23B (Sec23 homolog B; 20:18488137-18542059).

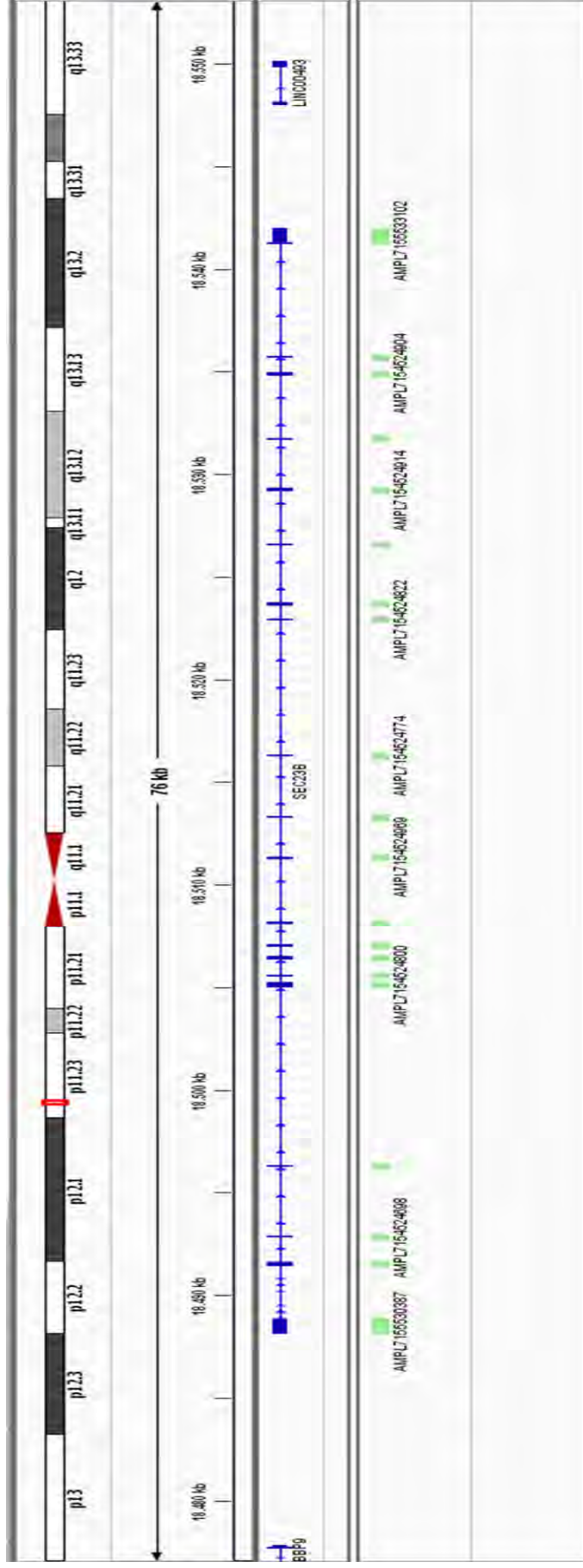


Figura anexa 3. Regiones secuenciadas en el gen *KLF1* (Kruppel-like factor 1; 19:12995237-12997995).

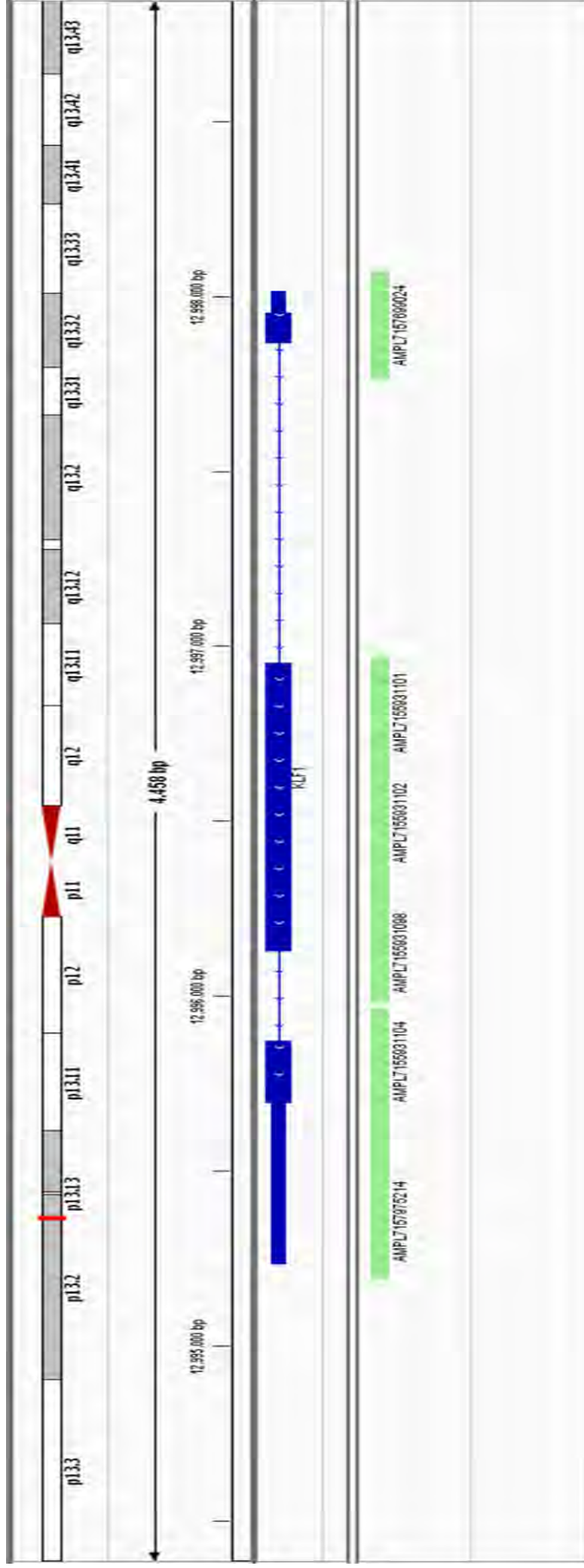


Figura anexa 4. Regiones secuenciadas en el gen GATA1 (GATA binding protein 1; X:48644962-48652716).

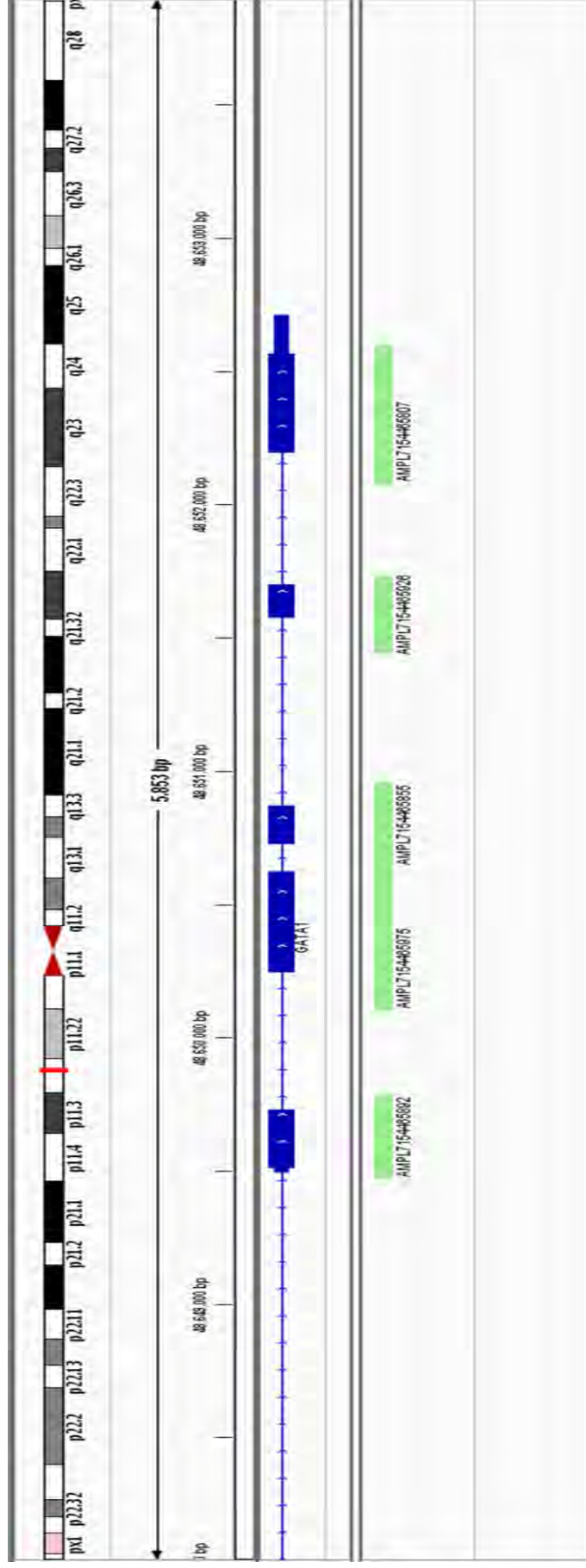


Figura anexa 6. Regiones secuenciadas en el gen *SPTA1* (Spectrin, alpha, erythrocytic 1; 1:158580496-158656488).

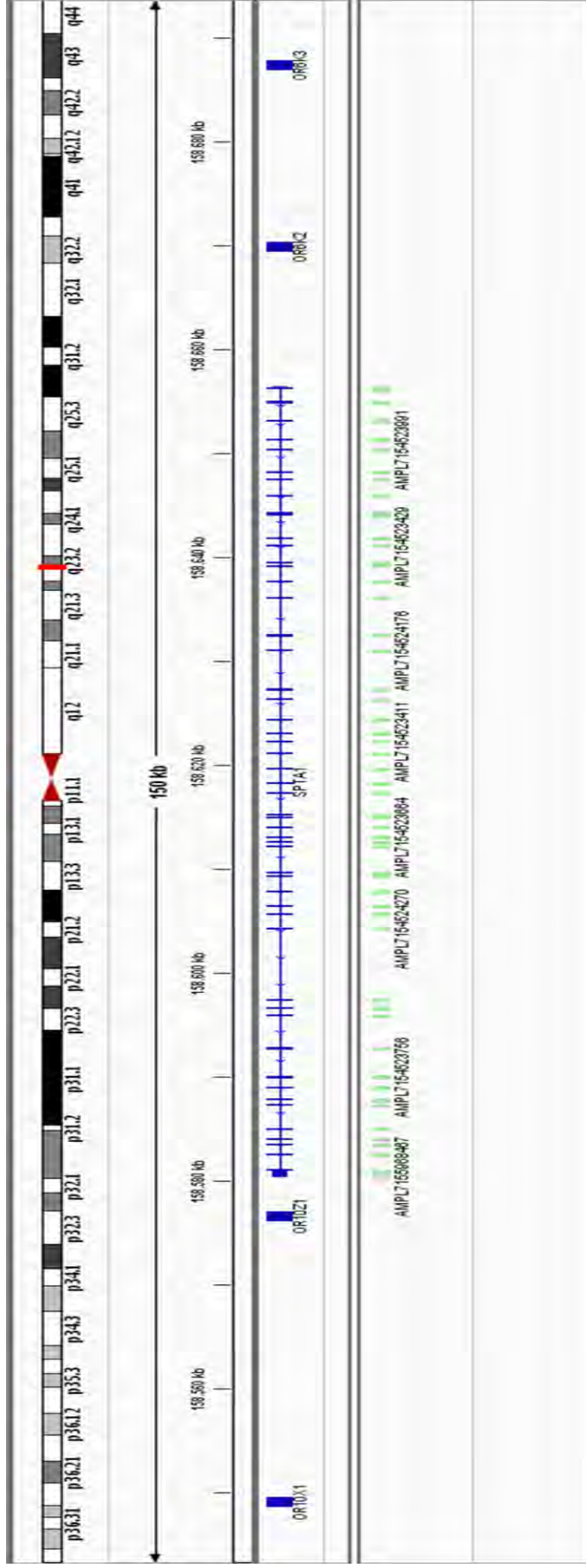


Figura anexa 7. Regiones secuenciadas en el gen SPTB (Spectrin, beta, erythrocytic; 14:65213002-65346601).

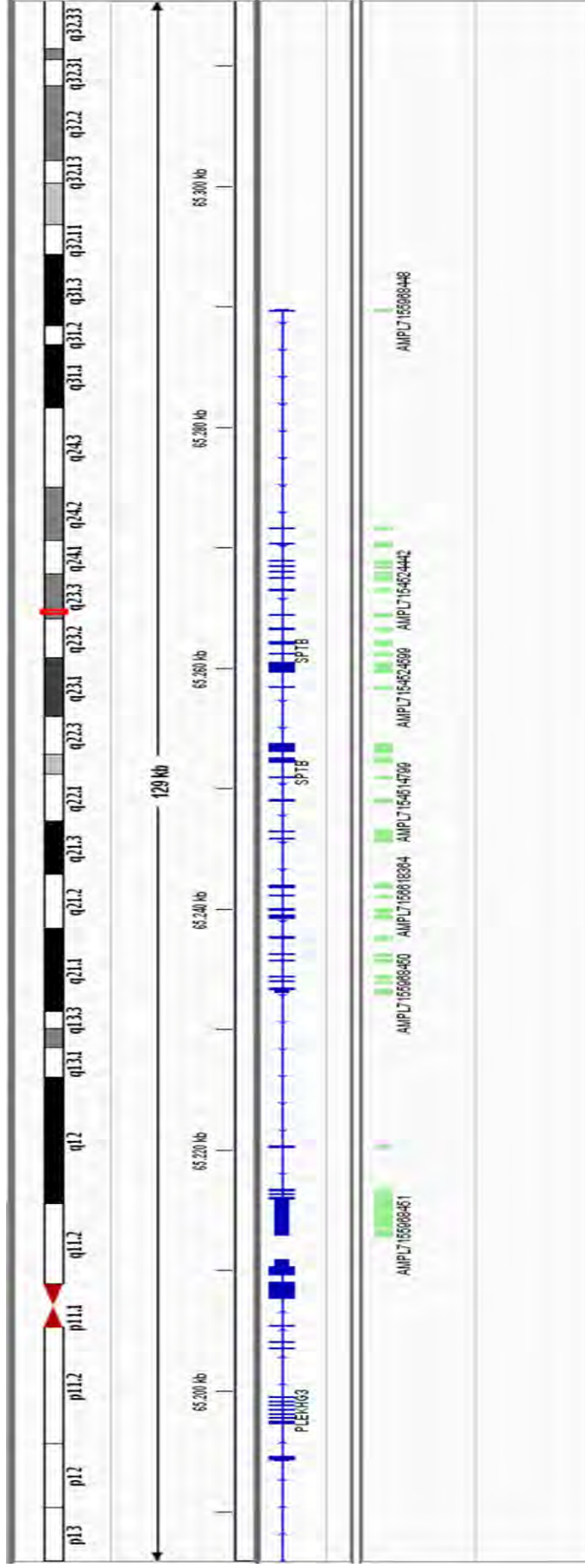


Figura anexa 8. Regiones secuenciadas en el gen ANK1 (Ankyrin 1, erythrocytic; 8:41510739-41754280).

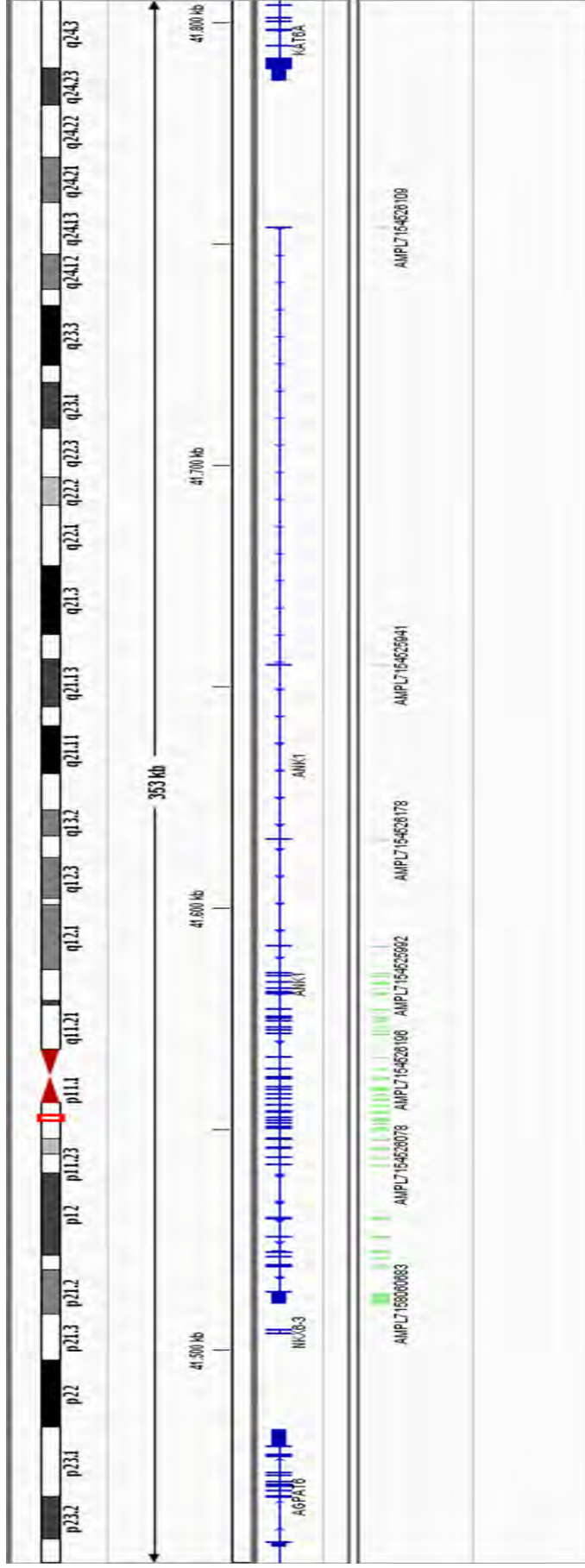


Figura anexa 9. Regiones secuenciadas en el gen *STOM* (Stomatin (EPB72)-like 1; 15:74275561-74278841).

