



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización de variantes en el exón 28 del gen *VWF* y su correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con enfermedad de Von Willebrand tipo 2

Laura Katherine Parada Ferro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Morfología
Bogotá D.C., Colombia
2024

Caracterización de variantes en el exón 28 del gen VWF y su correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con enfermedad de Von Willebrand tipo 2

Laura Katherine Parada Ferro

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para
optar al título de:

Magister en Genética Humana

Director:

Juan José Yunis Londoño, MD, MSc

Codirector:

Teresa Adriana Linares Ballesteros, MD

Línea de Investigación:

Alteraciones moleculares en Trombofilias y Hemofilias.

Grupo de Investigación:

Patología Molecular

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Genética Humana
2024

Caracterización de variantes en el exón 28 del gen VWF y su correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con enfermedad de Von Willebrand tipo 2

Co investigadores

Laura Katherine Parada Ferro

Dr. Juan José Yunis Londoño

Dra. Adriana Linares Ballesteros

Dra. Claudia Patricia Casas Patarroyo

Dra. Luz Karime Yunis Hazbun

Jefe de Enfermería Andrea Dabeiba Rodríguez Fiquitiva

Jefe de enfermería. Claudia Suarez Molano.

Este proyecto es una Colaboración entre la Clínica Infantil Colsubsidio, Universidad Nacional (Maestría en genética Humana) y Servicios Médicos Yunis Turbay y Cia SAS

Agradecimientos

Al Dr. Juan Jose Yunis Londoño por la confianza brindada, guía y apoyo durante todo el proceso de realización de la tesis.

A las Dras. Adriana Linares y Claudia Patricia Casas por sus guía y disposición para guiarme durante el proceso

A la Dra. Luz Karime Yunis por su paciencia y disponibilidad para el entrenamiento en el proceso de laboratorio

A las jefes Andrea Dabeiba Rodríguez Fiquitiva, Claudia Suarez Molano y todo el personal de enfermería que colaboro en la toma y recolección de las muestras

Al equipo de Biología Molecular de Servicios Médicos Yunis Turbay quienes me brindaron su apoyo y acompañamiento con las dudas generadas en el procesamiento de las muestras

A los profesores de la maestría en genética humana por todas las enseñanzas y experiencias.

Al Instituto de Genética Humana y Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia por todo el proceso que se llevó en la maestría

A mi familia, mi madre, hermana y sobrina por el apoyo emocional durante todo este tiempo y más importante a Dios por permitirme culminar mis estudios y llevar a cabo mis metas

RESUMEN

Caracterización de variantes en el exón 28 del gen VWF y su correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con enfermedad de Von Willebrand tipo 2

Objetivo: Caracterizar las variantes en el exón 28 del gen VWF y realizar la correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con Enfermedad de Von Willebrand tipo 2 en una institución de la ciudad de Bogotá D.C Colombia.

Metodología: Se analizaron 20 muestras de pacientes previamente diagnosticados con Enfermedad de Von Willebrand tipo 2 con edades entre 8 y 56 años, que asisten al programa de Hemofilia de la Clínica Infantil Colsubsidio. Se realizó análisis del Exón 28 del gen VWF, por amplificación, verificación por electroforesis en geles de agarosa y secuenciación con el Kit Big Dye Terminator V3.1 Para el análisis de las secuencias e identificación de las variantes se utilizó la secuencia de referencia, bases de datos y literatura.

Resultados y conclusiones: Se identificó la variante patogénica en 15 de los 17 (88.2%) pacientes no relacionados analizados. En total, se identificaron 9 variantes patogénicas en la cohorte de pacientes analizados. La variante p.Gly1609Arg fue identificada en el 52.9% de los pacientes analizados (n=9) sola o en combinación, seguido en frecuencia por p.Ile1425Phe (n=3), y p.Ala1437Thr (n=3) sola o en combinación, 1 paciente con p.Arg1597Trp y otro con p.Arg1334Trp. Adicionalmente, en el 31.6% (n=6) de los pacientes se identificaron dos variantes patogénicas (2 pacientes comp.Gly1609Arg/p.Ala1437Thr; 1 paciente p.Gly1609Arg/p.Ser1506Leu; 1 paciente p.Gly1609Arg/p.Arg1597Trp; 1 paciente p.Gly1609Arg/p.Val1279Phe; y 1 paciente p.Ile1628Thr/p.Ser1325Phe). No se identificó variante en 2 pacientes (11.8%). Se pudo reclasificar el subtipo EvW tipo 2 en el 40% (n=8) de pacientes. En el 15% (n=3) no tenían estudios de laboratorio como el análisis de multímeros para su correcta correlación.

Este es el primer estudio realizado en el país, el cual permitió identificar la causa genética de EvW por primera vez en Colombia mediante la secuenciación de exones específicos

en una cohorte de seguimiento, realizar una correlación genotipo-fenotipo y brindar asesoramiento genético a los pacientes y sus familias.

Palabras Clave: Enfermedad de Von Willebrand, Factor vWF, exón 28, Colombia

ABSTRACT

Characterization of variants in exon 28 of the VWF gene and their genotype-phenotype correlation in a sample of patients with von Willebrand disease type 2.

Objective: Characterize the variants in exon 28 of the VWF gene and perform the genotype-phenotype correlation in a sample of patients with Von Willebrand Disease type 2 in an institution in the city of Bogotá D.C. Colombia.

Methodology: 20 samples of patients previously diagnosed with VWF were analyzed. Von Willebrand's disease type 2 between 8 and 56 years old, attending the Hemophilia program of the Clinica Infantil Colsubsidio. DNA isolation was performed from peripheral blood for subsequent amplification and purification of fragments of Exon 28 of the VWF gene, verification by electrophoresis in agarose gels and sequencing with the Big Dye Terminator V3.1 Kit. For the analysis of the sequences and identification of variants, the reference sequence, databases and literature were used.

Results and conclusions: with the Big Dye Terminator V3.1 kit in an ABI 3500 genetic analyzer.

The pathogenic variant was identified in 15 of the 17 (88.2%) unrelated patients analyzed. In total, 9 pathogenic variants were identified in the cohort of patients analyzed. The p.Gly1609Arg variant was identified in 52.9% of the patients analyzed (n=9) alone or in combination, followed in frequency by p.Ile1425Phe (n=3), and p.Ala1437Thr (n=3) alone or in combination, 1 patient with p.Arg1597Trp and another with p.Arg1334Trp. Additionally, two pathogenic variants were identified in 31.6% (n=6) of patients (2 patients with p.Gly1609Arg/p.Ala1437Thr; 1 patient p.Gly1609Arg/p.Ser1506Leu; 1 patient p.Gly1609Arg/p.Arg1597Trp; 1 patient p.Gly1609Arg/p.Val1279Phe; and 1 patient p.Ile1628Thr/p.Ser1325Phe). No variant was identified in 2 patients (11.8%). It was possible to reclassify the EvW type 2 subtype in 40% (n=8) of patients. In 15% (n=3) they did not have laboratory studies such as multimer analysis for correct correlation.

This is the first study performed in the country, which made it possible to identify the genetic cause of EvW for the first time in Colombia by sequencing specific exons in a follow-up cohort, to perform a genotype-phenotype correlation and to provide genetic counseling to patients and their families.

Key words: Von Willebrand disease, VWF factor, Exon 28, Colombia.

Tabla de contenido

RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
Lista de Figuras	XII
Lista de Tablas	XIII
Símbolos y abreviaturas	XIV
Introducción	XVI
Planteamiento del problema	XVIII
1. Marco Conceptual	1
1.1 Enfermedad de Von Willebrand	1
1.1.1 Historia	1
1.1.2 Epidemiología	2
1.1.3 Sistema de coagulación	2
1.1.3.1 Iniciación	3
1.1.3.2 Amplificación	3
1.1.3.3 Propagación	4
1.1.3.4 Estabilización	4
1.1.4 Manifestaciones clínicas	4
1.1.5 Clasificación	5
1.1.5.1 Tipo 1	6
1.1.5.2 Tipo 2	6
1.1.5.2.1 2 A	6
1.1.5.2.2 2B	7
1.1.5.2.3 2M	7
1.1.5.2.4 2N	7
1.1.5.2.5 Tipo 3	7
1.1.6 Diagnóstico	8
1.1.6.1 Pruebas de primer nivel	10
1.1.6.2 Pruebas de segundo nivel	11
1.1.6.3 Diagnóstico molecular	13
1.1.6.4 Problemas en el diagnóstico	14
2. Marco Teórico	17
2.1 Gen VWF	17
2.1.1 Características	17
2.2 Proteína factor von willebrand	17
2.2.1 Función del factor von willebrand	19
2.3 Alteraciones moleculares en el gen VWF	21
2.3.1 Variantes responsables de los diferentes tipos de EvW	21
2.3.1.1 Tipo 1	21
2.3.1.2 Tipo 2	22

2.3.1.3 Tipo 3	24
2.4 Diagnóstico para variantes del gen VWF	24
2.4.1 Secuenciación Sanger	24
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. METODOLOGÍA	27
4.1 Tipo de estudio	27
4.2 Pacientes	27
4.3 Muestra	27
4.4 Aislamiento de ADN	28
4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	28
4.6 Secuenciación BIGDYE TERMINATORS V3.1	29
4.7 Análisis de variantes	29
5. Consideraciones éticas	31
6. Resultados	32
6.1 Secuenciación Exón 28 del gen VWF	33
6.2 Tipos de variantes	35
6.3 Correlación genotipo-fenotipo	42
6. DISCUSIÓN	43
8. Conclusiones y recomendaciones	49
8.1 Conclusiones	49
8.2 Recomendaciones	49
BIBLIOGRAFÍA	51