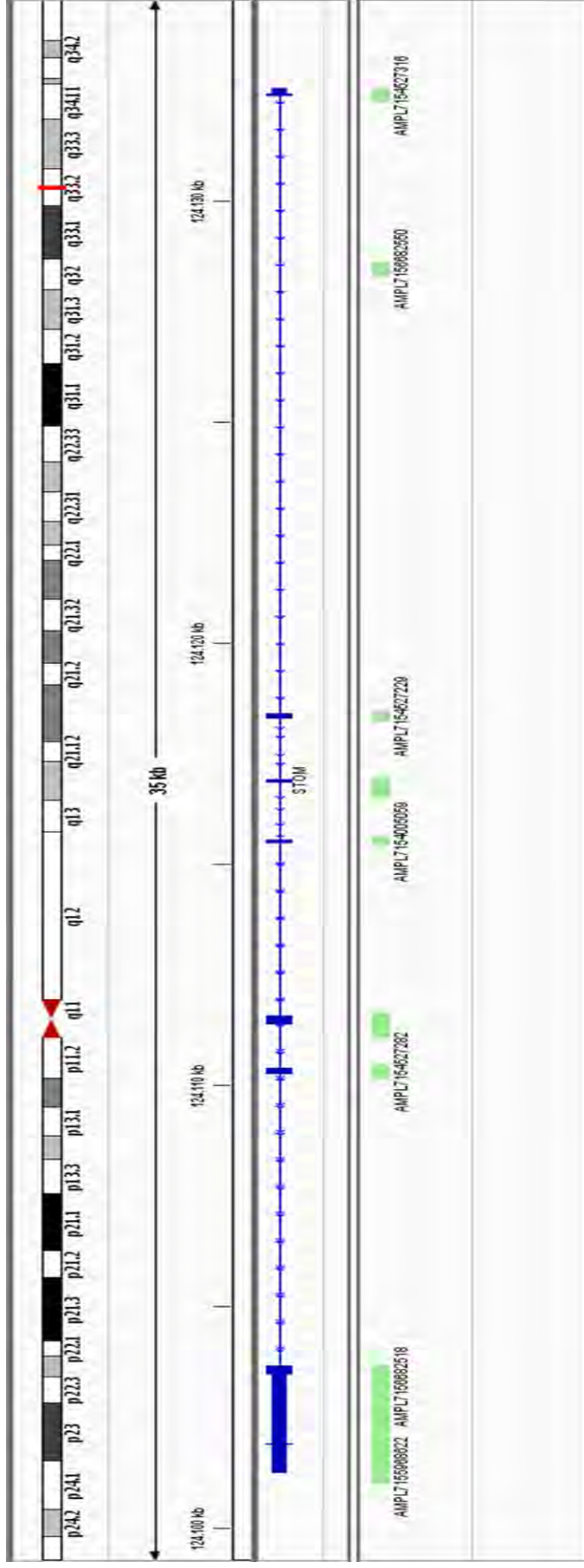


Figura anexa 10. Regiones secuenciadas en el gen *PIEZO1* (Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1; 16:88781751-88851619).

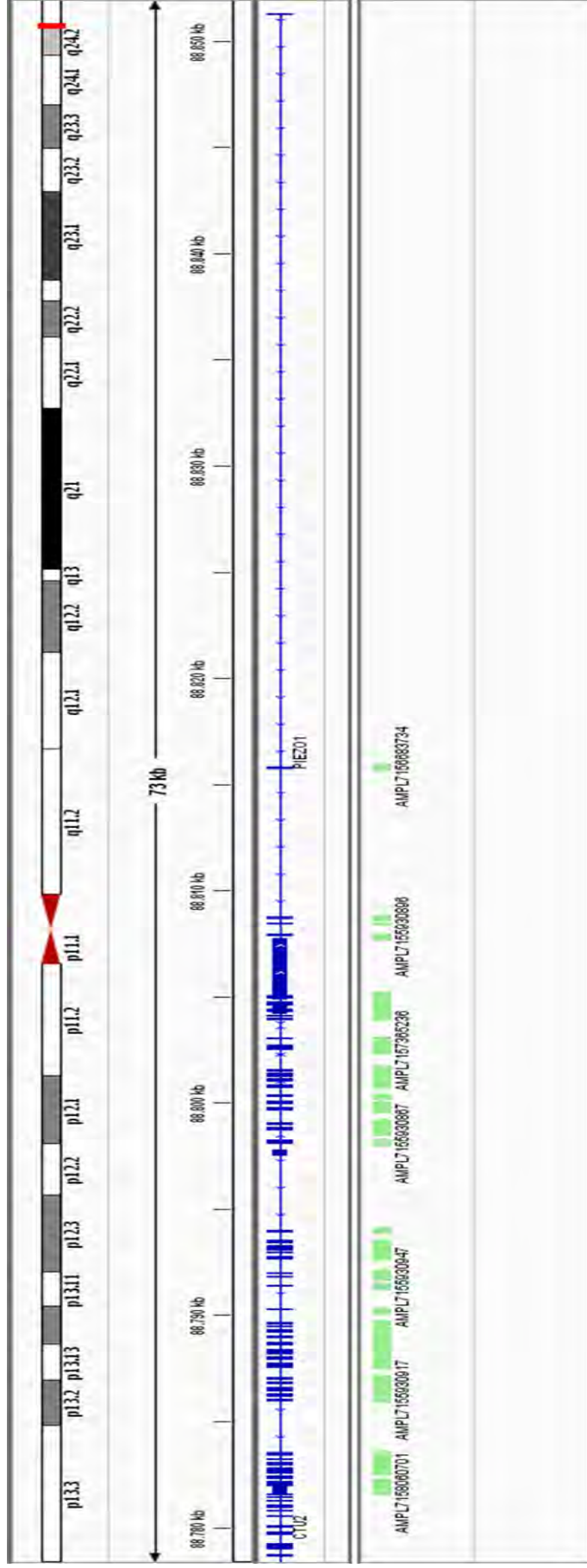


Figura anexa 11. Regiones secuenciadas en el gen GYPC (Glycophorin C (Gerbich blood group); 2:127413509-127454246).

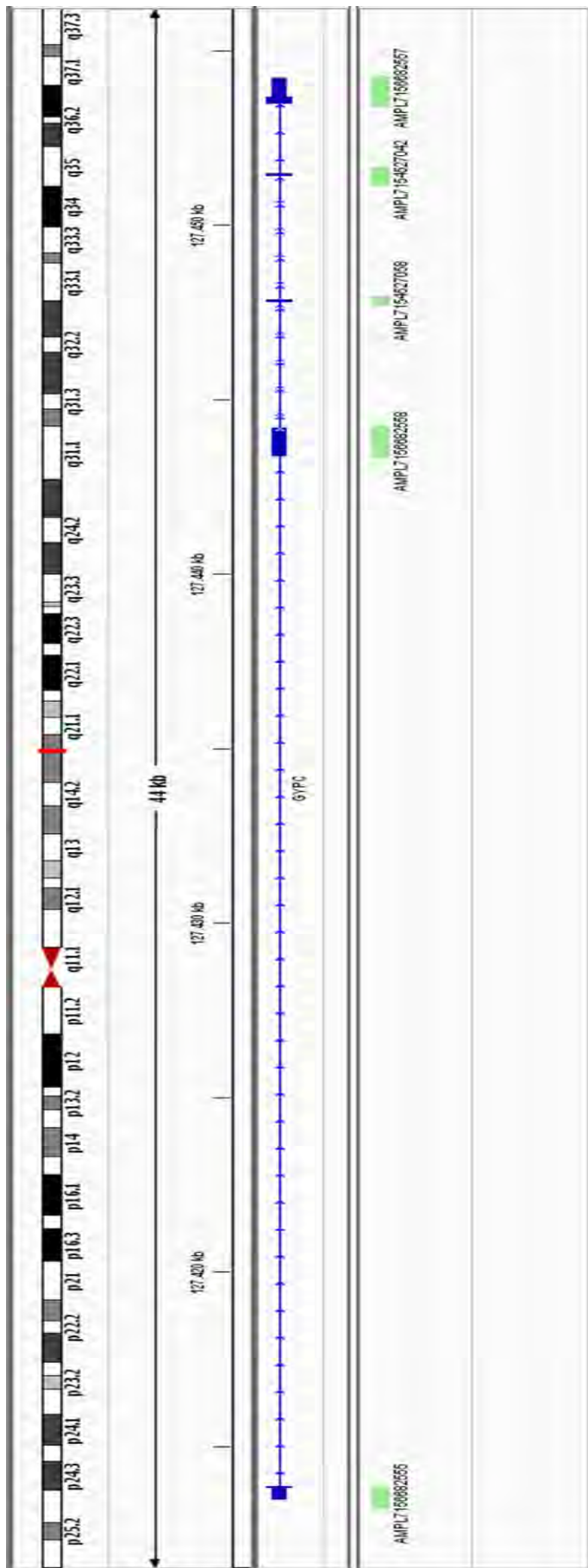


Figura anexa 12. Regiones secuenciadas en el gen GYPA (Glycophorin A (MNS blood group); 4:145030457-145061904).

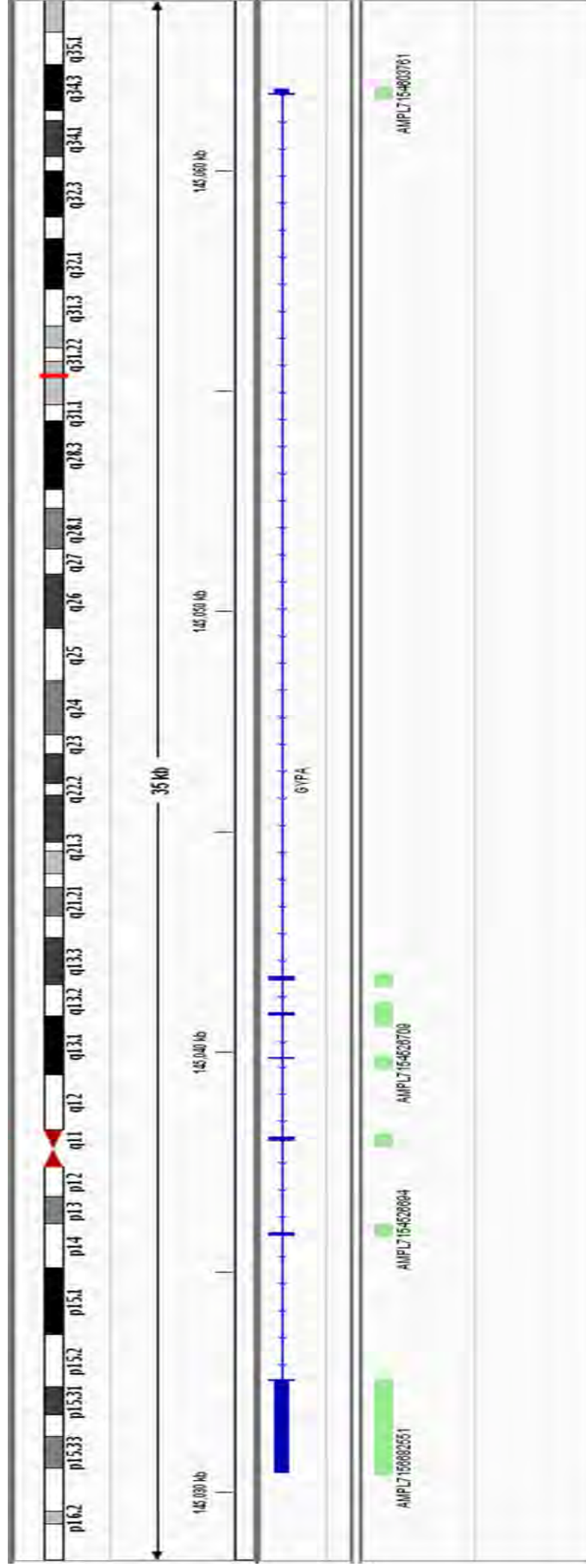


Figura anexa 13. Regiones secuenciadas en el gen *SLC4A1* (Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1 (Diego blood group); 17:42325753-42345509).

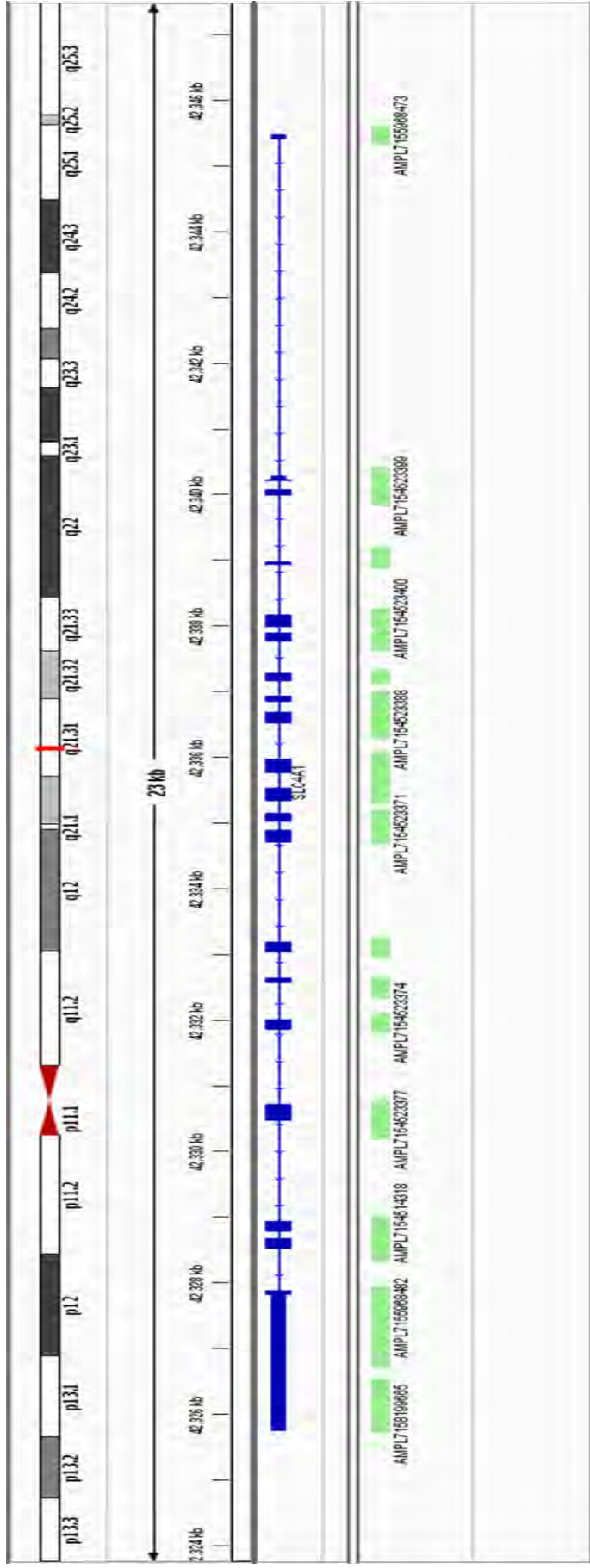


Figura anexa 14. Regiones secuenciadas en el gen EPB41 (Erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked); 1:29213603-29446553).

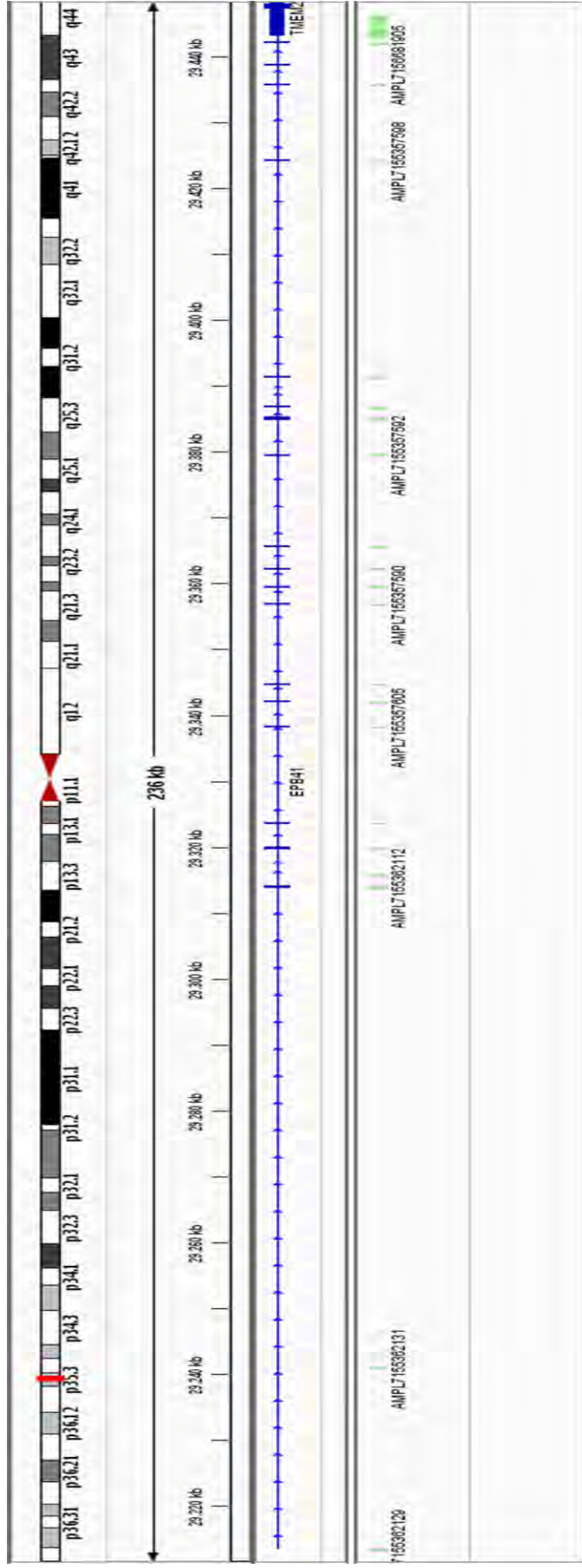


Figura anexa 15. Regiones secuenciadas en el gen EPB42 (Erythrocyte membrane protein band 4.2; 15:43398423-43513481).

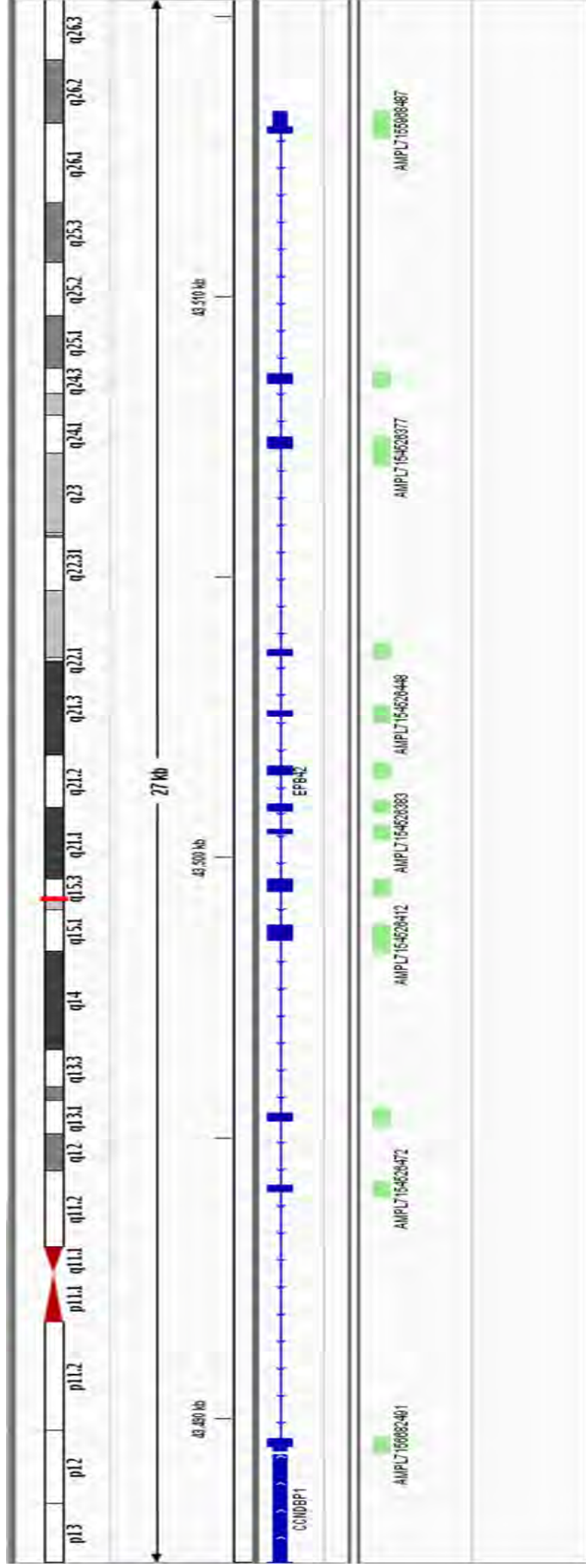


Figura anexa 16. Regiones secuenciadas en el gen G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase; X:153759606-153775787).

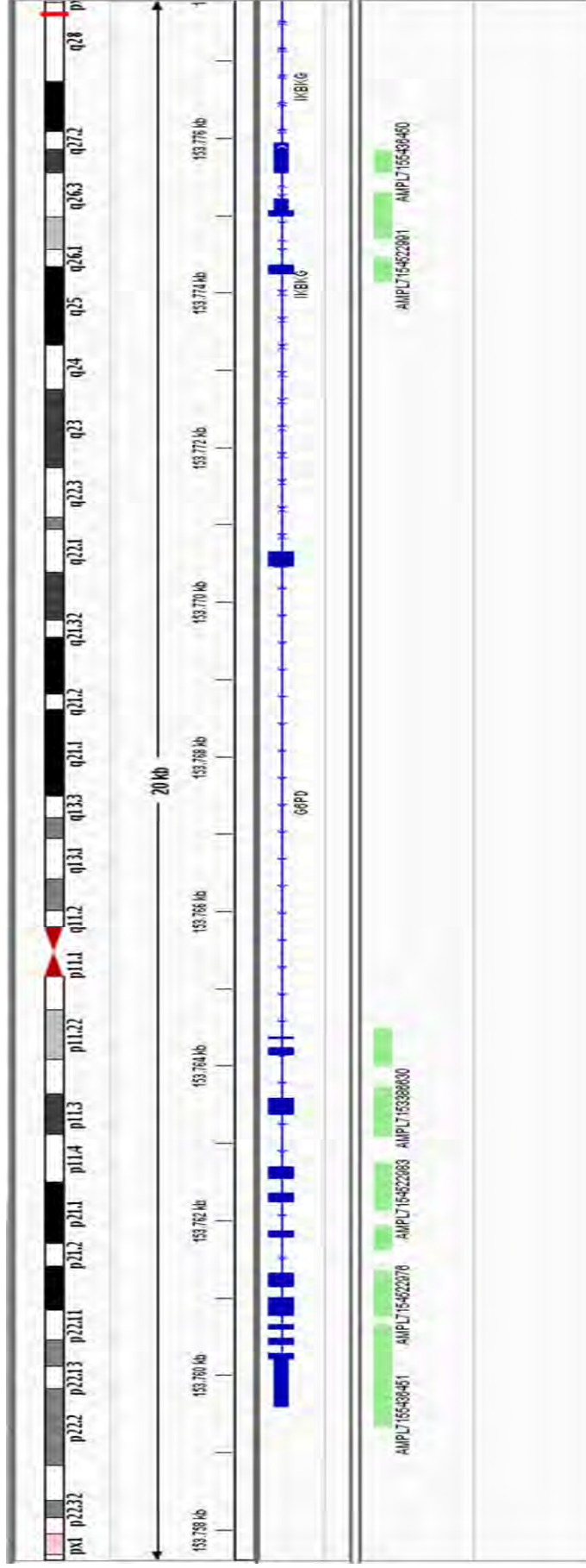


Figura anexa 18. Regiones secuenciadas en el gen GPI (Glucose-6-phosphate isomerase; 19:34850385-34893061).

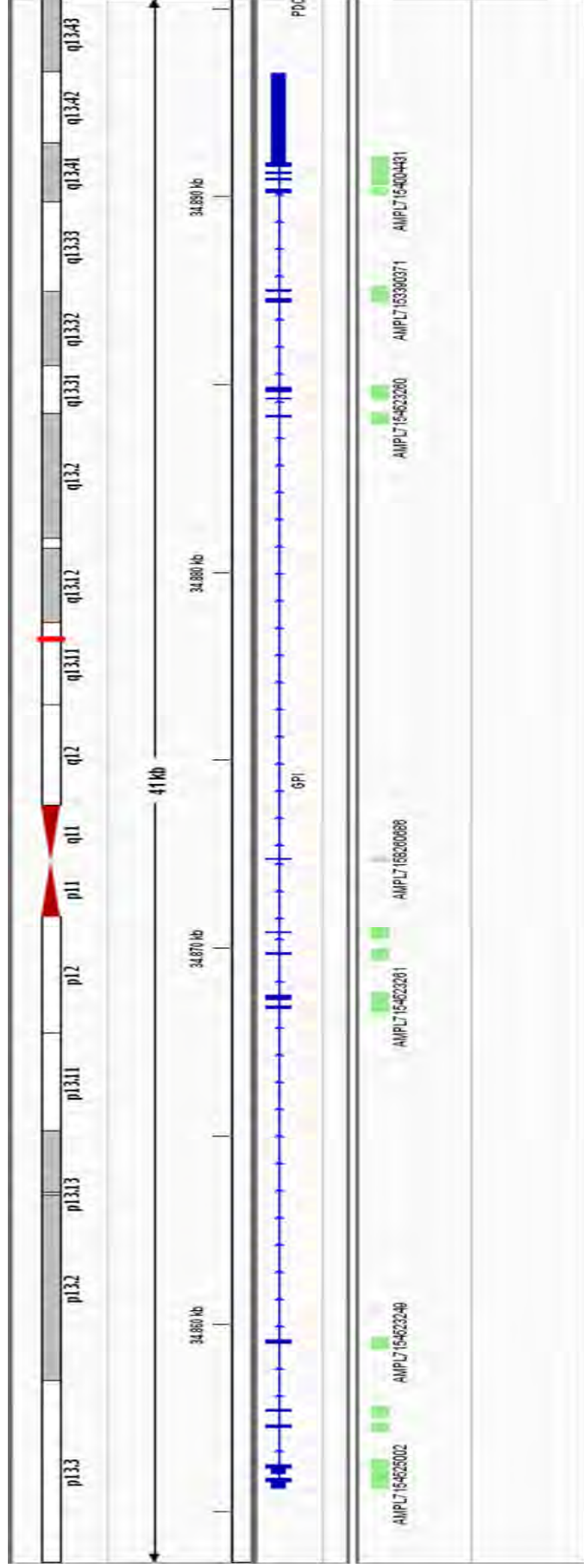


Figura anexa 19. Regiones secuenciadas en el gen AK1 (Adenylate kinase 1; 9:130628759-130640022).

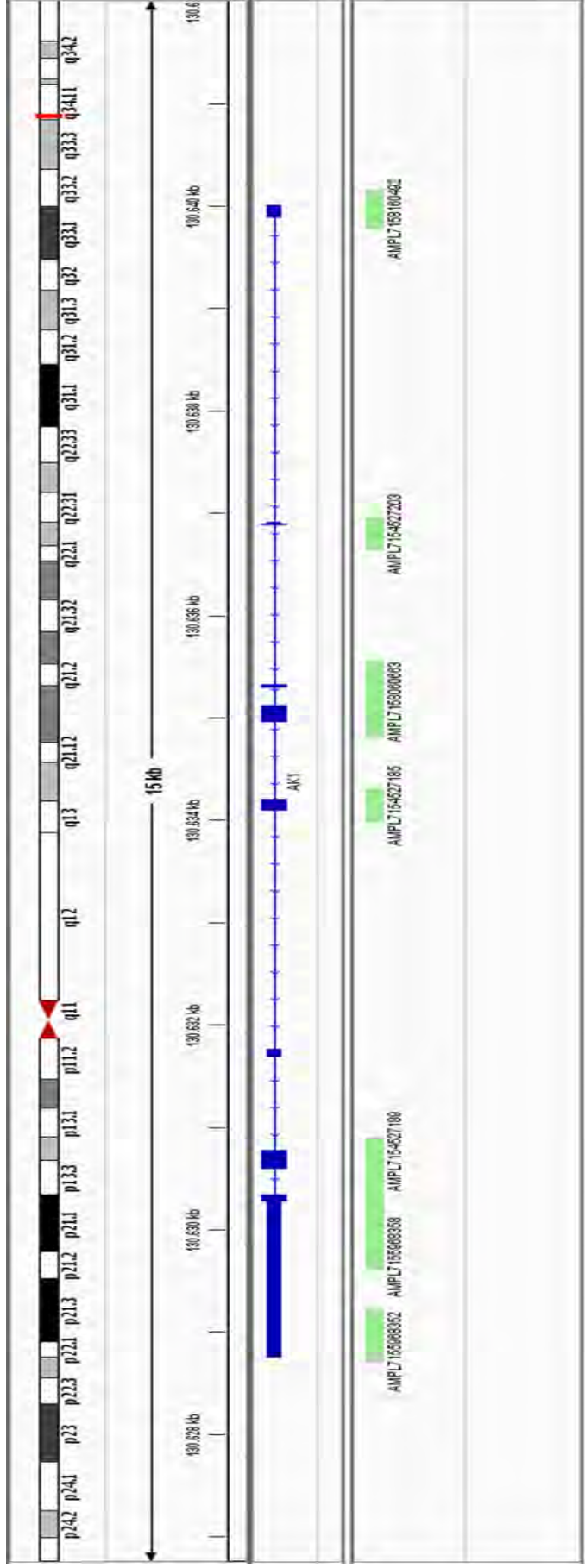


Figura anexa 21. Regiones secuenciadas en el gen PKLR (Piruvate kinase, liver and RBC; 1:155259630-155271225).

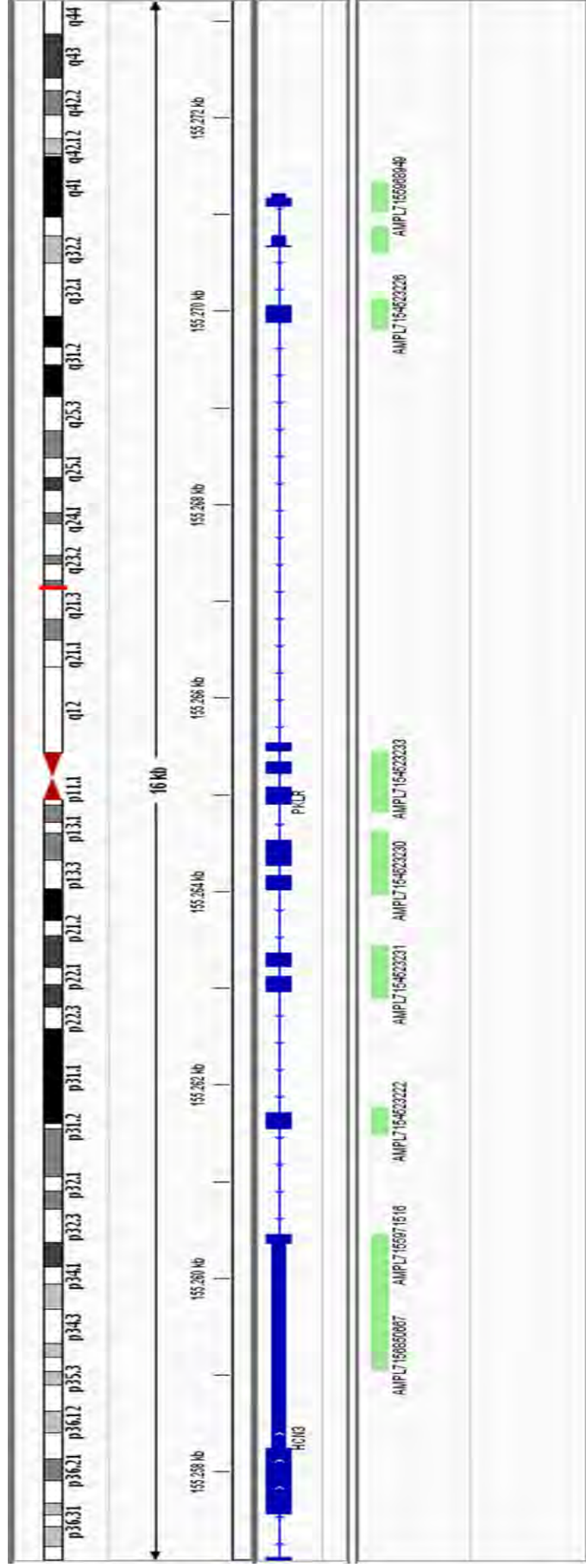


Figura anexa 22. Regiones secuenciadas en el gen *PGK1* (Phosphoglycerate kinase 1; X:77320685-77384793).

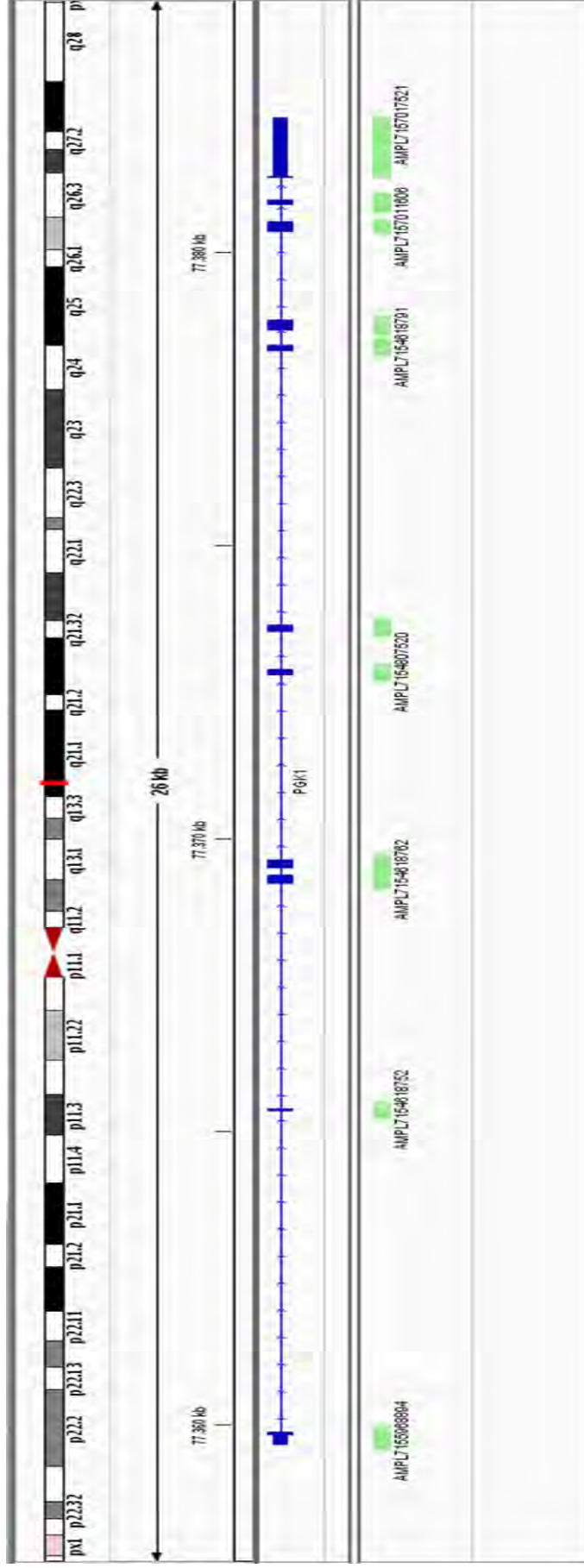


Figura anexa 23. Regiones secuenciadas en el gen *TPI1* (Triosephosphate isomerase 1; 12:6976283-6980112).

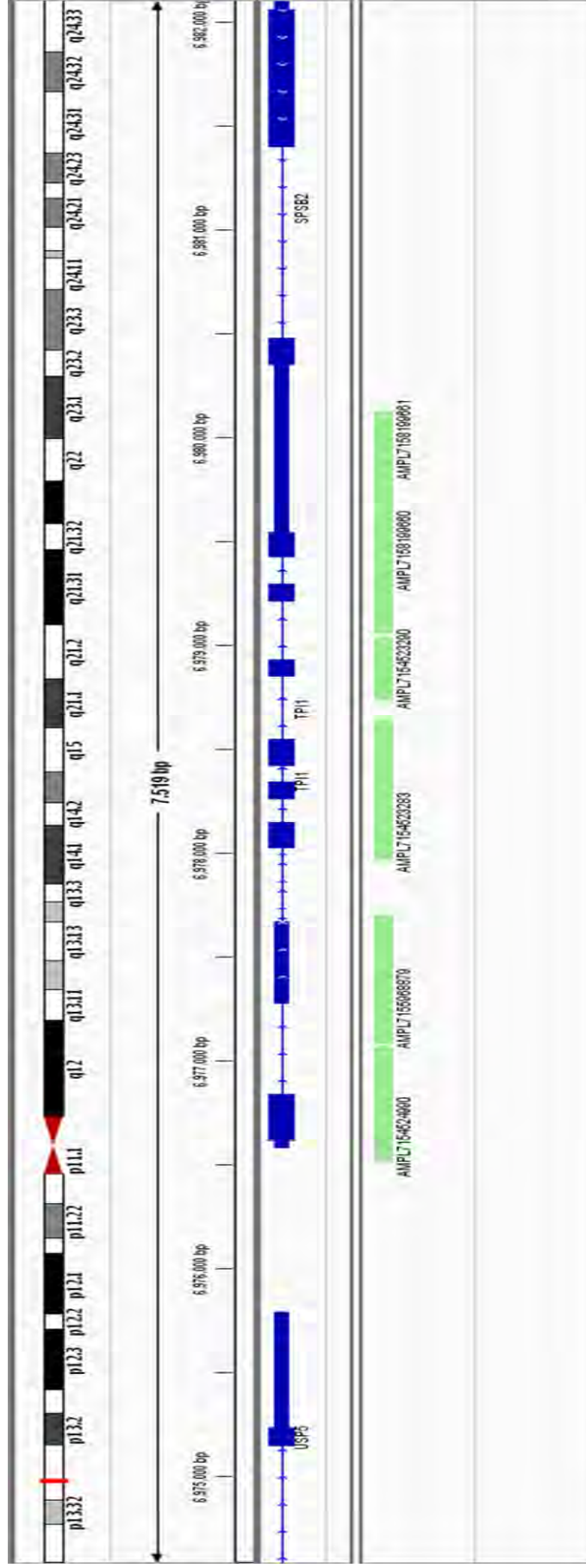


Figura anexa 24. Regiones secuenciadas en el gen ALDOA (Aldolase A, fructose-bisphosphate; 16:30064411-30081778).