Lista de Figuras

Figura 1 Fases de la Coagulación según el modelo celular.	4
Figura 2. Algoritmo Diagnóstico para EvW	9
Figura 3 Patrón de Multimeros	11
Figura 4 Esquematización de la proteína factor Von Willebrand:	18
Figura 5 Principales síntomas	33
Figura 6 Distribución de variantes causales en el exón 28 del gen VWF en la muestra analizada.	35
Figura 7 Electroferogramas variante c.4825G>A en el Exón 28	36
Figura 8 Electroferograma variante c. c.4309G>A en el Exón 28 P05	37
Figura 9 Electroferograma variante c.4517C>T en el Exón 28 P13	37
Figura 10 Electroferograma variante c.4789C>T en el Exón 28 P16	38
Figura 11 Electroferograma variante c.3835G>T en el Exón 28 P17	39
Figura 12 Electroferogramas variante c.4273A>T en el Exón 28 P11 y 12	40
Figura 13 Electroferogramas pacientes P19	41
Figura 14 Electroferograma paciente P10	41

Lista de Tablas

Tabla 1	Primers para la amplificación de Exón 28 gen VWF	28
Tabla 2	<i>Primers para la amplificación de Exones 18 y 20 gen VWF</i>	29
Tabla 4	Respuesta a la Desmopresina.....	33
Tabla 5	<i>Variantes patogénicas encontradas</i>	34
Tabla 6	<i>Clasificación tipo de EvW según estudios realizados</i>	42

Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

μ l	microlitro
μ M	Micromolar
μ m	micrometro

Superíndice Término

o	Grado de temperatura
---	----------------------

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADAMTS13	Desintegrina y metaloproteasa con motivo de la trombospondina tipo 1 nº 13
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AHS	Sociedad Americana de Hematología
aPTT	Tiempo de coagulación de la tromboplastina parcial activada
ARNm	ARN mensajero
BAT	Bleeding assessment tool
CAC	Cuenta de alto costo
DDAVP	Prueba de respuesta a la desmopresina
EAHAD	European Association for Hemophilia and Allied Disorders
EvW	Enfermedad de Von Willebrand
FIXa	Factor IX activado
FVIII	Factor VIII
FVIII:C	Actividad coagulante del factor VIII
FvW:Ag	Antígeno del vWF
FvW:CB	Capacidad de unión de vWF al colágeno
FvW:FVIII B	El ensayo de unión vWF -FVIII A35
FvW:GPIbM	Unión del vWF a la GPIb α con una mutación de ganancia de función
FvW:Rco	Actividad del cofactor de ristocetina
FvWpp	Pro-peptido del factor Von Willebrand
FXa	Factor X activado
HMWM	Multímeros de alto peso molecular
ISTH	Sociedad Internacional de trombosis y hemostasia
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons

LMWM	Multímeros de bajo peso molecular
mL	Mililitro
ng	Nanogramos
NGS	Secuenciación de nueva generación
NHF	Fundación Nacional de Hemofilia
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en la cadena de la polimerasa
pmol	Picomol
ppFvW/FvW:Ag	Proporción del propéptido y el antígeno
PT	Tiempo de protrombina
RIPA	Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina
seg	Segundos
TT	Tiempo de trombina
vWF	Factor Von willebrand
WFH	Federación Mundial de Hemofilia

Introducción

La enfermedad de Von Willebrand (EvW) es la coagulopatía hereditaria más común en la población y afecta sin distinción a ambos sexos. En esta enfermedad los pacientes presentan diferentes manifestaciones de sangrados debido a niveles bajos o difusión del Factor von Willebrand (vWF). (Hernández-Zamora et al., 2015; Adriana Inés Woods et al., 2016). Su prevalencia a nivel mundial se estima de 1 por cada 1000 nacidos vivos, no obstante, este dato está en constante verificación derivado del subregistro y barreras diagnósticas que se presentan en el laboratorio a nivel global. (A Goodeve & James, 2009; Ruggeri & Zimmerman, 1987). Se han reportado otras incidencias de acuerdo con estimaciones multinacionales de la EvW procedentes de estudios transversales y entes mundiales y de un estudio transversal ejemplo la encuesta mundial anual de 2022 de la Federación Mundial de Hemofilia de 2022 arrojó una estimación de 1,5 por 100.000 basada en el número de pacientes.(World Federation of Hemophilia, 2023)

Se clasifica en 3 tipos de acuerdo a la deficiencia presentada: cuantitativa (Tipos 1 y 3) o cualitativa (Tipo 2).(J E Sadler et al., 2006). Las personas con EvW presentan sangrados mucocutáneos prolongados como epistaxis, sangrado de las encías, equimosis, sangrado en procedimientos dentales, menstruación excesiva, entre otros, los cuales pueden ser leves y moderados, pocas veces son severos según el defecto en el vWF o en los niveles de FVIII:C. En mujeres puede sospecharse en caso de sangrado menstrual excesivo, sangrados post parto y folículos hemorrágicos en el momento de la ovulación. La enfermedad también se caracteriza por la presencia de sangrados mayores como la hemartrosis y hemorragias musculares o cerebrales en fenotipos severos (tipo 3). (A Goodeve & James, 2009; Adriana Inés Woods et al., 2016)

El diagnóstico clínico puede sospecharse utilizando el “Bleeding Assessment Tool (BAT)” y se confirma con pruebas de laboratorio específicas para la correcta clasificación de los subtipos 2 (2 A, 2B, 2M y 2N), los cuales pueden presentar patrones de traslapamiento entre sí se requiere de estudios moleculares, sin embargo, en algunos pacientes no puede ser conclusivo. (Fressinaud et al., 2002; P. James et al., 2021)

Más de 700 variantes han sido relacionadas con la EvW en la base de datos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH); realizando la búsqueda en otras bases como la European Association for Hemophilia and Allied Disorders (EAHAD)

se encuentran alrededor de 1000 variantes del gen VWF, entre las que se pueden encontrar variantes missense, deleciones, duplicaciones, inserciones, nonsense y frameshift. (Batlle et al., 2019)

El gen VWF tiene una longitud de 178 Kb con 52 exones, este gen codifica para una proteína de 2813 aminoácidos con 15 dominios funcionales. El exón 28 es el más grande del gen con aproximadamente 1379 pb, en este exón la mayoría de variantes reportadas para la EvW tipo 2, las demás variantes han sido reportados en los exones 17,18, y 20. Paralelamente la a gran variabilidad en las condiciones fisiológicas inherentes a cada paciente (fases de la menstruación, ejercicio, inflamación o fiebre) dificultan la identificación y clasificación subtipos 2A, 2B, 2M y 2N. (A. C. Goodeve, 2010; Anne Goodeve, 2016)

En la actualidad, existen varios métodos moleculares que permiten la identificación de las variantes presentes en el gen VWF, sin embargo, debido a su gran tamaño las tecnologías de mayor uso como la secuenciación de próxima generación (NGS) actualmente es costosa (aprox USD 795.00), por tal razón se han propuesto diferentes estrategias para abordar el análisis del gen como lo es realizar la identificación de variantes de acuerdo con el subtipo de EvW. En el caso de la EvW tipo 2 no es necesario el análisis de toda la secuencia codificante sino de los exones que codifican los dominios funcionales implicados en los distintos fenotipos, siendo los exones 17, 18, 20 y 28 los más estudiados y principalmente el exón 28 ya que la mayoría de las variantes patogénicas reportadas en las bases de datos se encuentran distribuidas a lo largo de este exón. (L Baronciani et al., 2017; E. J. Favaloro, 2014; Sharma & Haberichter, 2019). En el año 2021 las guías diagnósticas para la EvW recomiendan el uso de pruebas genéticas para discernir entre los subtipos de la EvW tipo 2, diferenciar el tipo 2N de una Hemofilia A o descartar la implicación de otros genes relacionados. (P. James et al., 2021)

La secuenciación Sanger de estos exones es una opción económica y sencilla para identificar las variantes. En el presente estudio se empleó una metodología basada en amplificación por PCR seguida de secuenciación mediante Big Dye terminators en el exón 28 para la identificación de variantes en una muestra de pacientes con EvW tipo 2, esto con el fin de realizar una correlación genotipo-fenotipo y así poder guiar el diagnóstico y brindar una asesoría genética adecuada a cada paciente. Adicionalmente se pretende comparar los hallazgos con estudios realizados a nivel mundial y poder analizar el comportamiento de este gen en una muestra de nuestra población.

Planteamiento del problema

En la actualidad el diagnóstico de la EvW se basa en pruebas de laboratorio especializadas que dependen de condiciones preanalíticas como la toma de la muestra, transporte y almacenamiento de las mismas, analíticas como el tipo de test utilizado, procedimientos de laboratorio y manejo de las muestras y post-analíticas como la correcta emisión y correlación de los resultados de acuerdo al analito estudiado que pueden llevar a resultados no óptimos.(Colonne et al., 2021; Lavin & O'Donnell, 2019). Paralelo a lo mencionado, es necesaria la correlación del clínico para abordar los subtipos de la EvW tipo 2. Derivado a lo anterior y de acuerdo con las guías para el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand propuestas por la AHS, ISTH, NHF, y WFH, en la discriminación de los tipos 2 A, 2B, 2M y 2 N, el análisis genético es la opción que brinda un apoyo al diagnóstico clínico y del laboratorio que permite un mejor abordaje terapéutico y la oportunidad de brindar la asesoría genética adecuada. (Connell et al., 2021; Lavin & O'Donnell, 2019)

En países en vía de desarrollo como Colombia esta enfermedad representa un gran reto para el sistema de salud ya que no se cuenta con los suficientes laboratorios especializados para realizar las pruebas de laboratorio que cumplan con los estándares de calidad hacer diagnóstico de la EvW y a la fecha no se tiene el diagnóstico molecular como una opción de rutina implementada a nivel nacional, lo cual conlleva a un sobre costo ya que muchas veces estas pruebas tienen que ser remitidas al exterior para su análisis, lo que representa un paso adicional en la correcta correlación genotipo-fenotipo y la asesoría genética adecuada.