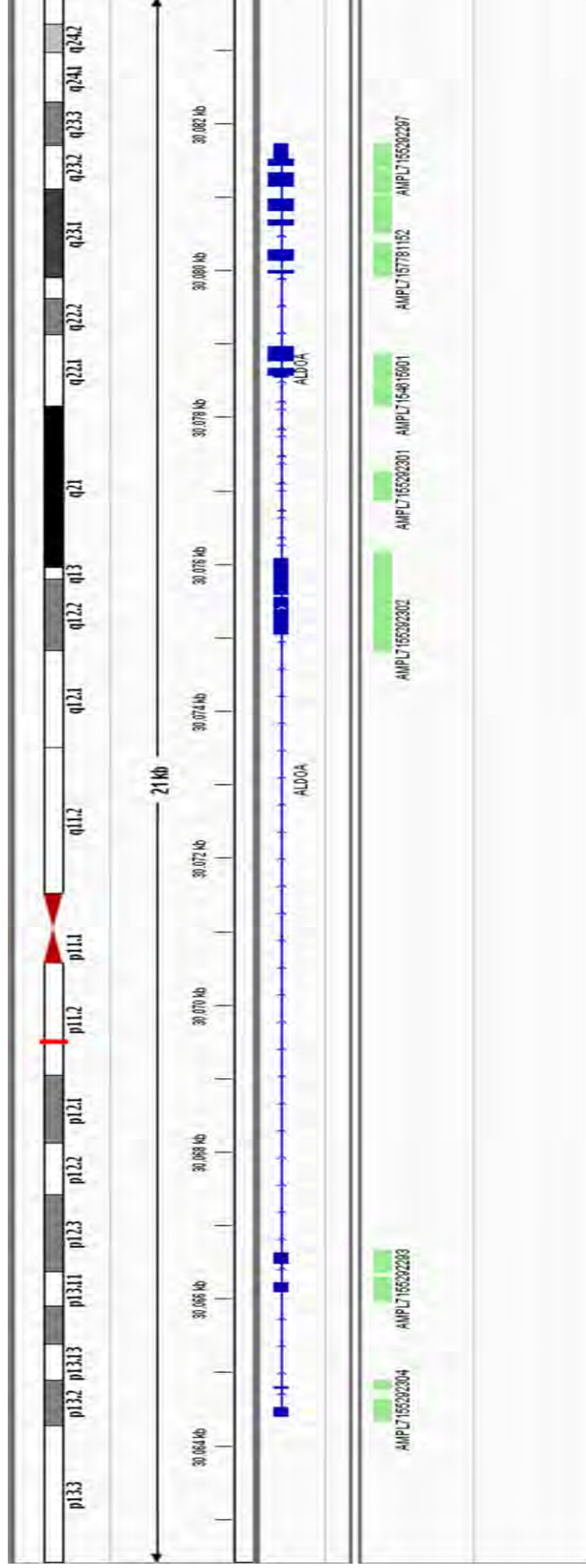


Figura anexa 25. Regiones secuenciadas en el gen *PFKFB1* (6-phosphofrufructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1; X:54959394-55024967).

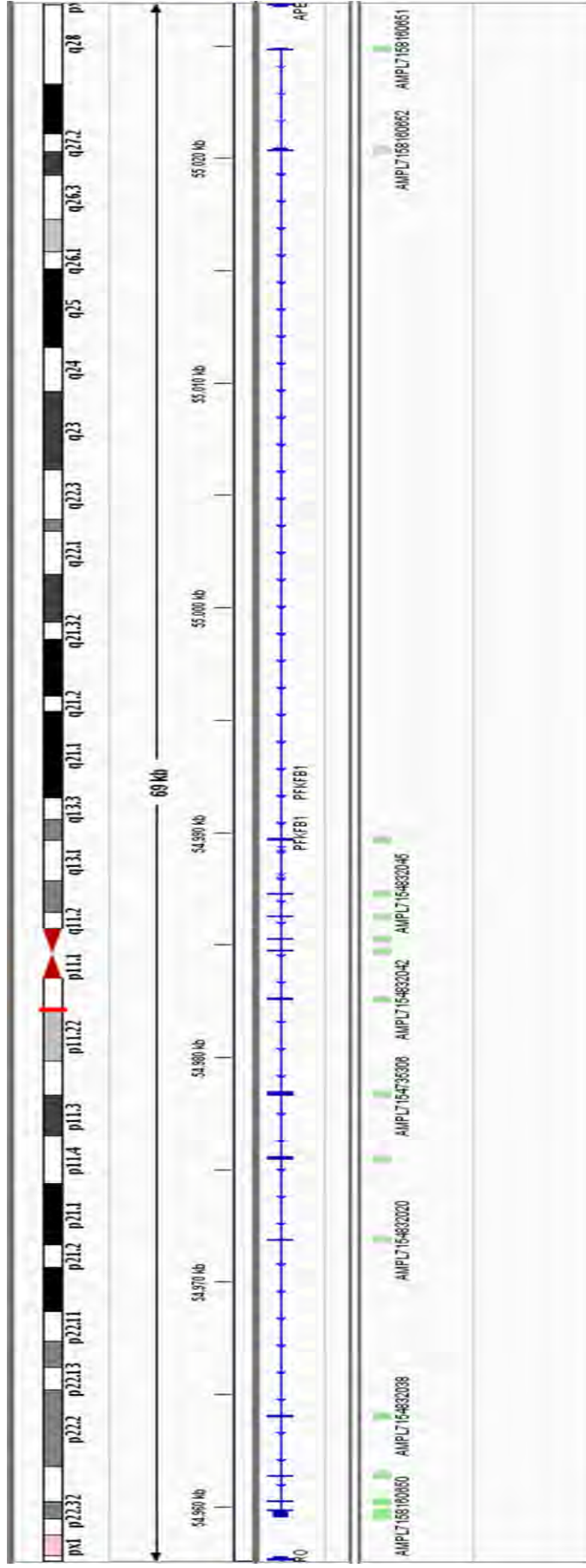


Figura anexa 26. Regiones secuenciadas en el gen BPGM (2,3-bisphosphoglycerate mutase; 7:134331560-134364565).

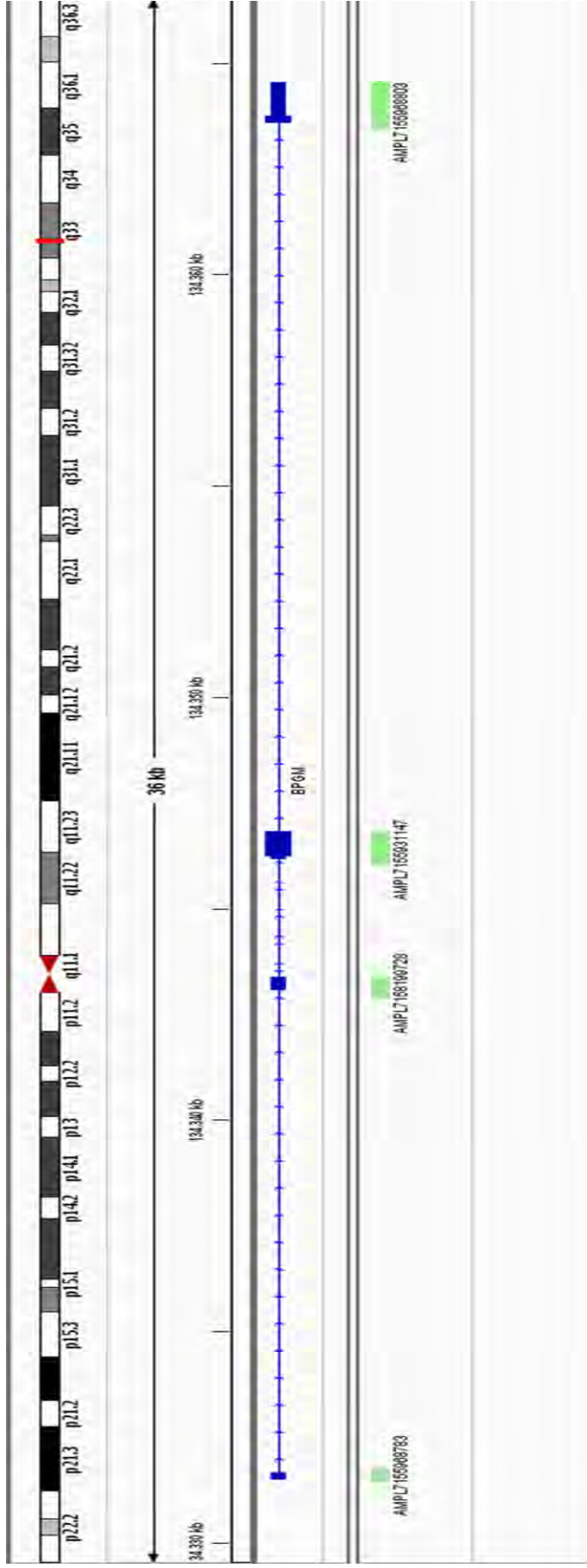


Figura anexa 27. Regiones secuenciadas en el gen NT5C3A (5,-nucleotidase, cytosolic IIIA; 7:33053742-33102409).

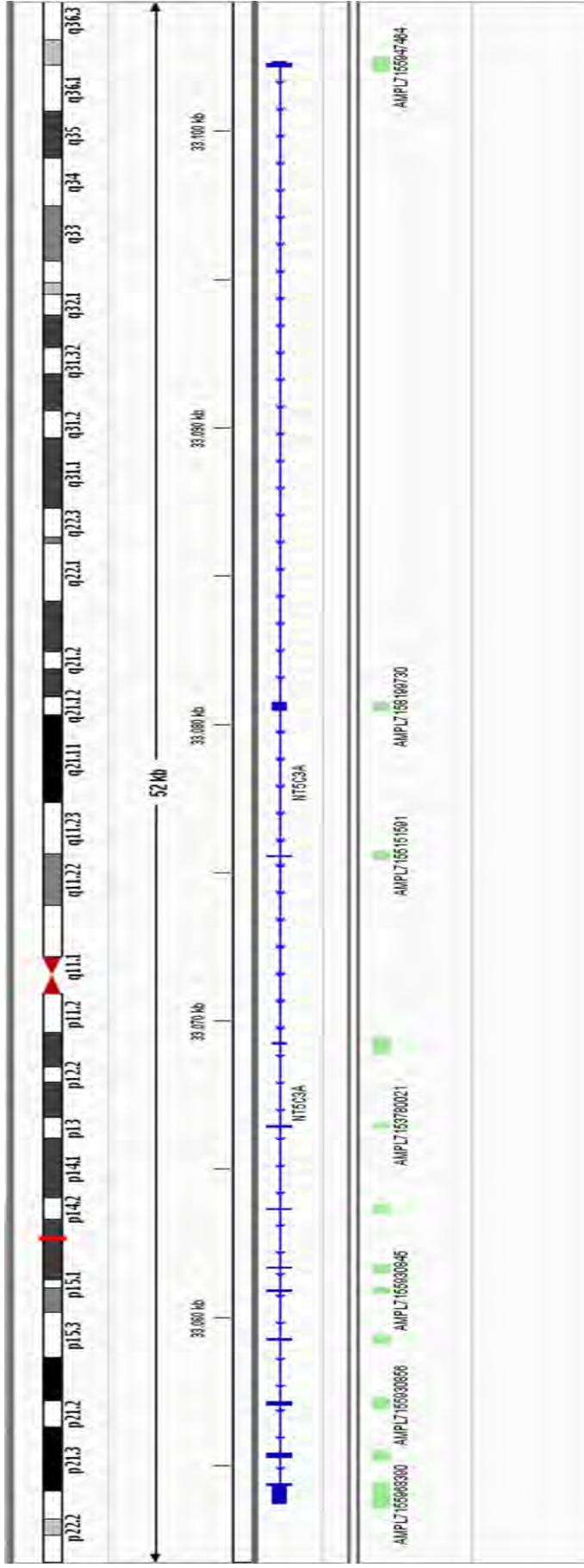


Figura anexa 28. Regiones secuenciadas en el gen CFH (Complement factor H; 1:196621008-196716634).

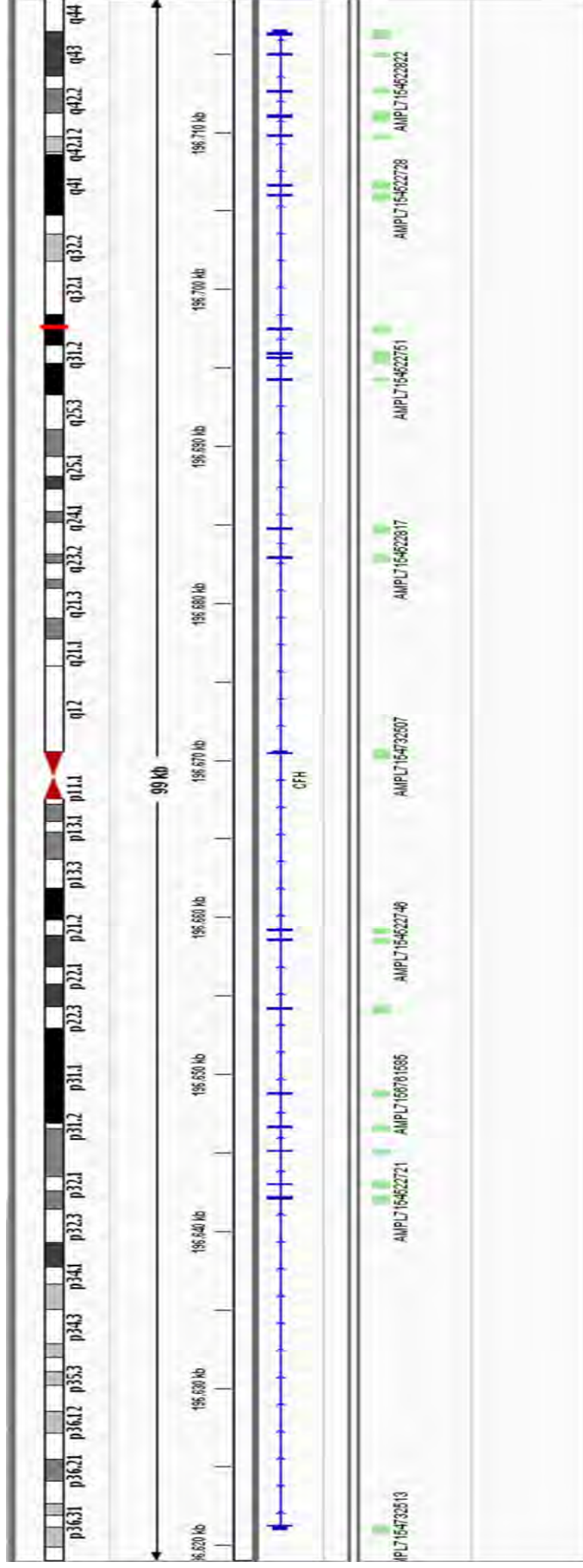


Figura anexa 29. Regiones secuenciadas en el gen CFHR1 (Complement factor H-related 1; 1:196788887-196801319).

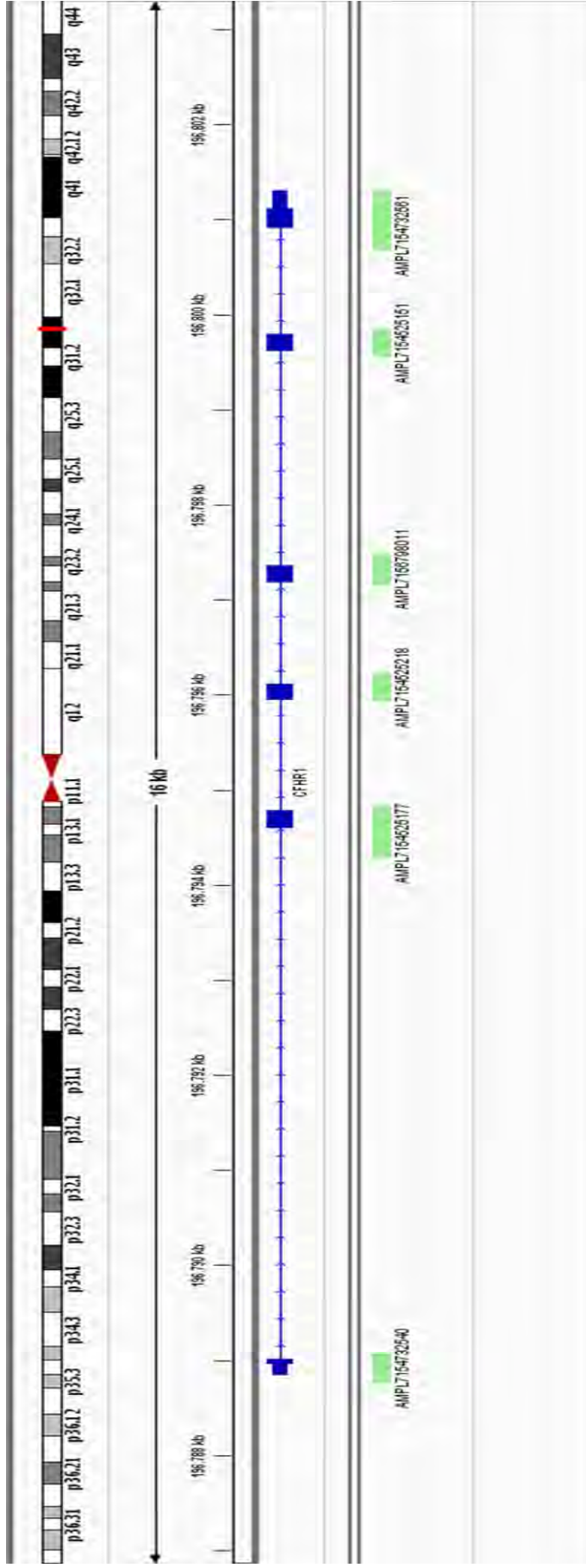


Figura anexa 30. Regiones secuenciadas en el gen CFHR3 (Complement factor H-related 3; 1:196743925-196763203).

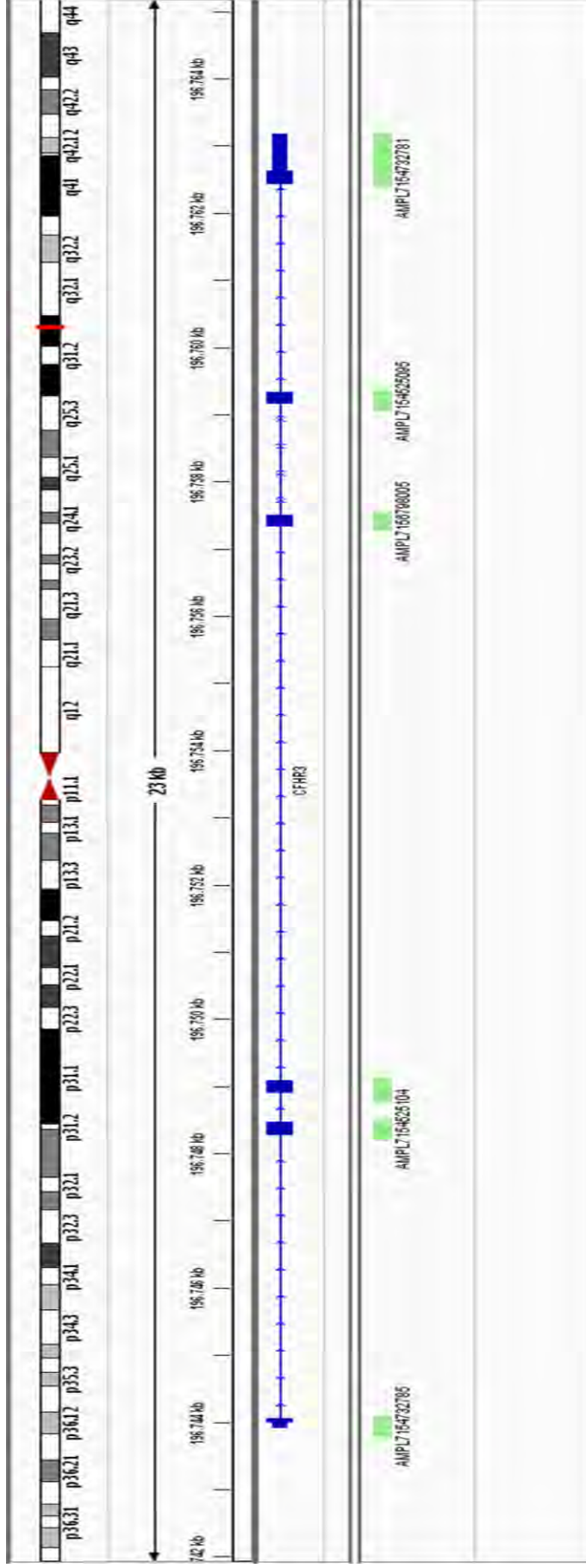


Figura anexa 31. Regiones secuenciadas en el gen CFHR4 (Complement factor H-related 4; 1:196819371-196888102).

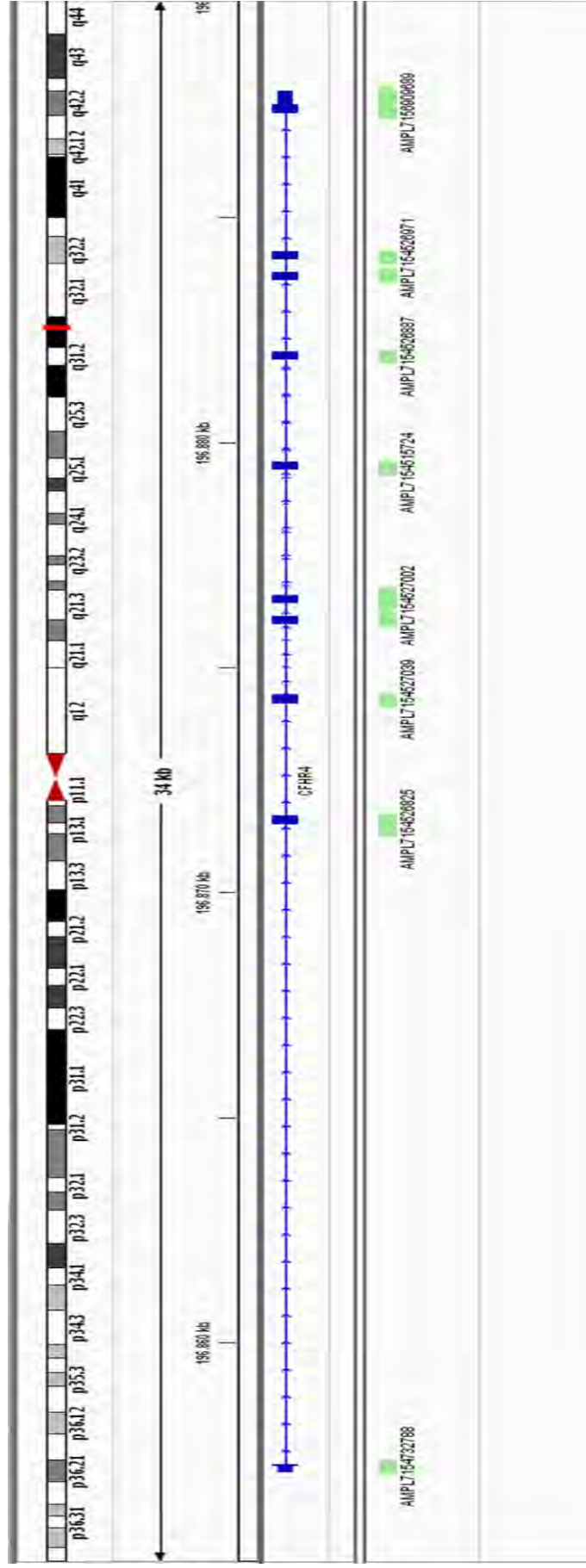


Figura anexa 32. Regiones secuenciadas en el gen CFI (Complement factor I; 4:110661852-110723335).

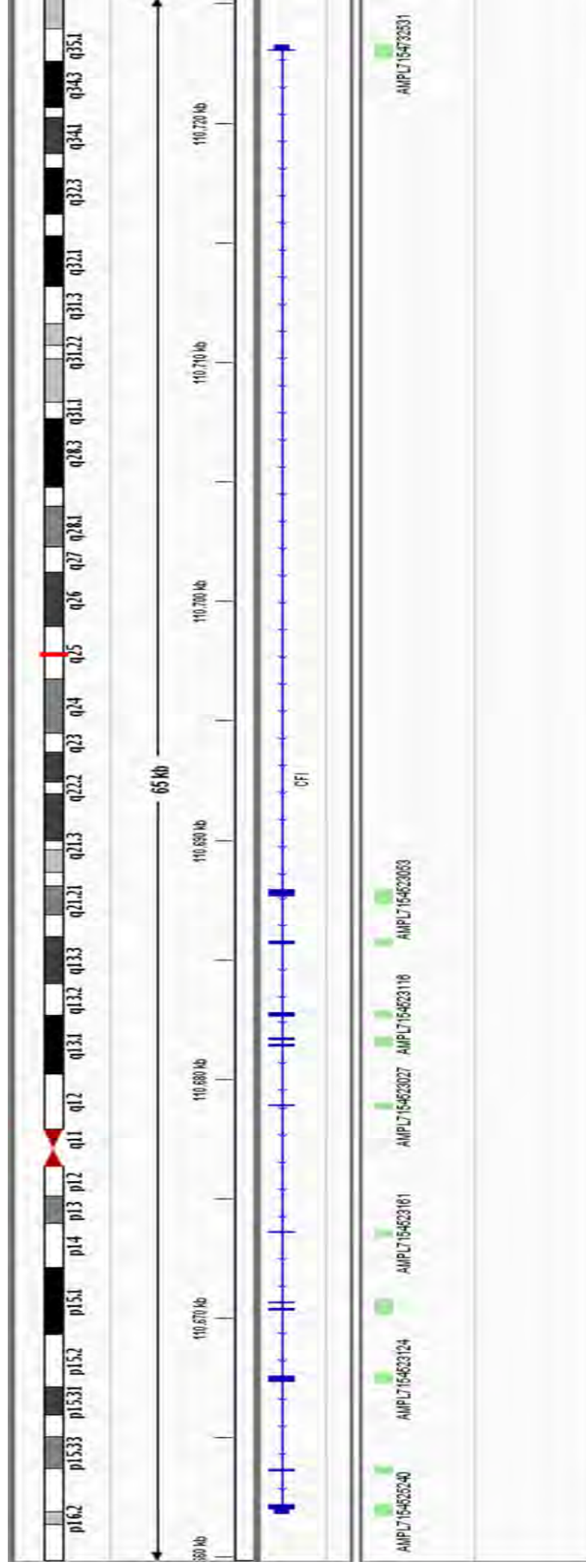


Figura anexa 33. Regiones secuenciadas en el gen CFB (Complement factor B; 6:31895475-31919861).

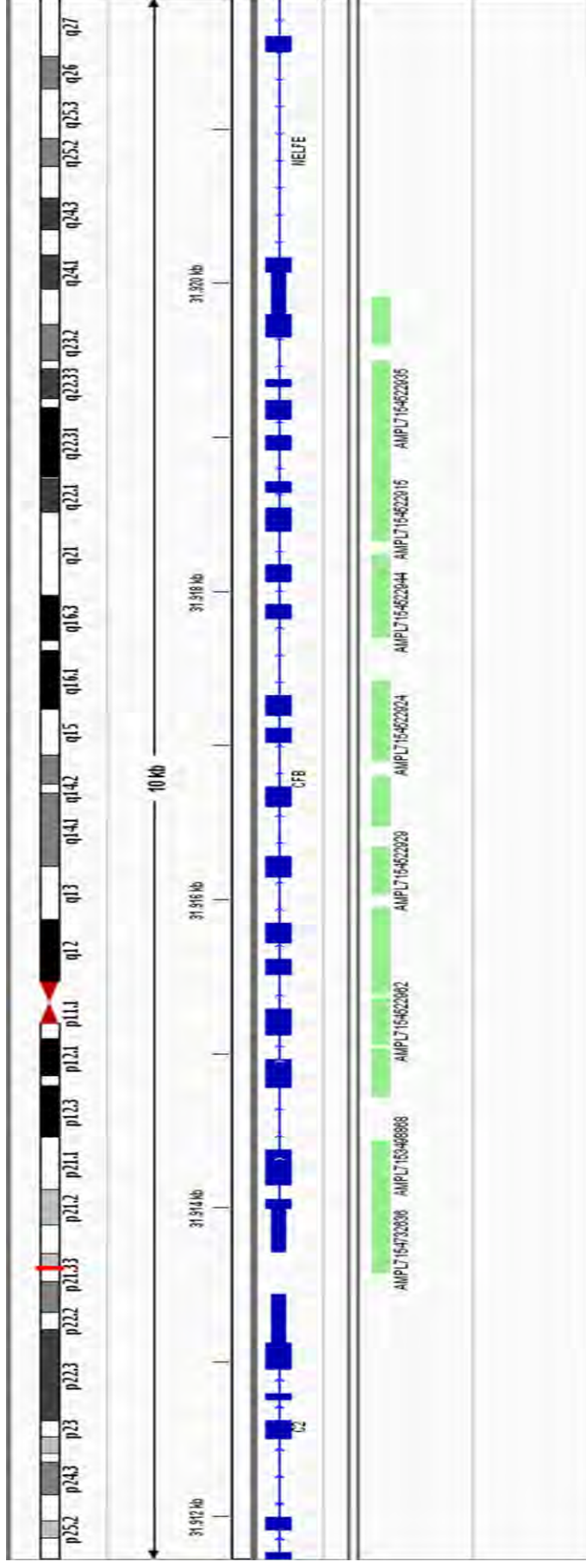


Figura anexa 34. Regiones secuenciadas en el gen CD46 (MCP) (CD46 molecule, complement regulatory protein; 1:207925402-207968858).

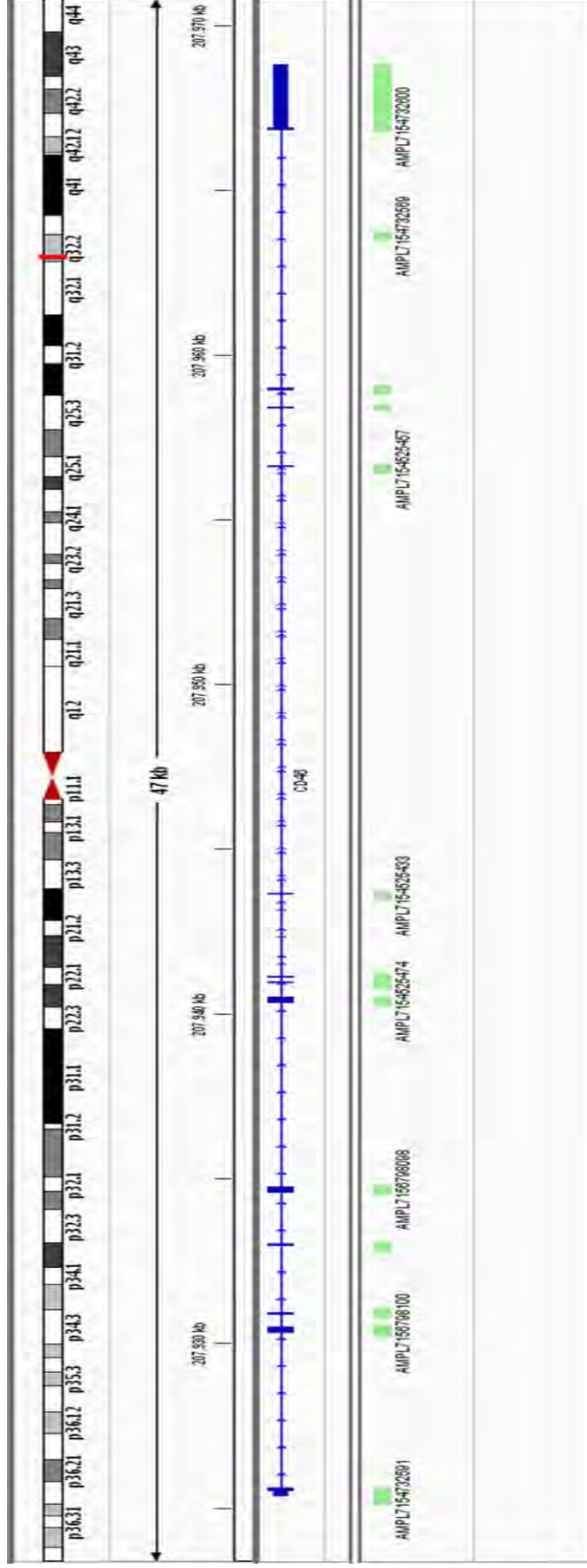


Figura anexa 35. Regiones secuenciadas en el gen *THBD* (Thrombomodulin; 20:23026270-23030378).

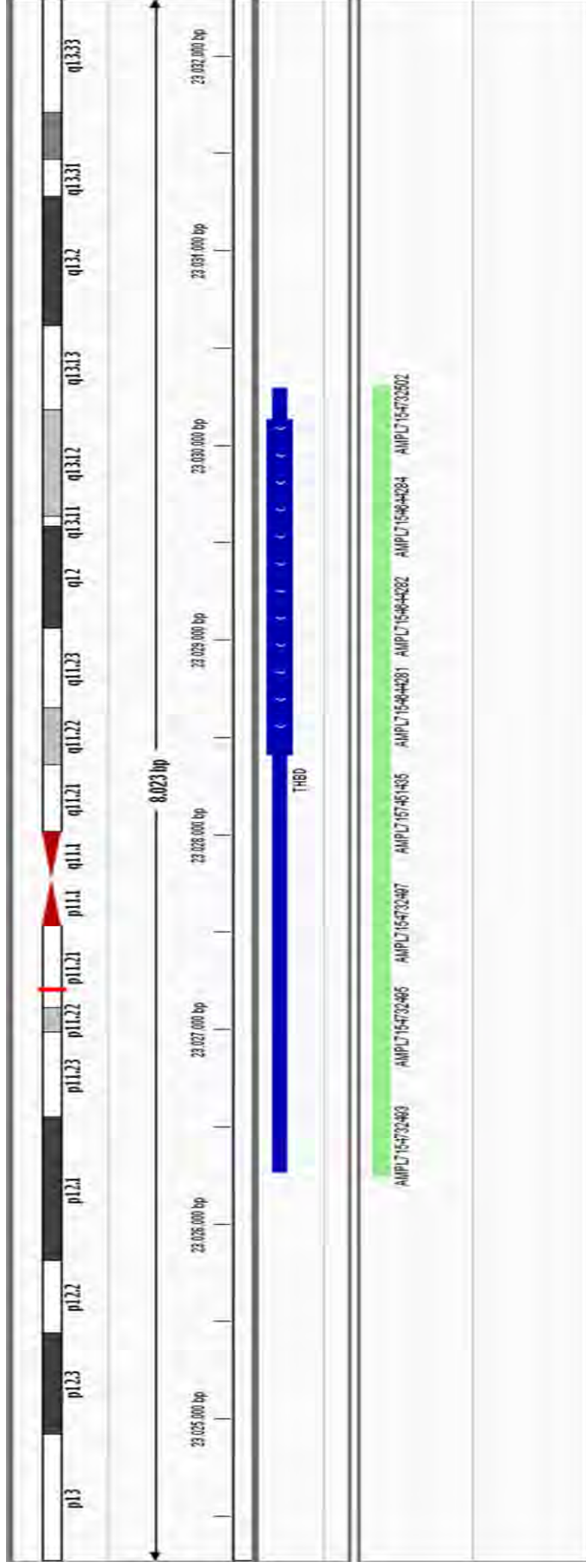


Figura anexa 36. Regiones secuenciadas en el gen C3 (Complement component 3; 19:6677715-6730573).

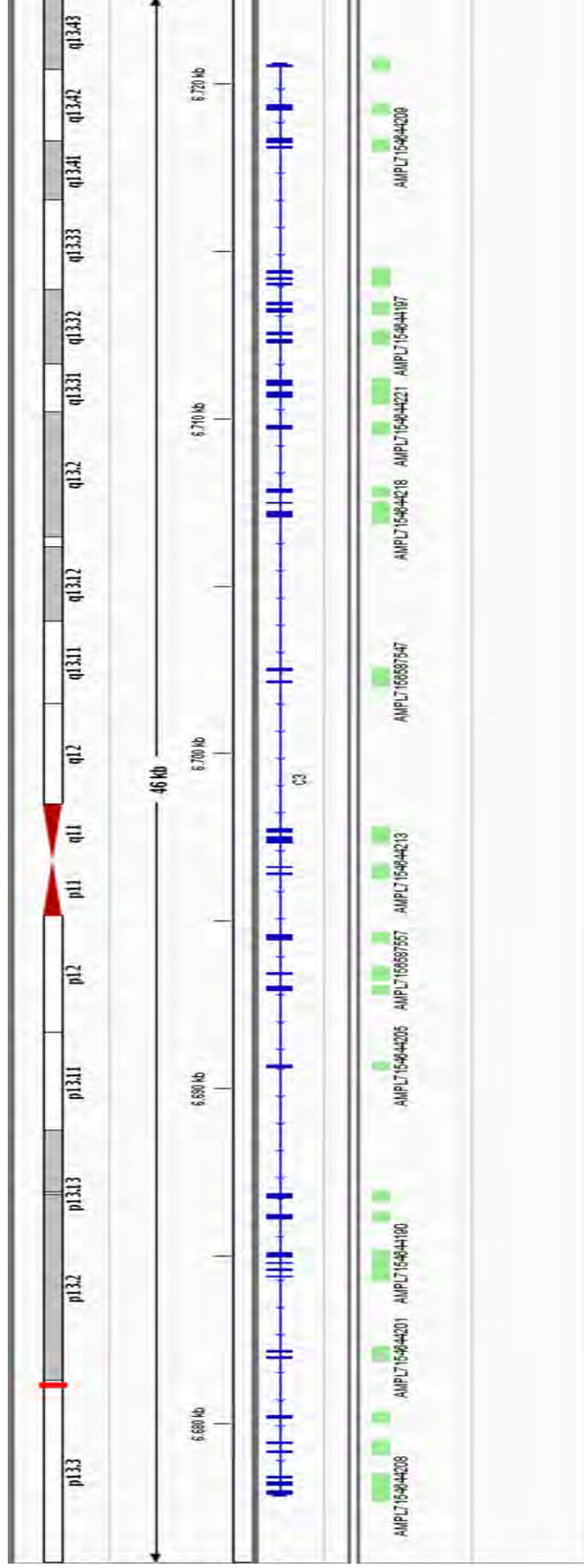


Figura anexa 37. Regiones secuenciadas en el gen DGKE (Diacilglicerol kinase, epsilon 64kDa; 17:54911460-54946036).