1. Marco Conceptual

1.1 Enfermedad de Von Willebrand

1.1.1 Historia

La enfermedad de Von Willebrand fue descrita por primera vez en el año 1926 por el doctor Erik Von Willebrand quien dedico una importante cantidad de tiempo en el estudio de una familia de Föglö en la región de Åland, Finlandia.(Nyman et al., 1981). Su primer caso fue una paciente que tenía 5 años en la primera consulta con el Dr. Von Willebrand en el año 1924 y que presentaba un trastorno hemorrágico severo con episodios de sangrado excesivo por nariz, boca y después de procedimientos como extracciones dentales. A la edad de 13 años esta paciente falleció durante su cuarto periodo menstrual por un sangrado excesivo.(Nilsson, 1999). La paciente tenía 12 hermanos, 4 de sus hermanas fallecieron a temprana edad por sangrados incontrolables de heridas y tracto gastrointestinal y sus padres sufrieron de problemas de sangrados en la niñez. Derivado a este caso el Dr. Von willebrand observo a 58 miembros de la familia encontrando 22 afectados con síntomas similares a los del caso índice como epistaxis, sangrado de encías, sangrados prolongados después de la extracción de piezas dentales, heridas, menstruaciones y presencia de sangrados a nivel del tracto gastrointestinal. Von Willebrand sostuvo que la enfermedad se distinguía claramente de la descrita por Glanzmann como trombostenia ya que el trastorno, que afectaba a ambos sexos y era una forma de hemofilia desconocida hasta entonces, y la denominó pseudoemofilia hereditaria. (Nilsson, 1999; Nyman et al., 1981)

En el año 1933 Von Willebrand coopero con Rudolf Jürgens, quien también realizó diferentes aproximaciones al diagnóstico de la familia de Aland por lo que la enfermedad se le llamo Trombopatía de Willebrand-Jurgens. En las siguientes décadas esta enfermedad fue descrita bajo muchos nombres como hemofilia vascular lo cual llevó a muchas confusiones en las definiciones de los distintos casos analizados. Fue hasta el año 1970 cuando von Mourik y Mochtar descubrieron que el factor VIII estaba unido a una macroglobulina; posteriormente en el año 1971 Stites, Zimmerman y colaboradores desarrollaron anticuerpos contra esta globulina que hoy en día se le conoce como Factor de Von Willebrand y de ahí el nombre de la enfermedad. Durante los años 1987 -1989 se

logra hacer el aislamiento del gen VWF y determinar su estructura, tamaño y análisis de sus transcrito lo cual ha permitido entender la fisiopatología y complejidad de la enfermedad. (E. J. Favaloro, 2014; Nilsson, 1999)

1.1.2 Epidemiología

Esta patología afecta tanto a hombres como a mujeres se estima que afecta del 0.1 - 1% de la población. Según el sondeo anual realizado por la Federación Mundial de Hemofilia (WFH) donde se incluyeron 125 países para el año 2022 se reportaron 454,690 pacientes con coagulopatías de los cuales 22,83% (103,844) padecían EvW, sin embargo, este número puede ser mucho mayor debido a los problemas de subregistro y diagnóstico inherentes de esta enfermedad. (World Federation of Hemophilia, 2023)

En Colombia de acuerdo con los datos recolectados por la cuenta de alto costo (CAC) en el 2023 se reportaron 5893 con coagulopatías prevalentes de las cuales 2241 tienen EvW, 52.52% tipo 1, 29.93% tipo 2, 5.30% tipo 3 y 12.26% sin clasificar y se encontraron distribuidos por todo el territorio nacional. Predomina la afectación en el sexo femenino en una proporción 3:1 esto se debe a los desafíos hemostáticos específicos de las mujeres como la menstruación, parto, posparto y sangrado de un quiste ovárico. La prevalencia en nuestra población es de 3,4 por cada 100.000 habitantes, con una media de edad de 16 años. (Cuenta de Alto Costo - Fondo Colombiano de Cuentas de Alto Costo, 2022)

1.1.3 Sistema de coagulación

A partir de los años 1960 se empezó a hablar del término coagulación cuando Davie, Ratnoff y Macfarlane introdujeron el término cascada al principio fundamental de la cascada de proenzimas que conducen a la activación de las enzimas posteriores. El término hemostasia proviene del griego *haeme* que significa sangre y *stasis* que significa detener. Un sistema de hemostasis normal comprende cuatro elementos importantes, la vasculatura, las plaquetas, las proteínas de la coagulación y el sistema fibrinolítico. Cuando se presenta una lesión de un vaso sanguíneo estos cuatro elementos interactúan de manera coordinada para evitar que haya una pérdida de sangre, esto se logra con la formación de un coágulo que se localizara en el sitio de la lesión. Este proceso está bajo estrictos controles inhibitorios los cuales limitan la formación del coágulo, evitando así la propagación del trombo. (Biousse, 2003)

La hemostasia primaria es resultado de la interacción entre las plaquetas, la pared del vaso y las proteínas adhesivas que conducen a la formación de un tapón plaquetario. Las células endoteliales que recubren la pared vascular presentan propiedades antitrombóticas debido a múltiples factores como los glucosaminoglicanos, fosfolípidos neutros, la síntesis y secreción de inhibidores plaquetarios y de la coagulación y activadores de la fibrinólisis en contra parte la capa subendotelial es altamente trombo génica ya que contiene colágeno, el factor de Von Willebrand (vWF) y proteínas como la laminina, la trombospondina y la fibronectina, que son necesarias para la adhesión plaquetaria. (Biousse, 2003)

Existen 3 factores que afectan la coagulación conocida como la triada de Virchow:

1. Disminución del flujo sanguíneo
2. Lesión de la pared del vaso
3. Desequilibrio entre factores procoagulantes y anticoagulante

Actualmente el concepto de vía intrínseca y extrínseca ha sido reemplazado por el modelo de las 4 fases.(Palta et al., 2014; Pérez-Gómez & Bover, 2007) (Figura 1)

1.1.3.1 Iniciación

Inicia con la expresión del factor tisular en el vaso dañado el cual se une al factor VIIa para activar el factor IX y el factor X. Esta activación del factor IX por el complejo TF-VIIa sirve como un puente entre las vías clásica extrínseca e intrínseca, posterior a esta activación el factor Xa se une al factor II para formar la trombina o factor IIa. (Chee, 2014)(Figura 1)

1.1.3.2 Amplificación

La trombina generada en la iniciación generalmente no es suficiente para el proceso de coagulación por lo que se da una retroalimentación positiva con más generación de trombina que la une con las plaquetas. De igual forma esta trombina generada en la fase de iniciación activa el factor V y factor VIII quienes sirven como cofactores en el complejo de protrombinasa y acelera la activación del factor II por el FXa y del FXa por el FIXa. (Chee, 2014)(Figura 1)

1.1.3.3 Propagación

Los complejos tenasa y protrombinasa que se encuentran en la superficie de las plaquetas apoyan el proceso de generación de la trombina y la activación plaquetaria. Esto promueve la generación continua de trombina y posteriormente de fibrina para la formación del coágulo. (Chee, 2014) (Figura 1)

1.1.3.4 Estabilización

La generación de trombina conduce a la activación del factor XIII que se une covalentemente a los polímeros de fibrina y proporciona estabilidad y fuerza en el tapón plaquetario, adicionalmente la trombina también activa el inhibidor de fibrinolisis TAFI que protege al coágulo. (Chee, 2014)

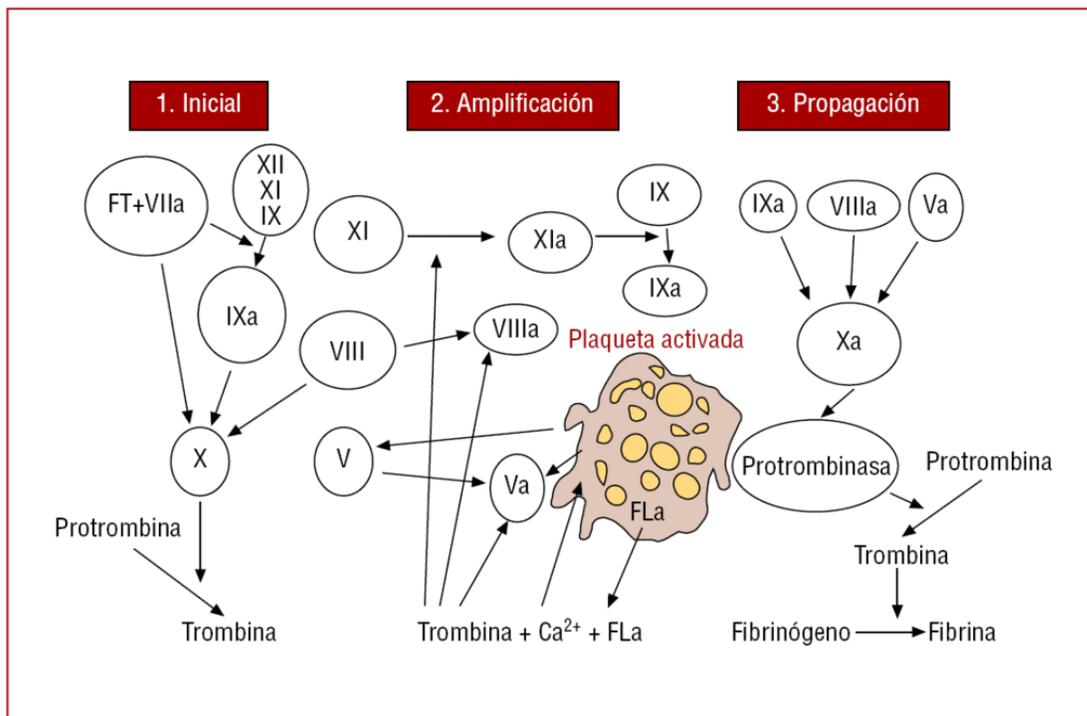


Figura 1 Fases de la Coagulación según el modelo celular. Esquema que representa el modelo celular. (Pérez-Gómez & Bover, 2007)

1.1.4 Manifestaciones clínicas

La EvW es una patología heterogénea en sus manifestaciones clínicas las cuales están correlacionados con el nivel de actividad del vWF, los pacientes pueden ser desde

asintomáticos, sangrar solo en casos de retos hemostáticos, dentro de los síntomas más frecuentes están los sangrados mucocutáneos como epistaxis, hematomas, sangrado excesivo en la menstruación y hemorragias por heridas menores, aunque son poco comunes también se pueden presentar síntomas más graves como hemorragias gastrointestinales y musculoesqueléticas. Estas manifestaciones pueden presentar cierta variabilidad en función del subtipo, el sexo y la edad. (J Evan Sadler, 2004; Adriana Inés Woods et al., 2016)

La EvW en mujeres suele diagnosticarse con más frecuencia ya que la mayoría de las pacientes presentan sangrados menstruales excesivos, sangrados prolongados post parto y folículos hemorrágicos durante la ovulación incluso en algunos casos estas pacientes necesitan terapias de sustitución por la cantidad de sangrado. (P. D. James & Goodeve, 2011; Laffan et al., 2021). Uno de los retos hemostáticos en las mujeres es el embarazo donde existen varios cambios que resultan en un estado hipercuagulable, en mujeres con o sin EvW los niveles de FVIII y vWF incrementan en el segundo trimestre alcanzando su máximo durante el tercer trimestre, en aquellas pacientes que tengan EvW este aumento depende del tipo de EvW, para tipo 1 y 2 usualmente se alcanzan niveles normales de vWF al final de embarazo, estos niveles disminuyen rápidamente después del parto alcanzando su línea base 1-3 semanas después, en consecuencia mujeres con EvW tienen mayor riesgo de hemorragia postparto, en el tipo 3 no se ve aumento de estos niveles en ninguna etapa del embarazo. (Sladič et al., 2022).

Este patrón variable de cambios observados durante el embarazo del vWF y FVIII hace que esta población deba ser cuidadosamente evaluada para planificar el tratamiento más adecuado en el momento del parto. Sin embargo, también hay sucesos durante el embarazo como la amniocentesis, hemorragia vaginal asociada a desprendimiento de la placenta y aborto repentino que pueden requerir un tratamiento hemostático urgente para evitar la hemorragia. (G Castaman & James, 2019; Zarante Montoya et al., 2020)

1.1.5 Clasificación

La clasificación EvW fue revisada por ISTH y está basada en los defectos cuantitativos (tipos 1 y 3) y cualitativos (tipo 2) del vWF que pueden ser diferenciadas por sus análisis de laboratorio. (J E Sadler et al., 2006)

1.1.5.1 Tipo 1

Es el subtipo más común de la EvW, representa del 60-80% de los casos, su patrón de herencia es autosómico dominante con penetrancia incompleta y se caracteriza por una deficiencia parcial de vWF con valores < 0.30 IU/mL sin embargo las guías de diagnóstico recomiendan hacer la confirmación de este tipo en pacientes con vWF < 0.50 IU/mL con historia familiar positivo independientemente de los síntomas hemorrágicos. (P. James et al., 2021).

Existe una proporción normal de actividad funcional del vWF (FvW:RCo, actividad del cofactor de ristocetina) en relación con el nivel de antígeno del vWF (FvW:Ag), su etiología es compleja ya que ha sido relacionado a una variedad de factores genéticos y ambientales, y existen diferentes estudios que implican otros loci además del VWF, hoy en día existe incertidumbre sobre la patogenicidad de muchas variantes del VWF identificadas, sumado a esto, existe expresividad variable en las distintas manifestaciones clínicas que contribuyen a la complejidad del diagnóstico y la comprensión de la patogénesis de la enfermedad. (J E Sadler, 2003; Adriana Inés Woods et al., 2016)

1.1.5.2 Tipo 2

Corresponde del 15 -20% de los casos reportados de EvW se caracteriza por la deficiencia cualitativa del vWF ya sea por defectos en su estabilidad, función o distribución de sus multímeros. Se distinguen 4 subtipos 2A, 2B, 2M y 2N

1.1.5.2.1 2 A

Se caracteriza por la pérdida de función del vWF debido a la disminución de afinidad con el receptor Gplb α derivado a la ausencia de multímeros de alto peso molecular (HMWM) ya sea por afectaciones a nivel de su biosíntesis o degradación prematura a nivel plasmático. A nivel de laboratorio se caracteriza por una relación disminuida de FvW:RCo/FvW:Ag < 0.7 , HMWM ausentes, FVIII, FvW:Ag, FvW:RCo y RIPA disminuidos. Han sido reportadas más de 100 variantes asociadas a este fenotipo y que se correlacionan directamente con afectaciones en los procesos de ensamblaje, almacenamiento, secreción y proteólisis de los multímeros de alto peso molecular y aumento de los multímeros de bajo peso molecular (LMWM). (DiGiandomenico et al., 2021; E. J. Favaloro, Pasalic, et al., 2016)

1.1.5.2.2 2B

Es el fenotipo con una ganancia de función ya que hay un aumento de afinidad por el receptor Gplb α , en este fenotipo también se observa disminución de HMWM, a nivel laboratorio los pacientes presentan en su mayoría trombocitopenia y RIPA aumentado debido a la agregación plaquetaria, relación disminuida de FvW:RCo/FvW:Ag < 0.7, es necesaria su diferenciación de la pseudo enfermedad de Von Willebrand o enfermedad de von Willebrand tipo plaquetario la cual no es dada por mutación en el VWF sino en el gen del receptor Gplb α . (DiGiandomenico et al., 2021; Mazurier & Meyer, 1996)

1.1.5.2.3 2M

Se caracteriza por un defecto en el cual se disminuye la interacción del vWF con las plaquetas, se conoce como el fenotipo contrario al 2B. a nivel de laboratorio tiene similitud con las dos variantes anteriores sin embargo se encuentra diferencia ya que su patrón de multímeros es completamente normal. (E. J. Favaloro, Pasalic, et al., 2016)

1.1.5.2.4 2N

Se caracteriza por una pérdida de afinidad en el sitio de unión del Factor VIII por lo cual estos pacientes presentan niveles disminuidos de este factor y pérdida de función del mismo, es un fenotipo muy diferente a las demás ya que su patrón de herencia es autosómico recesivo y generalmente el único hallazgo a nivel de laboratorio es la alteración en el factor VIII por lo cual se debe hacer su diferenciación con la Hemofilia A.(Casonato et al., 2018)

1.1.5.2.5 Tipo 3

Corresponde al 3 % de los casos y su fenotipo es el más severo de la EvW, se caracteriza por presencia de sangrados mayores como sangrados gastrointestinales y muscoesqueléticas, estos pacientes deben ser monitoreados periódicamente, generalmente necesitan de terapias de sustitución como concentrados de FVIII y vWF. A nivel de laboratorio se caracterizan por niveles de vWF extremadamente bajos o indetectables. (Connell et al., 2021; Kasatkar et al., 2014)

1.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la EvW inicia con la intervención del clínico quien en su valoración inicial debe tener en cuenta aspectos como la historia personal y familiar frente a los síntomas de sangrados presentados, esta valoración inicial permitirá hacer una distinción en el tipo de sangrado, su frecuencia y localización. Para los trastornos de coagulación se han propuesto distintas herramientas diagnósticas, una de las más usadas son los BAT, cuestionarios basados en scores en los que el clínico puede determinar la severidad y tipo de sangrado con el fin de discriminar aquellos pacientes cuyo sangrado se considera normal de aquellos cuyo sangrado es patológico, además de evaluar la disfunción plaquetaria y guiar al clínico en la correlación con los resultados de laboratorio. (Bowman & James, 2017; Sharma & Haberichter, 2019; Stufano et al., 2017)

Actualmente y de acuerdo con las guías para diagnóstico del año 2021, el diagnóstico de la EvW se basa en el análisis fenotípico por varias pruebas de laboratorio, en primera instancia se realiza un abordaje inicial con pruebas como el cuadro hemático, recuento de plaquetas, PT, aPTT y opcionalmente tiempo de Trombina (TT) y niveles de fibrinógeno. (P. James et al., 2021)(Figura 2)