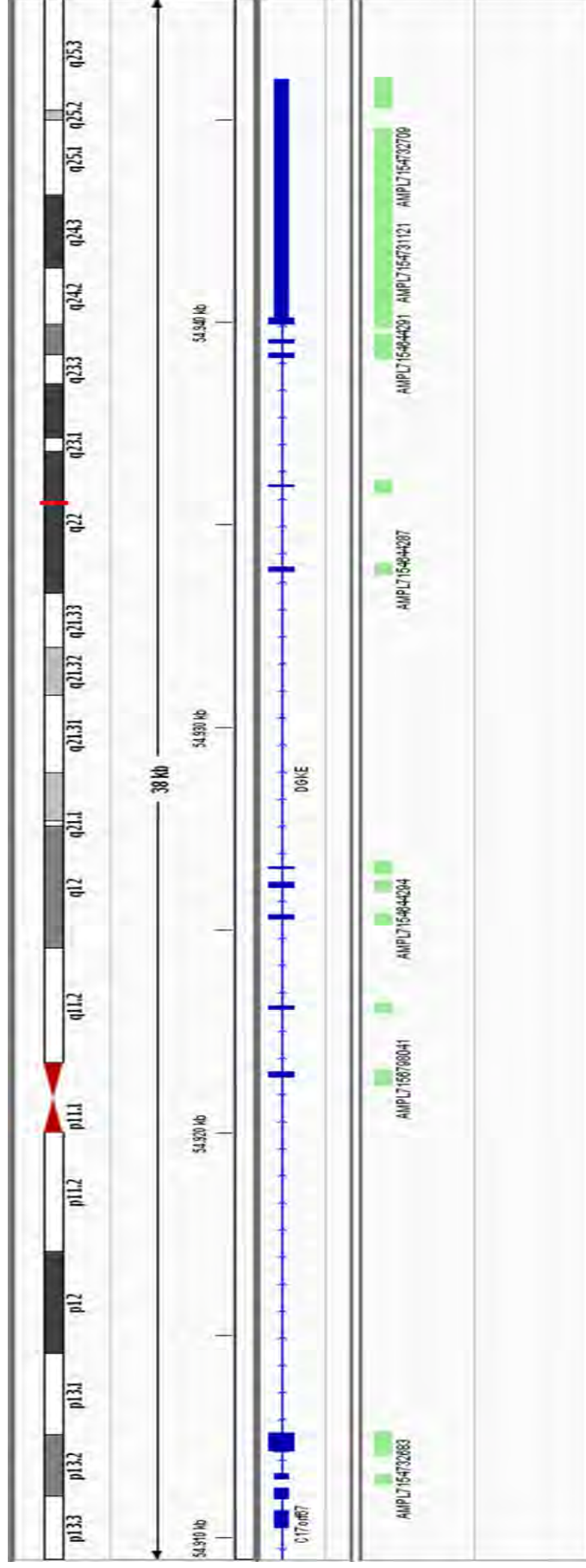


Figura anexa 39. Regiones secuenciadas en el gen *PIGA* (Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A; X:15337573-15353676).

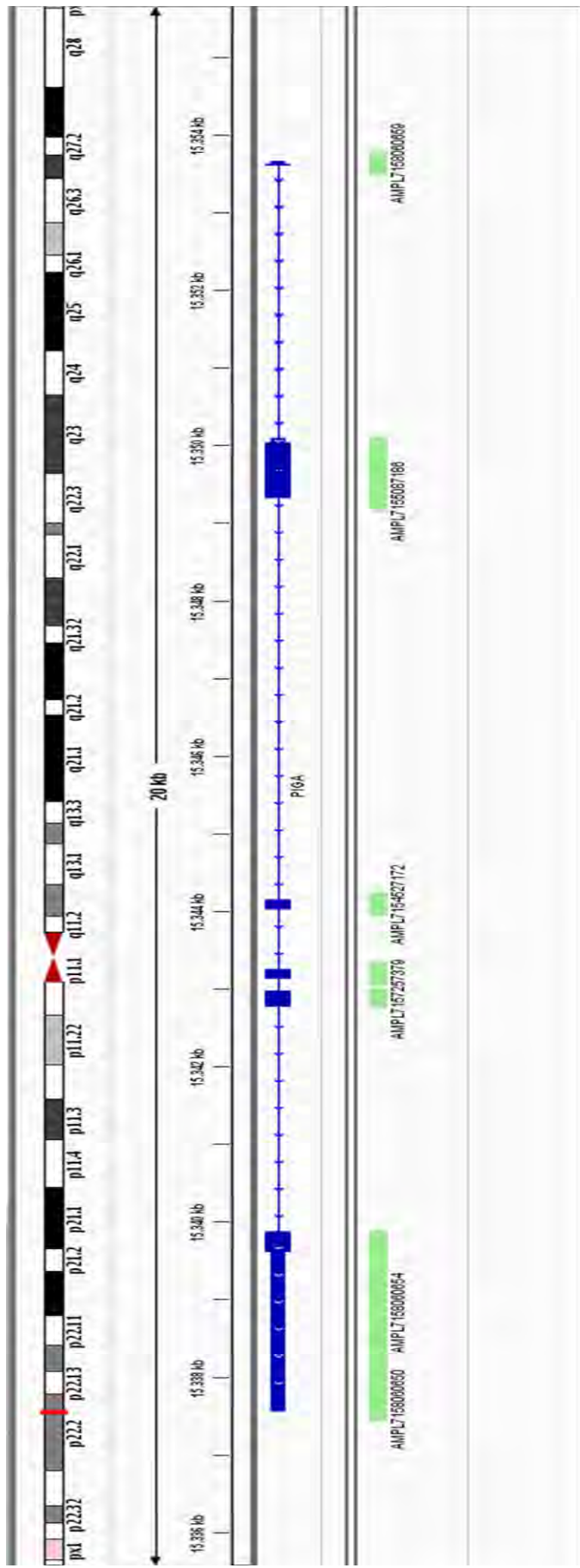
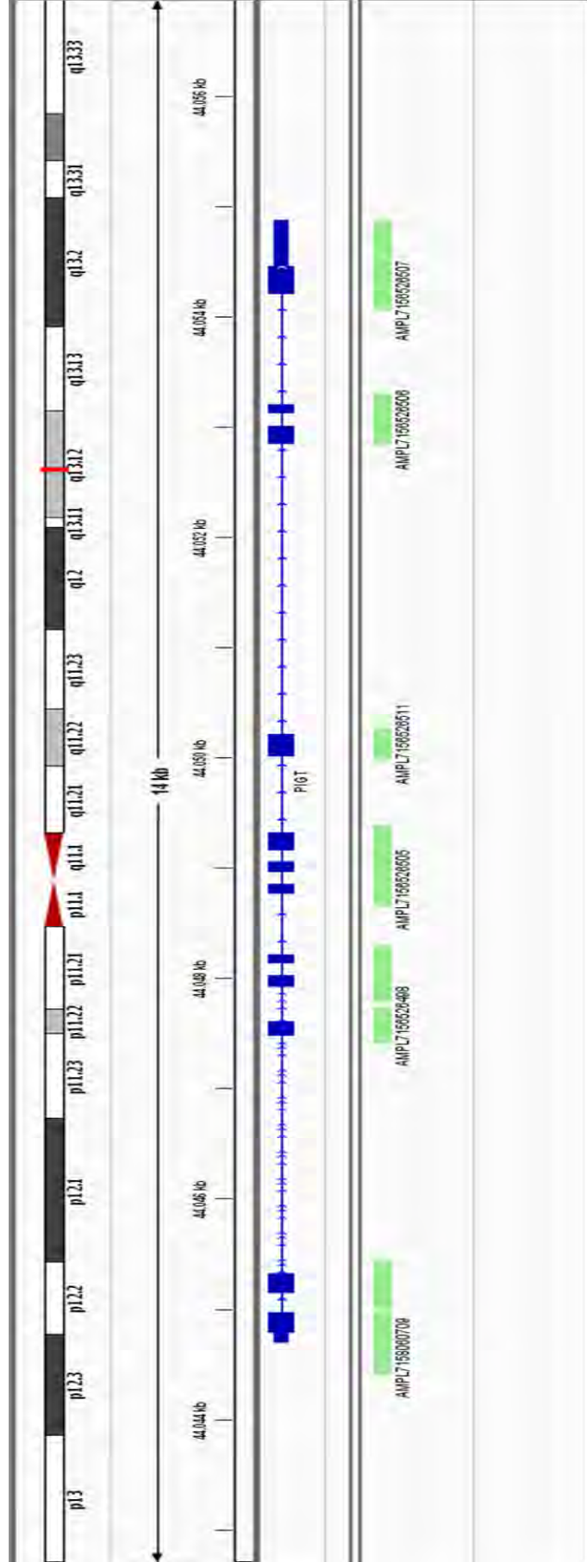


Figura anexa 40. Regiones secuenciadas en el gen *PIGT* (Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T; 20:44044717-44054884).





Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing

R. DEL ORBE BARRETO*, B. ARRIZABALAGA*[†], A. B. DE LA HOZ*, Á. GARCÍA-ORAD*[‡],
M. I. TEJADA*[§], J. C. GARCIA-RUIZ*[†], T. FIDALGO[¶], C. BENTO[¶], L. MANCO**[¶], M. L. RIBEIRO[¶]

*BioCruces Health Research Institute, Barakaldo, Spain

[†]Department of Haematology, Cruces University Hospital, Barakaldo, Spain

[‡]Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, Faculty of Medicine and Odontology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bilbao, Spain

[§]Molecular Genetics Laboratory, Genetics Service, Cruces University Hospital, Barakaldo, Spain

[¶]Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

**Research Centre for Anthropology and Health (CIAS), Department of Life Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Correspondence:

Rafael Del Orbe Barreto,
BioCruces Health Research Institute, Hematologic Cancer Study Group, Plaza de Cruces, 48903 Barakaldo, Spain.
Tel.: 34 946006000;
Fax: 34 946006172;
E-mail: rafaelandres.delorbebarreto@osakidetza.eus

SUMMARY

Introduction: Congenital haemolytic anaemia (CHA) refers to a group of genetically heterogeneous disorders, mainly caused by changes in genes encoding globin chains, cytoskeletal proteins and red cell enzymes, in which accurate diagnosis can be challenging with conventional techniques.

Methods: To set-up a comprehensive assay for detecting mutations that could improve aetiological diagnosis, we designed a custom panel for sequencing coding regions from 40 genes known to be involved in the pathogenesis of CHA, using the Ion Torrent™ (Thermo Fisher Scientific, S.L. Waltham, MA, USA) Personal Genome Machine (PGM) Sequencer. A control group of 16 samples with previously known mutations and a test group of 10 patients with unknown mutations were included for assay validation and application, respectively.

Results: In the test group, we identified pathogenic mutations in all cases: four patients had novel mutations in genes related to membrane defects (*SPTB*, *ANK1*, *SLC4A1* and *EPB41*), four were homozygous or compound heterozygous for mutations in genes related to enzyme deficiencies (*GPI*, *TPII* and *GSS*), one had a mutation in the *HBB* gene and another presented a homozygous mutation in the *ADAMTS13* gene.

Conclusions: Ion PGM sequencing with our custom panel is a highly efficient way to detect mutations causing haemolytic anaemia, including new variations. It is a high-throughput detection method that is ready for application in clinical laboratories.

doi:10.1111/ijlh.12551

Received 28 December 2015;
accepted for publication 7 June 2016

Keywords

Congenital anaemia, haemolysis, next-generation sequencing, mutations, molecular diagnosis

INTRODUCTION

Congenital haemolytic anaemia (CHA) refers to a diverse group of genetically heterogeneous disorders that are characterized by increased red blood cell (RBC) destruction, with consequences ranging from relatively harmless to severe life-threatening anaemia [1]. They can be due to defects in haemoglobin (Hb), RBC enzymes or RBC cytoskeletal proteins [2]. Occasionally, diagnosis of CHA is a challenge because clinical features are similar in cases with different aetiologies and it is not possible to distinguish between them using conventional diagnostic techniques [1, 2].

Generally, β -haemoglobinopathies are identified using chromatography and electrophoresis, but there are some cases such as those due to unstable haemoglobin or other Hb variants that can be misdiagnosed; hence, genetic analysis is required to detect variations in the *HBB* gene. Lately, next-generation sequencing (NGS) has demonstrated its usefulness as a diagnostic tool and in genetic counselling [3–5].

In relation to RBC enzyme deficiencies, most are inherited in an autosomal recessive form with haemolysis occurring only in homozygous or compound heterozygous individuals and some enzyme deficiencies are X-linked. The most common are glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and pyruvate kinase (PK) deficiencies; however, there are a number of other much less frequent enzyme disorders that cause haemolytic anaemia without specific abnormalities in the morphology of the RBC. Diagnosis is based on detection of reduced specific enzyme activity in RBCs, but errors can be made in the interpretation of results because of instability of the enzyme, high reticulocyte count or recent blood transfusions. Hence, DNA sequence analysis may be the only way to establish a diagnosis [6].

RBC cytoskeletal disorders, including hereditary spherocytosis (HS), hereditary elliptocytosis (HE), hereditary pyropoikilocytosis and hereditary stomatocytosis, are caused by defects in various membrane

proteins. These disorders are typically inherited as autosomal dominant traits or *de novo* but can also present as recessive forms, frequently severe. Diagnosis is based on RBC morphology, screening tests for membrane defects (osmotic fragility, acid glycerol lysis time and eosin-5'-maleimide binding tests), ion flux measurement and analysis of RBC deformability by ektacytometry [7]. However, in neonates or transfused individuals, diagnosis can be difficult due to unclear morphological features, and screening tests may be unreliable [8]. In such cases, gene sequencing provides a powerful diagnostic tool [7, 8] and NGS has shown to be feasible [9]. Occasionally, it can be difficult to make a differential diagnosis between HS and congenital dyserythropoietic anaemias (CDAs), inherited disorders affecting red cell lineage, especially CDA-II. They are characterized by an ineffective erythropoiesis with specific morphological features in the bone marrow that have served as a basis for their classification; however, recent identification of several causative genes could help reclassify these disorders. Indeed, some authors have suggested that the use of NGS technologies will improve molecular diagnosis in CDAs [10, 11]. In addition, cases of congenital thrombotic microangiopathy (TM) due to defects in the *ADAMTS13* gene or in the complement system can be underestimated as a cause of CHA. Diagnosis is often hindered by the need for plasma exchange as an urgent treatment as this can produce an artefact in activity levels of the *ADAMTS13* enzyme or complement fractions. In these patients, genetic studies are helpful to make an accurate diagnosis [12, 13].

Diagnosis of CHA based on genetic mutations is a useful strategy and provides additional insight into the mechanisms of the disease. On the other hand, the conventional Sanger sequencing-based approach for mutation screening in CHA is time-consuming and costly, and most importantly, may not detect all types of disease-causing alterations [9, 14, 15]. Thus, the aim of our study was to evaluate the feasibility of a custom panel based on NGS technology (Ion Torrent

PGM™ Sequencer) for sequencing of the genes most frequently involved in the pathogenesis of CHA.

METHODS

This study was approved by the Euskadi Research Ethics Committee in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Patients

A total of 26 samples of genomic DNA were included, 16 patients (validation samples) with a previous CHA diagnosis by conventional biochemical methods and a genetic mutation identified by Sanger sequencing and 10 patients without a clear diagnosis. To explore the flexibility of our assay, we evaluated different types of pathogenic mutations (missense, nonsense and splice-site mutations, as well as deletions and insertions) in the validation sample cohort.

We investigated nine patients referred for CHA mutation screening and one patient with a haemoglobinopathy, without prior knowledge of their gene defect, to explore whether our NGS method also identified mutations in unclassified CHA patients. Of the former nine patients, four showed morphological and biochemical characteristics of an RBC membrane protein defect, one had no measurable ADAMTS13 activity and TM and four had chronic haemolysis but no distinctive morphological features, while the patient with a haemoglobinopathy had an Hb variant unidentified by capillary electrophoresis.

Gene panel

We developed an NGS assay to analyse a panel of 40 genes known to be involved in the pathogenesis of CHA (Table 1). Using Ampliseq Designer software (Thermo Fisher Scientific, S.L.), we selected the regions of interest to be sequenced, including all exons, 3'- and 5'-untranslated regions, exon-intron boundaries and promoter regions. Additionally, various intronic regions of several genes were included to analyse copy number variation.

Library preparation and sequencing

For each sample, a double reaction was required for two pools of primers. To generate a multiplexed PCR

Table 1. Genes included in the panel

Gene symbol	Disease
<i>CDAN1</i>	Congenital dyserythropoietic anaemia type I
<i>SEC23B</i>	Congenital dyserythropoietic anaemia type II
<i>KLFL1, GATA1</i>	Others types of congenital dyserythropoietic anaemia
<i>HBB</i>	Haemoglobinopathies and beta thalassaemia
<i>SPTA1, SPTB</i>	Hereditary elliptocytosis, spherocytosis, pyropoikilocytosis (alpha or beta spectrin)
<i>ANK1</i>	Hereditary spherocytosis (ankyrin)
<i>EPB72, PIEZO1</i>	Hereditary stomatocytosis (stomatins, piezo1)
<i>GYPA, GYPC</i>	Hereditary elliptocytosis (glycophorin A, C)
<i>SLC4A1</i>	Hereditary spherocytosis (band 3)
<i>EPB41</i>	Hereditary elliptocytosis (protein 4.1)
<i>EPB42</i>	Hereditary spherocytosis (protein 4.2)
<i>G6PD</i>	Anaemia due to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency
<i>HK1</i>	Anaemia due to hexokinase deficiency
<i>GPI</i>	Anaemia due to glucose-6-phosphate isomerase deficiency
<i>AK1</i>	Anaemia due to adenylate kinase deficiency
<i>GSS</i>	Anaemia due to glutathione synthetase deficiency
<i>PKLR</i>	Anaemia due to pyruvate kinase deficiency
<i>PGK</i>	Anaemia due to phosphoglycerate kinase deficiency
<i>TP11</i>	Anaemia due to triose phosphate isomerase deficiency
<i>ALDOA</i>	Anaemia due to aldolase deficiency
<i>PFKFB1</i>	Anaemia due to phosphofructokinase deficiency
<i>BPGM</i>	Anaemia due to biphosphoglyceromutase deficiency
<i>NT5C3A</i>	Anaemia due to pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency
<i>CFH, CFHR1, CFHR3, CFHR4, CFI, CFB, CD46, THBD, C3, DGKE</i>	Atypical haemolytic uraemic syndrome
<i>ADAMTS13</i>	Upshaw-Schulman syndrome
<i>PIGA, PIGT</i>	Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria

using the Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, S.L.), 10 ng of DNA was mixed with each pool of primers and polymerase, as per the manufacturer's protocol. After that, Ion Xpress™-specific index paired-end barcode adapters (Thermo Fisher Scientific, S.L.) were ligated to the 5' and 3' ends of DNA fragments by incubation with DNA ligase for 30 min at 22 °C and 10 min at 72 °C. The adapter-ligated DNA fragments were purified with Agencourt® AMPure® XP Reagent. The quantity of material in each library was assessed by qPCR using a specific quantification kit from Thermo Fisher Scientific, S.L. Pooled barcoded libraries were clonally amplified using the Ion OneTouch2™ (Thermo Fisher Scientific, S.L.) system according to the manufacturer's instructions. Ion sphere particles were enriched using the E/S module, and subsequently, the enriched template-positive particles were loaded onto an Ion 316™ or 318™ chip and sequenced using Ion Hi-Q sequencing kit chemistry on an Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, S.L.) [15–18].

Analysis

Postrun QC/QA filtering was performed using Torrent Suite (v3.6; Thermo Fisher Scientific, S.L.), and sequences aligned to the human genome version 19 using T-MAP (version 3.6.58977). Variants were called using the Torrent Variant Caller (version 3.6.59049, with Germ Line – Low Stringency settings) and annotated using wANNOVAR. The potential functional impact of identified variants was assessed using the predictive algorithms available in wANNOVAR. Finally, potentially causative mutations identified as being novel or rare and with some predictive indicators were confirmed by Sanger sequencing.

Detection of single nucleotide variations and small insertions/deletions (indels)

The data analysis pipeline developed for the detection of single nucleotide variations and small indels is comprised of tools freely available on the web. An initial quality check of the sequence reads is followed by mapping the paired-end reads with the Burrows-Wheeler Aligner to the National Centre for Biotechnology Information human genome version 19 reference genome.

Subsequently, single nucleotide polymorphisms and small indels are called using the Ion Reporter™ software (Thermo Fisher Scientific, S.L.). The resulting list of variations is annotated with Annovar, which utilizes data from external databases to generate context around the mutations, such as the consequences of amino acid changes, location with respect to canonical splice-site regions and information related to the Short Genetic Variations database (dbSNP) and frequencies if available. Finally, a manual filtering step is executed to prioritize relevant mutations. Low-frequency frameshifts and truncating mutations are considered likely to be pathogenic. Unreported nonsynonymous amino acid variations were analysed *in silico* by the pathogenicity prediction programs, Mutation Taster, PolyPhen-2, PROVEAN and SIFT, to help assess the damaging effect.