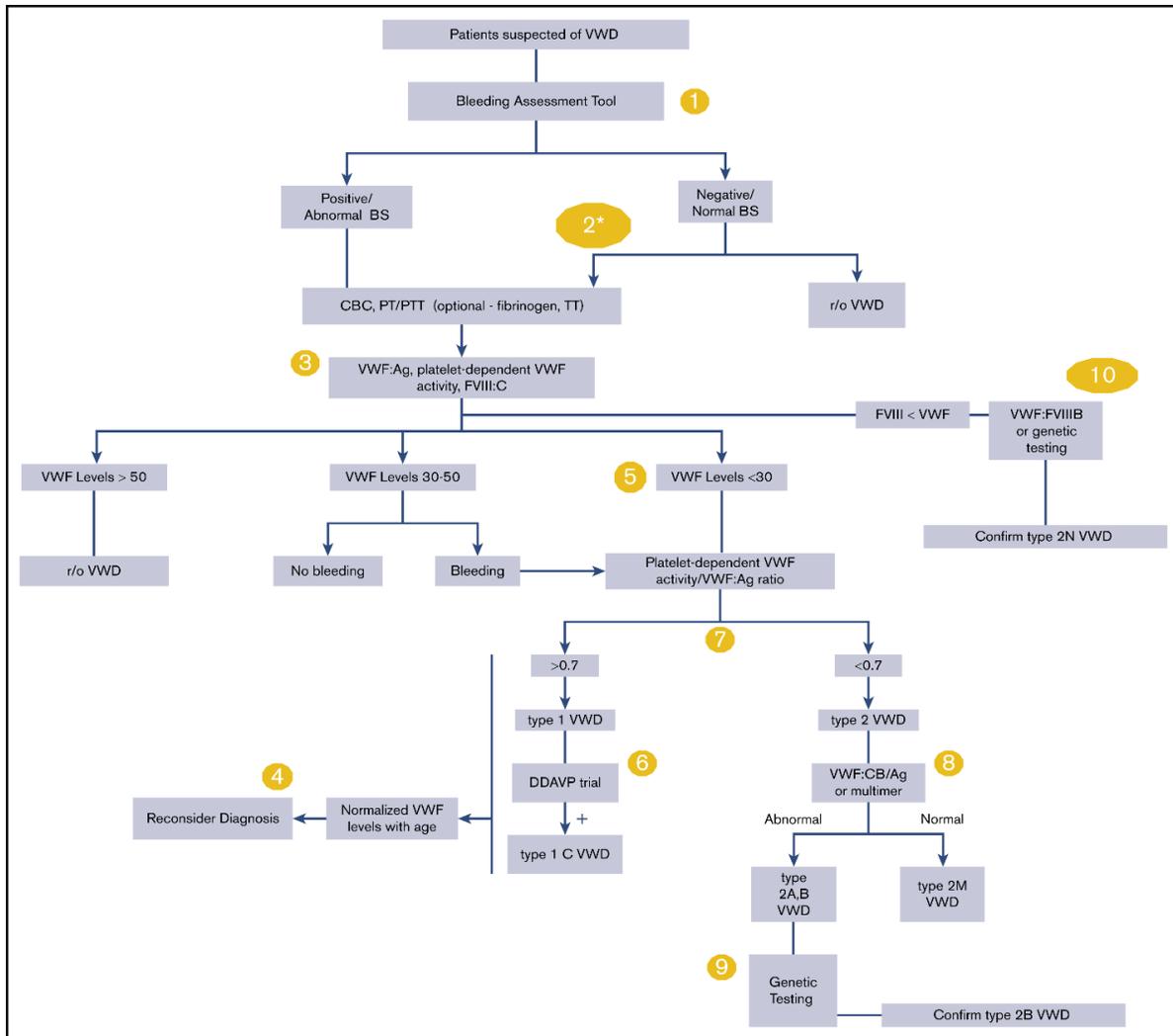


Figura 2. Algoritmo Diagnóstico para EvW Flujograma con las 11 recomendaciones y sugerencias principales en el diagnóstico de la EvW de acuerdo con las guías año 202. **1.** Pacientes con una baja probabilidad de EvW se recomienda utilizar un BAT como cribado inicia. **2.** Pacientes con una probabilidad intermedia de EvW se sugiere no de confiar en un BAT para decidir si se debe pedir un análisis fenotípico específico. **3.** Pacientes con una alta probabilidad de EvW se recomienda no confiar en el BAT para decidir si se debe pedir un análisis fenotípico específico. **4.** Se sugiere ensayos con nuevas tecnologías que miden la actividad de unión a las plaquetas del vWF como el ensayo FvW:GPIbM y FvW:GPIbR sobre el FvW:RCo para el diagnóstico de la EvW. **5.** Se sugiere reconsiderar el diagnóstico para los pacientes con EvW de tipo 1 previamente confirmada cuando los niveles de vWF se han normalizado con la edad. **6.** Se recomienda un nivel de vWF de <0,30 UI/mL independientemente de la hemorragia y para los pacientes con hemorragia anormal un nivel de vWF de <0,50 UI/mL para confirmar el diagnóstico de EvW tipo 1. **7.** Se sugiere no utilizar VWFpp/FvW:Ag y más bien utilizar un ensayo de desmopresina en tiempos 1y 4 horas post infusión para pacientes con sospecha de EvW tipo 1. **8.** Se sugiere no utilizar una relación vWF de actividad del FvW:RCo/FvW:Ag de <0,5 y que se utilice un límite más alto de <0,7 para confirmar la EvW de tipo 2 (2A, 2B o 2M) para los pacientes con una prueba inicial anormal de vWF. **9.** Se sugiere el análisis de los multímeros del vWF o FvW:CB/ FvW:Ag para diagnosticar la EvW de tipo 2 en pacientes

con sospecha de tipo 2A, 2B o 2M que necesiten pruebas adicionales. **10.** Se sugiere la realización de pruebas genéticas específicas en lugar de dosis bajas de RIPA para diagnosticar la EvW de tipo 2B en pacientes 2A o 2B que necesiten pruebas adicionales. **11.** Se sugiere el uso de FvW:FVIII B o de pruebas genéticas específicas dirigido para pacientes con sospecha de EvW de tipo 2N que necesiten pruebas adicionales. (Tomado de Paula D James et al., 2021)

Estas pruebas no determinan la presencia de la enfermedad, pero contribuyen a esclarecer la presencia de un defecto en la coagulación que sea causativa de los síntomas, hay que tener en cuenta que en contadas ocasiones y de acuerdo al tipo de deficiencia de cada paciente. (Nichols et al., 2007)

1.1.6.1 Pruebas de primer nivel

- **Actividad coagulante del FVIII (FVIII:C):** generalmente se determinado por prueba de coagulación de una sola etapa basada en la medición aPTT (por método coagulométrico), también puede ser evaluado por métodos cromogénicos (prueba de dos etapas). Esta prueba se fundamenta en la medición en la capacidad del FVIII para reducir el tiempo de coagulación en el plasma del paciente con deficiencia de FVIII. (P. James et al., 2021; Stufano et al., 2017)
- **Nivel del antígeno del vWF (vWF:Ag):** como su nombre lo indica mide la concentración de la glicoproteína en el plasma del paciente esto se realiza por métodos como la ELISA o LIA. (Bowman & James, 2017; Stufano et al., 2017)
- **Actividad de unión del vWF al receptor plaquetario GPIb α :** La prueba que más se utiliza es la capacidad de aglutinación del vWF en presencia de la ristocetina (FvW:RCo) los cuales puede analizarse por métodos manuales, semiautomatizados o automatizados, sin embargo estas pruebas presentan ciertas desventajas como la gran variabilidad de los resultados, variabilidad entre reactivos por su lotes y preparación e inestabilidad en los ensayos por lo que en las últimas décadas se han propuesto otras pruebas que pueden medir esta unión de una manera más sensible y específica. Entre estas pruebas la más recomendado según las guías de diagnóstico son los Ensayos de unión del vWF a la GPIb α con una mutación de ganancia de función (FvW:GPIbM) los cuales usan fragmentos recombinantes del receptor GPIb α los cuales presentan una ganancia de función por medido de variantes conocidas (p.G233V,p.D235Y y p.M239V) y son capaces de unirse al vWF sin la presencia de la ristocetina, lo anterior se realiza por medio de ELISA o por métodos de látex y han demostrado mayor

sensibilidad que los FvW:RCo tradicionales. (Laffan et al., 2021; Stufano et al., 2017)(Connell et al., 2021; Stufano et al., 2017)

Aun cuando las pruebas anteriores nos dan una dirección para el diagnóstico de la EvW, aun se deben realizar pruebas de segundo nivel que nos permitan realizar la clasificación.