Mutation confirmation

Sanger sequencing was performed using an ABI 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to confirm the DNA variants derived from the NGS. Sequence variants were compared with those on the dbSNP, 1000 Genomes, PAH mutation and PNDdb (formerly BIOMDB) databases. Additionally, enzyme activity analysis and SDS-PAGE were performed to confirm the phenotype in newly studied cases.

RESULTS

After NGS, an average of 300 000 unique reads were obtained per sample resulting in a median sequence depth of about 100-fold, with an average enrichment efficiency of >90%.

Several types of disease-causing genetic aberrations were present in the assayed DNA samples including single nucleotide substitutions, multiple nucleotide substitutions and small indels (1–8 nucleotides).

In the 16 samples from the validation cohort with known mutations, we detected the same mutations by NGS, except in one case and this was attributable to an error (discussed below) in the technique (Table 2).

On the other hand, we detected pathogenic mutations in all nine samples from patients with unclassified CHA and the carrier of the Hb variant (Table 3). In four patients with a suspicion of RBC membrane defects (Table 3, Cases 1–4), we found a mutation in

Table 2. Previously known mutations in validation samples

Sample ID	Clinical diagnosis	Affected gene	Location	Previously known mutation	Amino acid change	Zygoty	Found by NGS
003	G6PD deficiency	<i>G6PD</i>	chrX:153762634	c.653C>T	p.Ser218Phe	Heterozygous	+
006	G6PD deficiency	<i>G6PD</i>	chrX:153763492	c.292C>A	p.Val198Met	Compound heterozygous	+
008	G6PD deficiency	<i>G6PD</i>	chrX:153764217	c.466A>G	p.Asn156Asp	Hemizygous	+
010	Hb D	<i>HBB</i>	chrX:153764154	c.352_354delTTC	p.Phe118del	Heterozygous	+
011	β -Thalassaemia minor	<i>HBB</i>	chr11:526908	c.364G>C	p.Glu122Gln	Heterozygous	+
012	Hb S	<i>HBB</i>	chr11:5247992	c.126_129delCTTT	p.Phe42Leufs*19	Homozygous	+
022	β -Thalassaemia major	<i>HBB</i>	chr11:5248232	c.20A>T	p.Glu7Val	Compound heterozygous	+
			chr11:5248004	c.118C>T	p.Gln40Ter	Compound heterozygous	+
026	Hb Johnstown	<i>HBB</i>	chr11:5248050	c.93-21G>A	Intronic Variation	Heterozygous	+
029	G6PD deficiency	<i>G6PD</i>	chr11:5246944	c.328G>C	p.Val110Leu	Heterozygous	+
030	G6PD deficiency	<i>G6PD</i>	chrX:153762604	c.683G>A	p.Arg228His	Hemizygous	+
033	HbC/ β -thalassaemia minor	<i>HBB</i>	chrX:153760909	c.1250G>A	p.Arg417His	Hemizygous	+
			chr11:5248154	C.92+6T>C	Intronic variation	Compound heterozygous	+
			chr11:5248233	C.19G>A	P.Glu7Lys	Compound heterozygous	+
C01	β -Thalassaemia	<i>HBB</i>	chr11:5246857	c.404_405delITG	p.Val135Glyfs*5	Compound heterozygous	+
			chr11:5246866	c.411_414delITGTG	p.Val138Leufs*158	Compound heterozygous	+
C03	Pyruvate kinase deficiency	<i>PKLR</i>	chr11:155271258	c.-72A>G	Promoter region	Homozygous	+
C04	β -Thalassaemia minor	<i>HBB</i>	chr11:5248154	c.92+6T>C	Intronic variation	Heterozygous	+
C05	Pyruvate kinase deficiency	<i>PKLR</i>	chr11:155264079	c.1063A>G	p.Met355Val	Compound heterozygous	ND
			chr11:155264080	c.1064T>C	p.Met355Thr	Compound heterozygous	ND
C06	Congenital dyserythropoietic anaemia	<i>GATA1</i>	chrX:48651700	c.866A>G	p.His289Arg	Heterozygous	+

Table 3. Mutations identified in patients with unclassified CHA

Case	Gene	Location	Transcript	Mutation (Human Gene Mutation Database accession)	Amino acid change	Zygoty
1	<i>SPTB</i>	chr14:65271790	NM_001024858.2	c.167A>G	p.Gln56Arg	Heterozygous
2	<i>ANK1</i>	chr8:41554038	NM_000037	c.2803C>T	p.Arg935Ter	Heterozygous
3	<i>SLC4A1</i>	chr17:42335386	NM_000342.3	c.1250T>C	p.Leu417Pro	Heterozygous
4	<i>EPB41</i>	chr1:29359718	NM_001166005.1	c.1326T>A	p.Tyr442Ter	Heterozygous
5*	<i>ADAMTS13</i>	chr9:136319562	NM_139025.4	c.3070T>G (CM012893)	p.Cys1024Gly	Homozygous
7*	<i>GPI</i>	chr19:34890912	NM_000175.3	c.1648A>G (CM065245)	p.Lys550Glu	Homozygous
8	<i>GPI</i>	chr19:34857716 chr19:34887530	NM_000175.3	c.242G>A c.1238_1238delA	p.Arg81Glnp. Gln413Arg fs*24	Compound heterozygous
9*	<i>TPII</i>	chr12:6978338	NM_000365.5	c.315G>C (CM860016)	p.Glu105Asp	Homozygous
10	<i>GSS</i>	chr20:33524782 chr20:33530408	NM_000178.2	c.374G>T c.653T>G	p.Arg125Leu p.Phe218Cys	Compound heterozygous

*Previously reported to be pathogenic.

related genes (*SPTB*, *ANK1*, *SLC4A1* and *EPB41*). In the patient with abnormal *ADAMTS13* activity and TM (Table 3, Case 5), we detected a mutation in the *ADAMTS13* gene. Further, the four patients with CHA and no distinctive morphologic features (Table 3, Cases 7–10) showed mutations in various different enzyme genes, two of them previously reported (Cases 7 and 9). Lastly, the patient with a variant in *HBB* (Table 3, Case 6) was identified as having Hb-D Punjab [19]. Table 4 summarizes the characteristics of the patients included in the study.

In the four sequenced patients with clinical features of RBC membrane defects (Cases 1–4), we found novel pathogenic mutations. Case 1 had a mutation in the *SPTB* (spectrin beta) gene: c.167A>G (p.Gln56Arg), in heterozygosis. Morphological features in the proband (Case 1) were consistent with HS and cryohaemolysis, and eosin 5-maleimide binding tests were also positive. In Cases 2, 3 and 4, mutations at the heterozygous state were detected in ankyrin (*ANK1*), band-3 (*SLC4A1*) and protein 4.1 (*EPB41*), respectively (*ANK1*: p.Arg935Ter; *SLC4A1*: p.Leu417Pro; and *EPB41*: p.Tyr442Ter). All these cases were confirmed by Sanger sequencing and SDS-PAGE of membrane proteins. Moreover, affected family members with CHA were tested and the same mutation was observed in them.

Case 5 was a 3-year-old girl with anaemia and thrombocytopenia. A blood smear revealed the presence of schistocytes and *ADAMTS13* activity levels below 5%, without anti-*ADAMTS13* antibodies. We detected the c.3070T>G (p.Cys1024Gly) mutation in the *ADAMTS13* gene in homozygosis, previously reported to be causative of Upshaw–Schulman syndrome [13]. Her parents were cousins and were also sequenced by the Sanger method. They both had the same variation in heterozygosis in the *ADAMTS13* gene.

In Case 6, NGS enabled us to identify the Hb-D variant, due to a specific mutation in the *HBB* gene (p.Glu122Gln).

In the remaining four cases (Cases 7–10), we identified mutations related to enzyme-deficiency haemolytic anaemia. All these were confirmed by Sanger sequencing and measurement of low enzyme activity. Cases 7 and 9 showed mutations in homozygosis corresponding to previously reported variations in the *GPI* (p.Lys550Glu) and *TPII* (p.Glu105Asp) genes, respectively. In Case 9, we confirmed the presence of variation in the *TPII* gene in both parents in heterozygosis. Cases 8 and 10 showed novel mutations in compound heterozygosis in the *GPI* (p.Arg81Gln; Gln413Argfs*24) and *GSS* (p.Arg125Leu; Phe218Cys) genes. None of the parents of proband

Table 4. Characteristics of the patients included in the study

Case	Hb level (g/dL)	Reticulocyte count (%)	Lactic acid dehydrogenase level (U/L)	Total bilirubin (mg/dL)	RBC morphology	Haemoglobin electrophoresis pH 8.6	Eosin-5'-maleimide binding test	Osmotic fragility	Enzyme levels
1	11.1	11.4	301	2	Spherocytosis	Normal	Positive	High	PK: Normal G6PD: Normal
2	7.3	14.1	577	1.1	Spherocytosis	Normal	Positive	High	NP
3	16	2.3	240	1.7	Spherocytosis	Normal	positive	High	NP
4	14	2.7	215	1	Elliptocytosis	Normal	Negative	Slightly high	NP
5	9.7	1.6	685	1	Schistocytes	Normal	NP	NP	ADAMTS13 undetectable
6	13.6	1.5	221	0.9	No alterations	Slow migration band not identified 41%	NP	NP	NP
7	7.1	11.3	1497	7.9	Basophilic stippling	Normal	NP	Normal	GPI: 4.16 UI/g Hb (46-66)
8	13.5	4.1	169	1	No alterations	Normal	NP	Normal	GPI: 5.9 UI/g Hb (46-66)
9	9.2	18	386	2.6	Equinocytes, dacrocytes	Normal	Negative	Normal	TPI: 395 UI/g Hb (1361-2769) PK: Normal
10	12.8	6	192	0.8	No alterations	Normal	Negative	Normal	5-oxoproline in urine: 46. 4 mmol/mol creatinine Reduced Glutathione: 9.37 mg/dL RBC (54.7-82.7)

NP, not performed.

cases showed features of haemolytic anaemia. In Cases 7 and 8, a glucose phosphate isomerase (GPI) assay was also performed, finding around 10-fold lower activity in the patients than in a healthy control (Case 7: 4.16 IU/g Hb, Case 8: 5.9 IU/g Hb, control: 54.0 IU/g Hb). In Case 10, levels of 5-oxoproline in urine and reduced glutathione in blood were measured and found to be notably lower than normal (46.4 mmol/mol creatinine, normal range: 26–63; and 9.37 mg/dL RBC, normal range: 54.7–82.7, respectively).

DISCUSSION

We have successfully applied our NGS method, using a novel targeted gene panel to identify the underlying genetic cause in cases of nondiagnosed CHA where standard testing had been unable to provide a definitive diagnosis or was not available. The current approach to the genetic diagnosis of CHA disorders involves Sanger sequencing of the coding region of genes known to be involved in pathogenicity. This process is slow, iterative, costly, and in many cases, still fails to identify the underlying genetic cause. Recent developments in NGS now allow its utilization in a practical, manageable and cost-efficient manner and have enabled our group to establish a platform for sequencing 40 candidate genes related to CHA in parallel, for the first time, and hence in a faster and cheaper way. We confirmed the presence of 15/16 of known pathogenic mutations in the validation samples with the correct homozygous/heterozygous state, representing a high sensitivity of mutant allele detection (94%). In the case in which the mutation was not detected (C05), the patient had a compound heterozygous mutation located in exon 3 of the *PKLR* gene, but the specific primer failed and no amplicons were generated. This amplification error was observed repeatedly through the samples analysed, and this was resolved by using Sanger sequencing for the corresponding region. It is important to mention that the gene panel we have designed does not allow evaluation of some coding regions that remain uncovered or deep intronic mutations, and nor does it enable the identification of gene variants located in homopolymer stretches, large deletions or crossover variants, a well-known weakness of Ion PGM technology.

Molecular characterization of defects at the DNA level is essential for confirmation of the diagnosis, and

identification of a causative mutation enables proper genetic counselling and prenatal diagnosis.

In some cases, DNA sequencing may be the only way to establish a diagnosis, especially in enzyme defects, as there are no characteristic morphological features, analysis of the activity of each RBC enzyme can be laborious and high reticulocyte count or recent blood transfusions can lead to misinterpretation of results. Moreover, recessive inheritance does not allow us to identify deficiency in parents.

Likewise, there could be suspected cases of RBC membrane protein defects in which genetic studies may be helpful to rule out stomatocytosis and avoid surgical procedures such as splenectomy when they would not be appropriate.

The present work demonstrates the usefulness of our NGS panel for diagnosing CHA. Among the patients with unclassified CHA, we found four causative mutations in the *ADAMTS13*, *GPI* and *TPII* genes (Cases 5, 6, 7 and 9) which had previously been classified as deleterious [13, 20, 21]. Eight novel variants were detected in *SPTB*, *ANK1*, *SLC4A1*, *EPB41*, *GPI* and *GSS* (*GPI* and *GSS*, compound heterozygous) (Table 3). Segregation of these variants was analysed by Sanger sequencing.

We conclude that the variant in *SPTB* (Case 1) is a *de novo* mutation, because parents (clinically normal) were studied and no mutations were found; while for the *ANK1* (Case 2), *SLC4A1* (Case 3) and *EPB41* (Case 4) genes, the same variants were found in family members with CHA, indicating a dominant hereditary pattern. Two compound heterozygous cases were found in the *GPI* and *GSS* genes (Case 8 and 10, respectively), and in both cases, each variant was present in the parental genomes in heterozygosity.

In Case 1, morphological features were consistent with HS; a cryohaemolysis and eosin-5'-maleimide binding tests were also positive. Gln56 is highly conserved in mammals, and all computational tools that were checked, namely Mutation Taster, PolyPhen and SIFT, predicted this variant to be damaging. The p.Gln56Arg mutation is located in the calponin homology domain, an actin-binding domain that is found in proteins essential for the regulation of cell shape and signalling proteins [22]. This variant is not on the 1000 Genomes or dbSNP databases. All the available data lead us to believe that this variant is deleterious.

The *ANK1* variant (c.2803C>T, Case 2) is also present in the affected mother in heterozygosity. It has not been reported previously as a single nucleotide polymorphism, and all computational tools predicted that it would be 'disease causing'. This variant leads to a premature stop codon, and hence, the protein loses the 945 amino acids in the C-terminal region, including the ZU5 domain which can function as a spectrin-binding domain in ankyrin [23, 24].

The variant found in *SLC4A1* (c.1250T>C, Case 3) is present in the proband and affected members of the family (sister and daughter), and thus, we conclude that it is a novel variant not previously reported with an autosomal dominant hereditary pattern. In addition, all computational tools used predicted it to be a damaging variant [25]. The p.Leu417Pro change has not been described previously. It takes place in the transmembrane domain 1, and it has been suggested that this is one of the transmembrane domains of this protein that provides access to the extracellular medium, being negatively affected the anion exchange. Leucine is a hydrophobic amino acid that prefers to be buried in protein hydrophobic cores and in this case it is within α -helices; however, proline is unable to easily occupy many of the main-chain conformations and it can also introduce kinks into α -helices, as it is unable to adopt a normal helical conformation. Leu417 is highly conserved with a PhyloP score of 4.651 and a PhastCons score of 1. The PROVEAN score is -6.535 , indicating that the change has a damaging effect (-2.5 being considered the threshold for deleterious variants).

The EPB41 protein, together with spectrin and actin, constitutes the red cell membrane cytoskeletal network. The resulting complex plays a critical role in erythrocyte shape and deformability [26]. The variant found in *EPB41* (c.1326T>A, Case 4) is not reported in the most widely used databases and variant effect predictors indicated that it was deleterious, due to a premature stop codon that leads to the loss of 422 amino acids, obtaining a truncated protein that lacks function.

In Cases 8 and 10 with *GPI* and *GSS* deficiency, respectively, two heterogeneous alleles – compound heterozygous pattern – have been found to cause disease. This is the condition of having two heterogeneous recessive alleles at a particular locus that can cause genetic disease in a heterozygous state. Each

variant was detected in the patient's parents in heterozygosis, and none of them showed features of haemolytic anaemia. However, *GPI* and *GSS* deficiency were detected in both patients (Case 8 and 10, respectively).

In Case 8, a frameshift (c.1238_1238delA; p.Gln413Arg*24) and a missense (c.212G>A; p.Arg81Gln) variation have been found in *GPI*. The frameshift variation leads to a premature stop codon causing the loss of 111 amino acids in the C-terminal region of the protein that is a highly conserved region. It is known that C-terminal domains are crucial to the sugar ring-opening step catalysed by this enzyme. As the isomerization activity occurs at the dimer interface, the dimer structure of this enzyme is critical to its catalytic function [27]. In addition, this variant was not found in either the Exome Aggregation Consortium or 1000 Genomes databases and all predictive software used classified it as deleterious. In this patient, a missense variant of the other allele was found, this conversion of arginine 81 to glutamine has a pretty low allele frequency (Minor Allele Frequency: 0.0002) and was classified as damaging by the bioinformatics tools that were used, with a PROVEAN score of -3.163 .

Finally, in Case 10, the *GSS* gene has two variants, both missense, in a heterozygous state. Variants in arginine 125 were previously reported to be pathological in the Human Gene Mutation Database (CM960786 –p.Arg125Cis- and CM052884 –p.Arg125His-). This amino acid is highly conserved; being a substrate binding site with PhyloP and PhastCons scores of 6.003 and 0.987, respectively, the variation p.Arg125Leu gives a PROVEAN score of -6.007 . The other mutation p.Phe218Cys has not previously been described and nor is it found in the Exome Aggregation Consortium ExAC or 1000 Genomes databases, but it is predicted to be pathogenic by all *in silico* predictive tools that were checked. This amino acid is also highly conserved with PhyloP and PhastCons scores of 4.648 and 1, respectively.

In conclusion, we have presented an innovative specific targeted gene panel based on NGS platforms for the diagnosis of patients with CHA and described several cases illustrating the utility of this approach. The findings of this study demonstrate that our custom NGS panel is an efficient and effective method for the diagnosis of CHA and that this technology has matured sufficiently for use in clinical laboratories.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author was supported by a grant from BBK – Bio-Cruces (BBK-BC/POST-MIR1250T/2015/001).

CONFLICT OF INTERESTS

All the authors of this article declared that they have no conflict of interests.