1.1.6.2 Pruebas de segundo nivel

- **Capacidad de unión de vWF al colágeno (FvW:CB):** La unión del vWF al colágeno juega un papel fundamental en el proceso de cizallamiento para que se inicie el proceso de formación del tapón plaquetario en el sitio de la lesión, este ensayo mide esta función del vWF y depende del tamaño de los multímeros, por lo cual se ha planteado como una alternativa al análisis de multímeros cuando este no esté disponible para la diferenciación de los tipos 2M y 2A. (P. James et al., 2021; Stufano et al., 2017)
- **Análisis de multímeros del vWF:** El patrón multimérico del vWF plasmático es importante para determinar no solo su actividad funcional sino también para lograr la diferenciación ente los tipos 2A y 2M, (Ver Figura3), los HMWM son la forma más hemostática activa de vWF. Estas moléculas se unen al colágeno y las plaquetas con una afinidad mucho mayor que los LMWM. Debido a su tamaño, el HMWM es más efectivo para mediar la adhesión y agregación plaquetaria, especialmente en condiciones de alto cizallamiento. El análisis de la estructura del polímero vWF es muy complicado, implica gran cantidad tiempo, pero es útil para el diagnóstico de EvW. (E. J. Favaloro, 2014; Stufano et al., 2017)

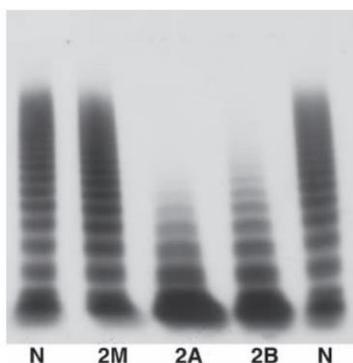


Figura 3 Patrón de Multímeros que se presenta en los subtipos EvW tipo 2. (Tomado de Francesca Stufano & Peyvandi, 2017)

- **El ensayo de unión vWF -FVIII (FvW:FVIII):** El ensayo de unión del vWF-FVIII (VWF: FVIII) evalúa la capacidad del vWF para unirse al FVIII. Esta prueba es esencial para distinguir el diagnóstico de EvW 2N de la hemofilia A leve, porque estas dos enfermedades están relacionadas con la reducción moderada de los niveles plasmáticos de FVIII y los niveles normales de VWF: Ag y VWF(Stufano et al., 2017)

En el diagnóstico diferencial se puede obtener tres tipos de resultados:

1) Una capacidad de unión normal de vWF y FVIII conduce al diagnóstico Hemofilia A leve.

2) Una capacidad de unión reducido significativamente de vWF a FVIII guiaría el diagnóstico a EvW 2N.

3) Disminución moderada de la unión es un hallazgo común entre las personas asintomáticas.

- **Análisis del vWF intraplaquetario:** A excepción de los cuerpos de Weibel-Palade el vWF también se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas. En comparación con el vWF en plasma, el vWF plaquetario es rico en multímeros con gran actividad hemostática, hasta la fecha los métodos descritos para esta medición no han sido estandarizados no obstante el uso de ellos ha logrado la clasificación en 3 categorías que contribuyen a la predicción de la respuesta del vWF plasmática frente a la administración la DDAVP: (Stufano et al., 2017)

1) Plaquetario bajo: pacientes con FvW:Ag y FvW:RC plaquetarios reducidos

2) Plaquetario normal: pacientes con FvW:Ag y FvW:RCo plaquetarios dentro del rango normal

3) Plaquetario discordante: pacientes con concentraciones normales de FvW:Ag plaquetario, pero niveles desproporcionadamente reducidos de FvW:RCo plaquetario

- **Prueba de respuesta a la desmopresina (DDAVP):** La desmopresina o DDAVP es un derivado sintético Vasopresina vWF este compuesto ha sido utilizado como tratamiento de la EvW leve. La prueba de desmopresina se usa para evaluar la respuesta del paciente para prevenir o tratar el sangrado. La administración de desmopresina eleva la concentración de vWF 2 a 5 veces sobre el nivel normal en

personas sin EvW o con deficiencias parciales. El proceso inicia con la administración del medicamento por vía subcutánea o intravenosa en una dosis 0,3 µg / kg de peso corporal posteriormente se procede a realizar las mediciones de VWF: Ag, VWF: RCo en lapsos de tiempo en 1, 2 y 4 horas después de la administración.(Laffan et al., 2021). Se espera incremento en el Ag y actividad de 30 a 60 min después de la administración intravenosa o de 60 a 90 min si se hace por vía subcutánea o nasal. Si el paciente no responde a la desmopresina se observara que no se mantiene los niveles terapéuticos en los tiempos estudiados.(Solano-Trujillo et al., 2020)

- **Proporción del propéptido y el antígeno ppFvW/FvW:Ag:** una proporción mayor de propéptido VWF (ppFvW) y VWF (ppFvW / FvW: Ag), implican un aumento en la depuración del vWF, en pacientes con EvW y aquellos con coagulación intravascular diseminada, esta prueba es relativamente nueva y no se usa ampliamente. (Stufano et al., 2017)

1.1.6.3 Diagnóstico molecular

Cuando algunos de los ensayos de laboratorio no están disponibles como el ensayo de unión FvW-FVIII (FvW:FVIII B), la aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) o el análisis de multímeros, la identificación de variantes causantes de la EvW tendrá un resultado crucial en el diagnóstico del paciente. (Giancarlo Castaman & Linari, 2021; Anne Goodeve, 2016; P. James et al., 2021)

El ensayo FvW:FVIII B ofrece un diagnóstico diferencial entre la hemofilia leve y EvW tipo 2N. El ensayo no se encuentra habilitado en varios laboratorios, por ende, el análisis secuencial de ADN de los exones del gene VWF que codifican D'D3 que podría ser una alternativa al uso del ensayo FvW:FVIII B.(L Baronciani et al., 2017)

Los pacientes que presentan EvW tipo 2B y 2A pueden presentar parámetros de laboratorio similares, como lo puede ser la actividad marcadamente reducida del FvW:RCo o de una actividad FvW dependiente de las plaquetas, en comparación con el nivel FvW:Ag y del ensayo de RIPA disminuido, se podría usar el análisis secuencial de ADN del exón del 28 VWF que codifica el dominio A 1 o el dominio A2 con el fin de establecer el diagnóstico del paciente. Cuando el RIPA se encuentra alterado al alza se debe realizar un análisis del caso ya que la alteración puede ser específica de una EvW tipo 2B o de un fenotipo similar causado por variantes de ganancia de fusión en el gen

GPIIb α . La identificación de variantes en el dominio A1 del VWF (EvW tipo 2B) o el gene GP1BA (pseudo-EvW) es una alternativa válida para las pruebas de mezclas de plaquetas que son necesarias para el diagnóstico diferencial.(L Baronciani et al., 2017)

En el caso de la EvW tipo 2A y 2M, los pacientes pueden presentar resultados de las pruebas de laboratorio similares como lo puede ser la actividad marcadamente reducida del FvW:RCo o de una actividad FvW dependiente de las plaquetas, en comparación con el nivel FvW:Ag y del ensayo de RIPA disminuido, el diagnóstico fenotípico podría ser difícil si el análisis de multímeros no estuviera disponible. El análisis molecular puede usarse para la identificación de estos casos.(L Baronciani et al., 2017; E. J. Favaloro, Pasalic, et al., 2016)

Existen razones para realizar un análisis molecular en pacientes caracterizados por pruebas de laboratorio y diagnosticados con EvW. El diagnóstico EvW tipo 3 se puede hacer usando un ensayo confiable de VWF: Ag. La identificación del estatus de portador de un miembro de la familia puede ser incierta si se utiliza el método de laboratorio, mientras que pueda determinarse fácilmente una vez que se haya identificado las variantes del probando. (L Baronciani et al., 2017)

1.1.6.4 Problemas en el diagnóstico

Aun cuando la EvW es el desorden hereditario de la coagulación más común en la población, la patología es una de las entidades más comúnmente mal diagnosticadas o pasadas por alto en la práctica clínica.(Giancarlo Castaman & Linari, 2017; Lavin & O'Donnell, 2019) Derivado a su variabilidad clínica y factores que influyen en su forma de presentación el diagnóstico implica una dificultad para los sistemas de salud, la frecuencia y la gravedad con la que se presentan las hemorragias están influidas por varios factores, que se deben evaluar cuidadosamente, entre ellos tenemos, la edad, género, comorbilidades, antecedentes familiares, dietas, ingesta de medicamentos anticoagulantes, medicamentos homeopáticos a base de ginkgo, ajo, jengibre, aceite de pescado que pueden disminuir la hemostasia y aumentar el riesgo a la presentación de hemorragias. (Colonne et al., 2021), Sumado a lo anterior se debe tener en cuenta aquellas patologías o estados que necesitan ser diferenciados de la EvW, como la Hemofilia A, deficiencia de factores de la coagulación X y XI, Síndrome de Bernard-Soulie y Síndrome de von Willebrand adquirido. (E. Favaloro & Pasalic, 2022; Monteiro et al., 2021).

Adicional es esencial la clasificación en su subtipo correspondiente para poder dar el tratamiento adecuado. Teniendo en cuenta lo mencionado en el diagnóstico se pueden presentar 3 escenarios principales que deben ser superados para llegar a un diagnóstico adecuado:

- **Sobrediagnóstico de la EvW:** Los síntomas hemorrágicos como la epistaxis y el sangrado menstrual o pequeñas hemorragias después de un procedimiento dental sin que la persona presente una deficiencia o patología pueden llegar a diagnosticarse como la EvW si no se realizan las pruebas de laboratorio correspondientes. Otros factores que pueden llevar a este escenario son la variación de los niveles del FvW:Ag en plasma por influencias como el sistema ABO, la disponibilidad de pruebas, interpretación de los resultados. Las condiciones pre analíticas son otros factores e muestras contaminadas con anticoagulantes, muestras con un hematocrito elevado, muestras de plasma o suero con EDTA pueden dar lugar a niveles falsamente bajos de FvW:Ag y/o su actividad, exceso de temperaturas en el transporte, demora en el procesamiento pueden afectar a las pruebas y se recomienda evitarlos.(Colonne et al., 2021; Mezzano & Quiroga, 2019)
- **Subdiagnóstico de la EvW:** la principal causa de este escenario es el desconocimiento de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y poco acceso a las pruebas diagnósticas en algunas poblaciones. Como se ha mencionado la variabilidad del vWF:Ag es un factor importante, ejemplo de esto cuando existe un cuadro hemorrágico leve puede no ser clínicamente aparente si no ha habido episodios de problemas hemostáticos como cirugías, procedimientos dentales o traumatismos. En mujeres que presentan sangrado uterino excesivo a menudo no se someten a la prueba de la EvW, ya que el sangrado menstrual puede no ser reconocida como un síntoma de hemorragia. Otros escenarios donde el factor puede aumentar transitoriamente y enmascarar la deficiencia en el vWF como en las condiciones inflamatorias, aumento de adrenalina por el ejercicio, estrés, cafeína, cambio en las hormonas sexuales, embarazo y anticonceptivos orales. También puede darse por las condiciones preanalíticas (toma de muestra, conservación), analíticas y post-analíticas (manejo de las muestras e interpretación de resultados) de laboratorio.(Giancarlo Castaman & Linari, 2021; Colonne et al., 2021)

- **Diagnóstico incorrecto de la EvW:** este escenario al igual que los dos escenarios anteriores tienen como factor principal, condiciones preanalíticas pueden llevar a una subclasificación erróneas. De igual forma no conocer aquellas entidades con las que se debe tener un diagnóstico diferencial como la Hemofilia A, Síndrome de Bernard-Soulier, entre otros y cuyo diagnóstico erróneo puede llevar a graves consecuencias en el paciente (Colonne et al., 2021)

2. Marco Teórico

2.1 Gen VWF

2.1.1 Características

El gen que codifica el factor de Von Willebrand (vWF) se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.31), tiene un tamaño de 178 Kb y está conformado por 52 exones, el exón más grande es el 28 con 1379 pb y el más pequeño es el exón 50 con 40pb, los demás exones varían en tamaño de 41pb a 342 pb, existe una caja TATA y una caja CCAAT a -30 y -22pb respectivamente del sitio de inicio de transcripción. El gen también contiene una secuencia de elementos que actúan en la región +155 a +247, estos elementos son los sitios de unión para los factores de transcripción GATA y NFY, los cuales ayudan a la activación específica del promotor.(Anne Goodeve, 2016; Mancuso et al., 1989; Ruggeri & Zimmerman, 1987) (Figura 4).

El gen codifica a un ARNm de 8830 pb el cual comprende un marco de lectura de 8441 pb, a región no trascrita 5' de 250 pb y una región no trascrita 3' de 138 pb. En el cromosoma 22 (22q11.2) existe un pseudogen no procesado que abarca las secuencias de los exones 23 al 34 con una longitud aproximada de 25Kb y una homología del 97% y que es altamente conservado entre especies. (Collins et al., 1987; Mancuso et al., 1989)

2.2 Proteína factor von willebrand

El vWF es una de las glicoproteínas más grandes y complejas que se ha caracterizado, es sintetizado en dos sitios principales los megacariocitos y células endoteliales, se calcula que 85% del vWF circulante en el plasma proviene del endotelio. Inicialmente se sintetiza como un precursor de 2813 residuos de aminoácidos conocido como pre-pro vWF de aproximadamente 350 kDa, en los que los primeros 22 residuos constituyen el péptido señal, un pro péptido de 741aa y una subunidad de proteína madura de 2050 aa.(Hassan et al., 2012; Hernández-Zamora et al., 2015; Ruggeri & Zimmerman, 1987). El pro-vWF sin el péptido señal está organizado en repeticiones de dominios homólogos con un total de 15 dominios funcionales los cuales están organizados en secuencia D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK. (Figura 4).

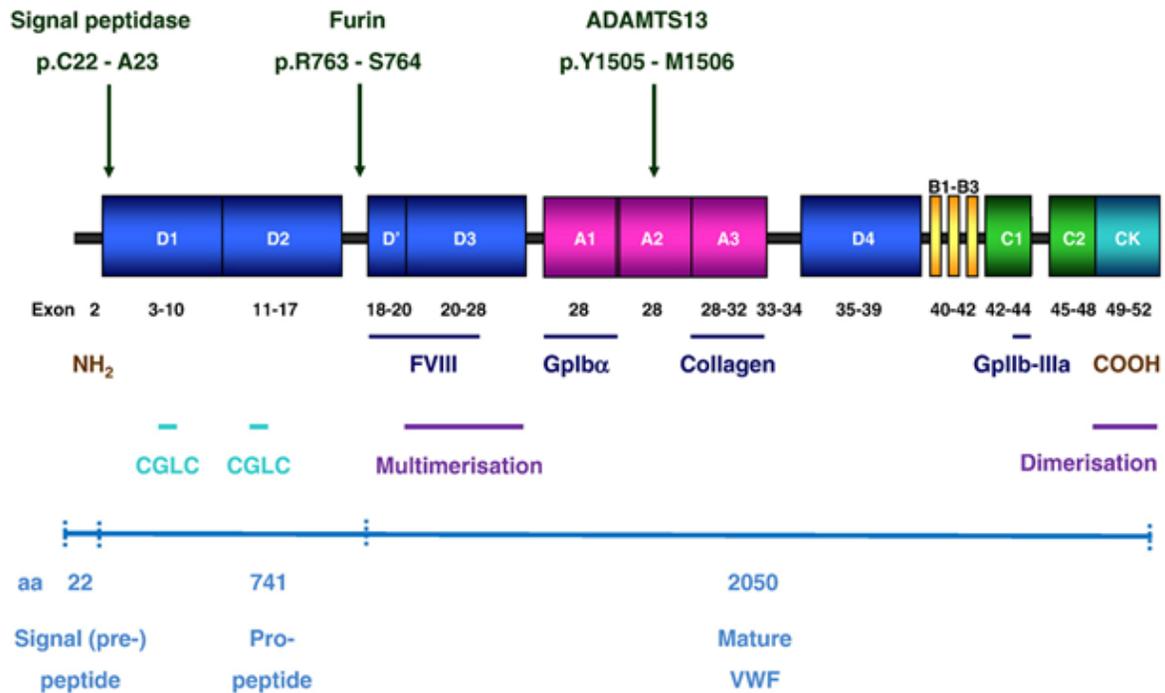


Figura 4 Esquematización de la proteína factor Von Willebrand: Dominios funcionales y sitios de unión de la proteína vWF. (A. C. Goodeve, 2010)

Los dominios D1 y D2 corresponden al propéptido, ayudan a la formación de multímeros y localización del vWF en organelos de almacenamiento, los dominios D3 y D' también se encuentran involucrados en el proceso multimerización y se encuentra el sitio de unión del FVIII, una vez se da esta unión lo mantiene activo inhibiendo su actividad sobre la trombina y prolongando su vida en media en el plasma, también protegen al FVIII de su degradación compitiendo con los sitios de unión fosfolípidos del factor y así evitando la actividad de la proteína C activada. Los dominios A son considerados los dominios funcionales de la proteína madura. El dominio A1 es el sitio de unión al receptor Gplb α plaquetario, también es el sitio de unión para la Heparina, el Colágeno tipo IV y VI, el dominio A2 es importante para los procesos de clivaje y depuración del vWF ya que se encuentra el sitio de reconocimiento en la posición 1605 y 1606 de la proteína ADAMTS13, el dominio A3 es el sitio de unión del Colágeno tipo II y III, el dominio C4 en el cual se encuentra la secuencia RGD que es el sitio de unión para la α IIb β 3 y el dominio CK interviene en los procesos de dimerización. (Lenting et al., 2015; J E Sadler, 1998) (Figura 4).

Los cambios postraduccionales de la proteína inician con la eliminación del péptido señal y glicosilación de sus cadenas en el retículo endoplásmico, el propéptido de 2791 aa

inicia el proceso de dimerización por la formación de puentes disulfuro en la posición C-terminal, posteriormente en su paso por el aparato de Golgi se completan los procesos de glicosilación y la proteína completa su proceso de maduración con la proteólisis de los dominios D1 y D2 que corresponde al propéptido y que actúa como coadyuvante en los procesos de multimerización, ya con 2051aa, la proteína madura está ampliamente glicosilada con 12 oligosacáridos ligados a la N glicosilación y 10 ligados a la O glicosilación. La sulfatación de ciertos oligosacáridos ligados al N promueve la iniciación de los procesos de multimerización formando puentes disulfuro en las regiones amino terminales de los dímeros lo que lleva a la formación de multímeros de distinto peso molecular que van desde los 225 kDa a los 120000 kDa. (Hassan et al., 2012; J E Sadler, 1998; Adriana Inés Woods et al., 2016)

El vWF es liberado por dos vías principales en respuesta a varios estímulos fisiológicos u farmacológicos como la trombina, la fuerza de cizallamiento y la desmopresina, la primera es la vía constitutiva en la cual el vWF es almacenado en los gránulos citoplasmáticos llamados cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales los cuales son orgánulos con forma de varilla y con una membrana de 0,1-0,2 μm de ancho y hasta 4 μm de largo, y la segunda es la vía regulada cuya secreción se da completamente desde los gránulos alfa de las plaquetas y los megacariocitos. (Lenting et al., 2015; J E Sadler, 1998)