REFERENCES

- Clarke GM, Higgins T. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000;46:1284–90.
- Christensen RD, Nussenzeig RH, Yaish HM, Henry E, Eggert LD, Agarwal AM. Causes of hemolysis in neonates with extreme hyperbilirubinemia. *J Perinatol* 2014;34:616–9.
- Shooter C, Rooks H, Lay S, Clark B. Next generation sequencing identifies a novel rearrangement in the HBB cluster permitting to-the-base characterization. *Hum Mutat* 2015;36:142–50.
- Hassan S, Vosses R, Chessa R, de Dunnes J, Bakker E, Giordano P, Hartevelde C. Molecular diagnostics of HBB gene in an Omani cohort using bench-top DNA Ion Torrent PGM technology. *Blood Cells Mol Dis* 2014;53:133–7.
- Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med* 2010;12:61–76.
- Koralkova P, Van Solinge WW, Van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia – pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol* 2014;36:388–97.
- King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, Bianchi P, Lee SH, Zanella A, International Council for Standardization in Haematology ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol* 2015;37:304–25.
- Bolton-Maggs P, Langer J, Iolascon A, Tittensor P, King M. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol* 2012;156:37–49.
- Ameziane N, Sie D, Dentre S, Ariyurek Y, Kerkhoven L, Joenje H, Dorsman JC, Ylstra B, Gille JJ, Sistermans EA, de Winter JP. Diagnosis of fanconi anemia: mutation analysis by next-generation sequencing. *Anemia* 2012;2012:132856.
- Iolascon A, Esposito MR, Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica* 2012;97:1786–94.
- Iolascon A, Russo R, Delaunay J. Congenital dyserythropoietic anemias. *Curr Opin Hematol* 2011;18:146–51.
- Campistol JM, Arias M, Ariceta G, Blasco M, Espinosa L, Espinosa M, Grinyó JM, Macía M, Mendizábal S, Praga M, Román E, Torra R, Valdés F, Vilalta R, Rodríguez de Córdoba S. An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia* 2015;35:421–47.
- Lotta L, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F. ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Mutat* 2010;31:11–9.
- McDonald CJ, Ostini L, Wallace DF, Lyons A, Crawford DH, Subramaniam VN. Next-generation sequencing: application of a novel platform to the analysis of atypical iron disorders. *J Hepatol* 2015;63:1288–93.
- Zhang J, Barbaro P, Guo Y, Alodaib A, Li J, Gold W, Adès L, Keating BJ, Xu X, Teo J, Hakonarson H, Christodoulou J. Utility of next-generation sequencing technologies for the efficient genetic resolution of haematological disorders. *Clin Genet* 2016;89:163–72.
- Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1932–41.
- Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014;30:418–26.
- Smith A, Boycott KM, Jarinova O. Lake Louise mutation detection meeting 2013: clinical translation of next-generation sequencing requires optimization of workflows and interpretation of variants. *Hum Mutat* 2014;35:265–9.
- Torres LS, Okumura JV, Silva DG, Bonini-Domingos CR. Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37:120–6.
- Repiso A, Oliva B, Vives-Corrons JL, Beutler E, Carreras J, Climent F. Red cell glucose phosphate isomerase (GPI): a molecular study of three novel mutations associated with hereditary nonspherocytic haemolytic anemia. *Hum Mutat* 2006;27:1159.
- Pekrun A, Neubauer BA, Eber SW, Lakomek M, Seidel H, Schröter W. Triosephosphate isomerase deficiency: biochemical and molecular genetic analysis for prenatal diagnosis. *Clin Genet* 1995;47:175–9.
- An X, Debnath G, Guo X, Liu S, Lux SE, Baines A, Gratzner W, Mohandas N. Identification and functional characterization of protein 4.1R and actin-binding sites in erythrocyte beta spectrin: regulation of the interactions by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 2005;44:10681–8.
- Mohler PJ, Yoon W, Bennett V. Ankyrin-B targets beta2-spectrin to an intracellular compartment in neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004;279:40185–93.
- Steiner JP, Bennett V. Ankyrin-independent membrane protein-binding sites for brain and erythrocyte spectrin. *J Biol Chem* 1988;263:14417–25.
- Barneaud-Rocca D, Etchebest C, Guizouarn H. Structural model of the anion exchanger 1 (SLC4A1) and identification of transmembrane segments forming the transport site. *J Biol Chem* 2013;288:26372–84.
- Parra M, Gascard P, Walensky LD, Snyder SH, Mohandas N, Conboy JG. Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family. *Genomics* 1998;49:298–306.
- Cordeiro AT, Godoi PH, Silva CH, Garratt RC, Oliva G, Thiemann OH. Crystal structure of human phosphoglucose isomerase and analysis of the initial catalytic steps. *Biochim Biophys Acta* 2003;1645:117–22.

Hereditary xerocytosis, a misleading anemia

R. Del Orbe Barreto¹ · B. Arrizabalaga^{1,2} · A. B. De la Hoz Rastrollo¹ ·
A. García-Orad^{1,3} · I. Gonzalez Vallejo⁴ · C. Bento⁵ · A. Villegas⁶ · J. C. García-Ruiz^{1,2}

Received: 18 May 2016 / Accepted: 28 May 2016 / Published online: 1 June 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Dear Editor,

Hereditary xerocytosis (HX), formally known as hereditary dehydrated stomatocytosis, is an autosomal dominant congenital hemolytic anemia associated with a leak of intracellular potassium usually accompanied by increased mean corpuscular hemoglobin (Hb) concentration [1]. Gain-of-function mutations in *PIEZO1*, encoding a mechanosensitive cation channel, and deleterious mutations of *KCNN4*, encoding the Gardos channel, have been implicated in its pathogenicity [2]. Clinical manifestations may be slight and includes well-compensated hemolysis and iron overload [3]. In fact, HX can be detected from different syndromes as familial hyperkalemic hypertension [4], hepatosiderosis [5], or MDS [6].

Here, we report a case of a young woman misdiagnosed with unclassifiable congenital dyserythropoietic anemia, in

which we identified a missense mutation in *PIEZO1* gene causing HX.

A 35-year-old woman of Spanish origin initially presented at the age of 16 years with mild macrocytic anemia (Hb 125 g/L and MCV 125 fL) with reticulocytosis (89.000/ μ L) and unconjugated hyperbilirubinemia (1.9 mg/dL). Abdominal echography demonstrated asymptomatic cholelithiasis. Further studies revealed hyperferritinemia (ferritin 476 ng/mL, transferrin saturation index 55 %) with normal iron liver concentration measured by magnetic nuclear resonance (20 μ mol/g). The blood film showed anisocytosis, macrocytosis, polychromatophilia, and isolated basophilic stippling. A bone marrow aspirate showed a hypercellular marrow with dyserythropoietic and megaloblastic traits. Cytogenetics revealed a normal karyotype (46, XX).

Targeted sequencing focused on genes that causes congenital hemolytic anemia revealed a missense mutation in *PIEZO1* in heterozygous state (c.7505A>G; p.Lys2502Arg. dbSNP: rs34830861). The found variation was analyzed in silico by the pathogenicity prediction programs: Mutation Taster, PolyPhen-2, and SIFT to help assess the damaging effect, predicting to be disease causing. To confirm the pathogenicity of this mutation, the intracellular concentration of potassium and sodium was measured (Table 1). Additionally, osmotic gradient ektacytometry was performed showing an abnormal curve shifted to the left, and an increased heat stability of membrane was observed. These findings supported the diagnosis of HX. Informed consent was obtained from the patient for being included in the study.

Our case demonstrates the genotype/phenotype relationship of the mutation p.Lys2502Arg in *PIEZO1* as

✉ R. Del Orbe Barreto
rafaelandres.delorbebarreto@osakidetza.eus

¹ Instituto de Investigación Sanitaria BioCruces, Plaza de Cruces s/n, 48903 Barakaldo, Spain

² Servicio de Hematología, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain

³ Departamento de genética, antropología física y fisiología animal, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Bizkaia, Spain

⁴ Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Araba, Vitoria-Gasteiz, Spain

⁵ Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁶ Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Madrid, Spain

Table 1 Cation levels and transmembrane flux in red blood cells (RBC)

	Patient	Normal control
RBC potassium	77.4 mmol/L	100.0 mmol/L
RBC sodium	12.5 mmol/L	10.8 mmol/L
Intracellular water	72 %	77 %
Passive net flux	-1.00 mmol/L RBC/h ^a	0.90 mmol/L RBC/h
Active net flux	-0.92 mmol/L RBC/h ^a	0.08 mmol/L RBC/h
Na ⁺ /K ⁺ pump activity	1.38	1.62

Measurement of erythrocyte monovalent cation levels was performed in a photometer Llama-Beckman model 105. Samples of whole blood in EDTA were collected from the patient and a nonrelated control

^aNegative values

causative of HX and reflects the importance of keeping in mind this emulator pathology.

Acknowledgments The author was supported by a grant from BBK - BioCruces (BBK-BC/POST-MIR/2015/001).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, Auriemma C, Russo R, De Falco L, Vallefucio F, Esposito MR, Vanderpe DH, Shmukler BE, Narayan R, Montanaro D, D'Armiento M, Vetro A, Limongelli I, Zuffardi O, Glader BE, Schrier SL, Brugnara C, Stewart GW, Delaunay J, Iolascon A (2013) Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood* 121(19):3925–35, S1-12
2. Layton DM, Bain BJ (2016) Dehydrated hereditary stomatocytosis. *Am J Hematol* 91(2):266
3. Delaunay J (2004) The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations. *Semin Hematol* 41(2):165–72
4. Beaurain G, Mathieu F, Grootenboer S, Fiquet B, Cynober T, Tchernia G, Delaunay J, Jeunemaitre X (2007) Dehydrated hereditary stomatocytosis mimicking familial hyperkalaemic hypertension: clinical and genetic investigation. *Eur J Haematol* 78(3):253–9
5. Syfuss PY, Ciupea A, Brahim S, Cynober T, Stewart GW, Grandchamp B, Beaumont C, Tchernia G, Delaunay J, Wagner JC (2006) Mild dehydrated hereditary stomatocytosis revealed by marked hemosiderosis. *Clin Lab Haematol* 28(4):270–4
6. Paessler M, Hartung H (2015) Dehydrated hereditary stomatocytosis masquerading as MDS. *Blood* 125(11):1841



Letter to the Editor

Severe neonatal jaundice due to a *de novo* glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient mutation

Sir, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most common human enzyme deficiency worldwide and has long been associated with reduced-efficiency erythrocytes [1]. Acute haemolysis induced by exposure to oxidative stress, related to infection, drugs or fava bean ingestion, is the most frequent clinical presentation; however, G6PD class I deficiency causes chronic haemolysis and could be a major contributor to neonatal hyperbilirubinemia [2]. To date, various different mutations in *G6PD* gene have been identified, most frequently on exon 10 and a minor cluster on exons 6, 7 and 8 [3]. Most of these mutations lead to amino acid replacements close to the dimer interface within the 'structural' NADP⁺-binding site, suggesting that the integrity of these regions is very important for the formation of stable dimers [4, 5]. The present letter reports a case of a newborn infant with severe class I G6PD deficiency associated with a *de novo* *G6PD* mutation.

The patient was a male, born at 39 weeks by Caesarean section (second pregnancy). The parents of Spanish origin were nonconsanguineous, and no family members had a history of anaemia or jaundice. A few hours after birth, he developed clinical respiratory distress accompanied by skin pallor, jaundice, hepatomegaly and splenomegaly. Blood tests showed a haemoglobin (Hb) level of 90 g/L, total bilirubin level of 11.2 mg/dL (normal 1–12 mg/dL) and direct bilirubin level of 4.4 mg/dL. A peripheral blood smear did not reveal spherocytes. Phototherapy and an exchange transfusion were needed at 15 h of life to treat severe hyperbilirubinemia (17.4 mg/dL). The patient was discharged after 21 days, with a probable diagnosis of ABO incompatibility (proband blood group A RhD⁺, mother: O RhD⁺, slightly positive direct antiglobulin test).

At 6 weeks of life, follow-up blood tests showed persistence of regenerative anaemia with Hb 72 g/L, reticulocyte count $328 \times 10^3/\mu\text{L}$, total bilirubin 0.5 mg/dL, lactate dehydrogenase 213 U/L (5–510), haptoglobin

58 mg/dL (50–200) and no spherocytes, and signs of oxidative stress or other pathological findings were observed in the blood smear. Analysis of enzyme activity showed reduced G6PD activity (145 mU/ 10^9 red blood cells; normal value: 221–570 mU/ 10^9 red blood cells). The direct antiglobulin test was negative, neurological status was normal and physical examination did not reveal splenomegaly. Subsequently, baseline Hb levels stabilized at 90 to 120 g/L and reticulocytes at $180 \times 10^3/\mu\text{L}$, while bilirubin levels normalized without transfusions, also a second assay of G6PD activity confirmed severe deficiency (30 mU/ 10^9 red blood cells). At 9 months old, the patient was admitted to hospital with haemolytic anaemia (Hb 55 g/L, reticulocytes $196 \times 10^3/\mu\text{L}$, lactate dehydrogenase 2250 U/L, total bilirubin 1.2 mg/dL) secondary to an infectious process and received a single-unit red blood cell transfusion.

Genetic studies were performed after informed consent. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of the proband and mother, using standard methods. The *G6PD* gene was amplified by polymerase chain reaction from exon 2 to 13, amplified in genomic DNA of the proband and mother, and analysed by direct sequencing with the dideoxy chain termination reaction using an ABI PRISM 3130 Genetic Analyser and BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequencing analysis of the *G6PD* gene on the proband revealed a previously described cytosine-to-thymine transition at position c.827 on exon 8, resulting in an amino acid change (proline to leucine) at the residue 276 (c.827C>T; p.Pro276Leu). This mutation was absent in genomic DNA from the proband's mother. The degree of mosaicism for the identified mutation was assessed by bidirectional sequencing in independent DNA samples from the proband obtained from peripheral blood containing EDTA buccal cells and hair. Sequencing confirmed the results previously obtained with the peripheral blood DNA and did not reveal a double peak at the mutation site (Figure 1). Human leukocyte antigen – short tandem repeat markers were analysed in the proband and his mother using Luminex (Gen-Probe

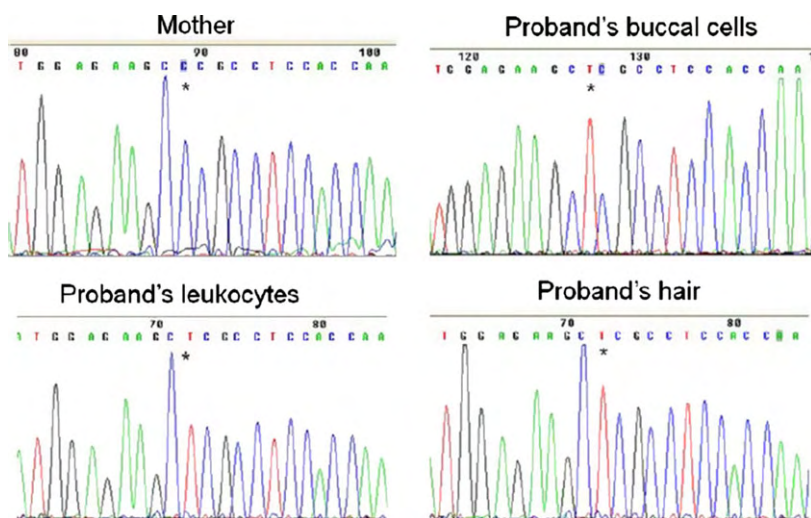


Figure 1. Sanger sequencing of genomic DNA obtained from proband's leukocytes, buccal cells and hair and from mother's leukocytes. Note the nucleotide substitution at 827 position marked by a black star (wild type Cytosine by Thymine). Sequence did not reveal mosaicism in the proband.

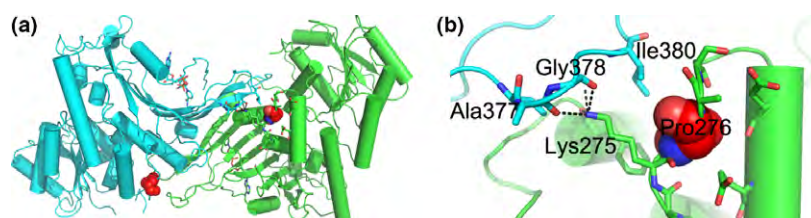


Figure 2. Structure of the human G6PD dimer. (a) Overall cartoon representation of G6PD dimer (G6PD subunits are coloured in green and blue). The mutated residue Pro276, is located at the intermonomer interface and is represented as red spheres). The structural NADP⁺ is shown as stick models. (b) Close view of the mutation site, showing the interacting residues in adjacent subunits. Hydrogen bonds are represented as black dashed lines. The figure was prepared with PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.) using the co-ordinates of the human G6PD Canton mutant IQKI [5].

Transplant Diagnostics, Stamford, CT, USA) to confirm the mother-child relationship.

The c.827C>T mutation being observed in the proband and absent in his mother suggests that this is a spontaneously occurring new genetic alteration. The absence of mosaicism in the proband DNA samples suggests that this "*de novo*" event could have occurred in the very early stages of embryogenesis or in the mother's germ cell lines. Pro276 is a strictly conserved residue located in the loop between helices i2 and j, located in the $\alpha + \beta$ subdomain of G6PD, within the structural NADP⁺ binding region (Figure 2). This residue is exposed at the dimer interface, in a region where several variants associated with class 1 G6PD deficiency are clustered [6]. The loop where Pro276 is located stacks against a long loop in the adjacent monomer that connects strands K and L from the central antiparallel β -sheet, which harbours the structural NADP⁺ binding site (Figure 2). In

particular, Pro276 establishes van der Waals contacts with the side chain of Ile380. The presence of a conserved proline at this position is likely to be required to fix the conformation of this loop in a position that favours conserved polar interactions with the adjacent monomer (e.g. Lys275 interaction with the main chain of Ala377 and Gly378). This mutation, p.Pro276Leu, will presumably interfere with G6PD dimer stability, as insertion of a larger leucine residue at this position would cause steric hindrance forcing the loops on adjacent monomers to move apart. This same G6PD mutation c.827C>T (p.Pro276Leu), denominated variant Hamburg, was previously described in a Caucasian neonate with severe neonatal cholestasis and chronic nonspherocytic haemolytic anemia [7]. In addition, a variant called G6PD Sugao c.826C>T (p.Pro276Ser) was previously described affecting the same amino acid in a G6PD-deficient patient with severe jaundice and anaemia at birth,

requiring transfusions [6]. In both cases, the mothers of the proband were heterozygous for that specific mutation.

Neonatal indirect hyperbilirubinemia is an emergency requiring prompt therapeutic attention and can be due to rare sporadic G6PD mutations. For this reason, clinicians should be aware of this aetiology.

R. Del Orbe Barreto*, B. Arrizabalaga*[†], A. B de la Hoz*, P. Aragües[†], J. C. Garcia-Ruiz*[†], A. Arrieta[‡], R. Adán[§], L. Manco^{¶,***}, S. Macedo-Ribeiro^{††}, C. Bento[¶], M. L. Ribeiro[¶]

*BioCruces Health Research Institute, Barakaldo, Spain

[†]Servicio de Hematología, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain

[‡]Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain

[§]Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain

[¶]Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

^{***}CIAS/Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

^{††}Protein Crystallography Group, Institute for Molecular and Cell Biology (IBMC), Universidade do Porto, Porto, Portugal

E-mail: rafaelandres.delorbebarreto@osakidetza.net

doi: 10.1111/ijlh.12455

References

1. Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ. Glucose - 6 -phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:21–38.
2. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype -phenotype association. *Blood Rev* 2007;21:267–83.
3. Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the “old” and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2012;48:154–65.
4. Naylor CE, Rowland P, Basak AK, Gover S, Mason PJ, Bautista JM, Vulliamy TJ, Luzzatto L, Adams MJ. Glucose 6 - phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. *Blood* 1996;87:2974–82.
5. Au SWN, Gover S, Lam VMS, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure Fold Des* 2000;8:293–303.
6. Taki M, Hirono A, Kawata M, Den M, Kurihara Y, Shimizu H, Yamada K, Fujii H, Miwa S. A new glucose - 6 -phosphate dehydrogenase variant G6PD Sugao (826C ->T) exhibiting chronic hemolytic anemia with episodes of hemolytic crisis immediately after birth. *Int J Hematol* 2001;74:153–6.
7. Kordes U, Richter A, Santer R, Schäfer H, Singer D, Sonntag J, Steuerwald U, Schneppenheim R, Janka G. Neonatal cholestasis and glucose - 6 - P -dehydrogenase deficiency. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:758–60.