Posterior a la liberación de la célula donde se sintetiza el vWF, los multímeros de alto peso molecular se unen a la superficie de las células endoteliales por medio de la P selectina de los cuerpos de Weibel-Palade después de esta unión estos multímeros se someten a la fuerza de cizallamiento del flujo sanguíneo y experimentan una reducción fisiológica de tamaño por la fragmentación proteolítica mediada por la proteína ADMTS-13, este proceso es el que da origen a las diferentes formas de vWF que pueden ir desde dímeros simples hasta multímeros más complejos. La liberación del vWF y el propéptido se realiza en una proporción 1:1 sin embargo a diferencia del vWF que tiene una vida media de aprox. 12 horas el propéptido tiene una vida media de aprox. 2 horas. (Haberichter et al., 2000; O'Sullivan et al., 2018; J E Sadler, 1998)

2.2.1 Función del factor von willebrand

El vWF desempeña sus funciones hemostáticas mediante la unión al factor VIII, a las glicoproteínas de la superficie de las plaquetas y a los componentes del tejido conectivo

por medio de los sitios de unión para este ligando.(Ruggeri & Zimmerman, 1987) Sus 3 funciones principales son

- Mediar la adhesión de las plaquetas al sitio de daño vascular por medio de la unión con el receptor Gplb/IX, y el colágeno del subendotelio: la unión del vWF a las plaquetas está regulada por su interacción inicial con el tejido conectivo, y también por la fuerza de cizallamiento del flujo sanguíneo. En ausencia de un daño o lesión, el vWF no interactúa con las plaquetas circulantes, cuando se presenta un daño en el endotelio el vWF se une a los componentes del tejido conectivo subendotelial, específicamente a los colágenos tipos IV, VI, III y I, una vez anclado al subendotelio las plaquetas reconocen esta unión y se adhieren al vWF por medio del complejo Gplb IX-V el cual está formado por cuatro cadenas polipeptídicas vinculadas por puentes disulfuro, el sitio de unión para el vWF se encuentran en el residuo 293 amino terminal de la cadena GPIb α y para su correcta unión requiere que exista una sulfatación de residuos de tirosina en las posiciones 276, 278 y 279. (Lenting et al., 2015; J E Sadler, 1998)
- Coadyuvar en la agregación plaquetaria mediante la unión con el receptor plaquetaria GpIIb/IIIa: el complejo GPIIb-IIIa es miembro de la familia de receptores tipo integrinas de la membrana celular, en estado de reposo este receptor no es afín con el vWF sin embargo cuando las plaquetas son activadas por estímulos como la trombina u otros agonistas, su conformación cambia y es capaz de unirse a vWF, el fibrinógeno y la fibronectina. El sitio de unión en el vWF incluye un motivo tetrapéptido Arg-Gly-Asp-Ser cerca del extremo carboxilterminal del dominio C1, adicionalmente este complejo GpIIb-IIa puede contribuir a la adhesión de plaquetas a superficies recubiertas con vWF. (Hernández-Zamora et al., 2015; Ruggeri & Zimmerman, 1987)
- Unirse al FVIII y protegerlo de la degradación proteolítica mediada por la proteína C activada: Los pacientes con EvW grave tienen niveles indetectables de vWF y niveles de factor VIII <10% de lo normal. Este comportamiento refleja la dependencia de la supervivencia normal del factor VIII de la formación de complejos no covalentes factor VIII-VWF e ilustra la importancia biológica de la interacción factor VIII-VWF. El sitio de unión correspondiente del VWF del factor VIII está cerca del amino terminal de la cadena ligera de 80 kDa esta cadena del FVIII está formada por los residuos 1649-2332, el sitio de unión del vWF está en el segmento entre los residuos 1669-1689 y la unión óptima requiere la sulfatación

de Tyr1680. Cuando el factor VIII se activa durante la cascada de coagulación la trombina lo escinde después de Arg1689, este corte elimina el sitio de unión del vWF y libera el factor VIIIa. Así, el vWF se adsorbe al tejido conectivo en un sitio de formación de trombos plaquetarios puede entregar el factor VIII para que participe en reacciones adicionales de coagulación sanguínea. (Hernández-Zamora et al., 2015; J E Sadler, 1998)

2.3 Alteraciones moleculares en el gen VWF

El gen VWF es altamente polimórfico y actualmente se han descrito alrededor 810 variantes de las cuales según la base de datos de la EAHAD (https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF) 141 han sido reportadas como causantes para EvW tipo 1, 202 para EvW tipo2 y 186 para EvW tipo 3. (Sheffield, n.d.)

Diferentes tipos de variantes son responsables de la EvW, la mayoría de ellas se observan comúnmente en otros trastornos hereditarios mientras que algunas son el resultado de características particulares del gen VWF y la proteína. (Mazurier & Meyer, 1996)

2.3.1 Variantes responsables de los diferentes tipos de EvW

2.3.1.1 Tipo 1

Las variantes identificadas en este tipo de EvW comprenden en un 70% variantes missense, 9% afectan el sitio de splicing, 8% transcripcionales, 6% deleciones pequeñas, 5% nonsense y 2% pequeñas duplicación e inserciones y han sido reportadas a lo largo de todo el gen. Se han descrito dos mecanismo por los cuales estas variantes actúan en la EvW tipo1, el primer mecanismo un efecto en el aclaramiento o depuración de la proteína, el vWF tiene una vida media de 8 a 12 horas cuando se presenta una alteración ejemplo la variante Vicenza p.R1205H, la vida media del vWF disminuye entre a 2 a 3 horas, esto fenotípicamente se correlaciona con los resultados de laboratorio de las pruebas de FvWpp y FvW:Ag en los que generalmente un ratio de las dos debe ser igual a 1 pero en presencia de este tipo de alteraciones se ve aumentada lo que significa un

aumento del aclaramiento de la proteína, otras variantes a parte de la Vicenza han sido relacionadas con el aclaramiento pero que nos disminuyen tan drásticamente la vida media del vWF como las missense p.R1205, p.C1130, p.W1144G, p.I1416N y p.S1279F. (L Baronciani et al., 2017; Anne Goodeve, 2016)

El segundo mecanismo es la retención intracelular, variantes missense en los dominios D1, D4 y C2 llevan a la secreción irregular de la proteína que se atribuye a problemas de plegado de la misma sin embargo estos mecanismos aún se encuentran en estudio. (A. C. Goodeve, 2010; Zhou et al., 2012)

2.3.1.2 Tipo 2

En la mayoría de estudios y en las distintas bases de datos las variantes relacionadas con la EvW tipo 2 se encuentran distribuidas en los exones 17, 18, 20 y 28 y que al revisar la estructura del gen hacen parte de los dominios funcionales de la proteína (L Baronciani et al., 2017; Anne Goodeve, 2016). El subtipo 2A es el que ha sido notificada con mayor frecuencia, representando generalmente >50% de todas las personas afectadas con la EvW de tipo 2. (E. J. Favaloro, Pasalic, et al., 2016)

- **2A:** La EvW 2A ha sido relacionada con la presencia de variantes en su mayoría tipo missense en los dominios A1 y A2, estas variantes dan a una síntesis, multimerización y secreción normal, pero conllevan un aumento de afinidad al ADAMTS13, modificando sus sitios de unión p.Y1605-M1606 y sin la necesidad de condiciones fisiológicas de cizallamiento se da la proteólisis y afectación funcional del vWF con la pérdida de multímeros de HMWM. Otras variantes son aquellas variantes nonsense que afectan los residuos p.C2771 y p.C2773 y que modifican el dominio D3 impidiendo la multimerización. De igual forma existen variantes conllevan a una afinidad reducida por la Gplb α y el consiguiente deterioro de la fijación de las plaquetas en el sitio de lesión del endotelio. (Bellissimo et al., 2012; A. C. Goodeve, 2010; Anne Goodeve, 2016)

El diagnóstico molecular puede ser útil cuando no se sabe con certeza el tipo de enfermedad de la EvW, en particular cuando se trata de una enfermedad de tipo 2A no se dispone de análisis de multímeros o los que se tiene son de baja calidad. (L Baronciani et al., 2017)

- **2B:** Las variantes en este tipo en su mayoría son missense y en menor medida duplicaciones, estas aumentan la afinidad del vWF con el Gplb α lo cual fenotípicamente se puede observar por RIPA, pérdida de multímeros y trombocitopenia, sin embargo, en algunos casos puede llegar a crear confusiones ya que algunos pacientes con variantes como p.P1266Q/L y p.R1308L no cumplen con estas características ya que el aumento del RIPA llega a ser el único indicativo. El análisis del extremo 5' del exón 28 en los codones 1266 -1461 que flanquean el dominio A1 es útil para la detección de las variantes para EvW 2B, si no se encuentran variantes en el análisis del exón 28 se podría pensar que se está hablando de un pseudo EvW en el cual las variantes se encontrarían en el gen codificante del receptor GP1BA. (L Baronciani et al., 2017; DiGiandomenico et al., 2021; Anne Goodeve, 2016)
- **2M:** Este tipo de EvW puede ser difícil de discriminar de los tipos 2A, 2B, la mayoría de las variantes son missense o deleciones dentro del marco de lectura y se encuentran en el exón 28 entre los codones 1266-1467, que están ubicados en el dominio A1 lo cual reduce o inhibe la interacción con el receptor Gplb α , su patrón de multímeros es normal o de baja intensidad. También se han reportado otras mutaciones aisladas en los dominios D3 exón 24 y CK exón 52 y 3 variantes en el dominio A3 de unión al colágeno.(L Baronciani et al., 2017; E. J. Favaloro, Pasalic, et al., 2016)
- **2N:** Este subtipo en el que el vWF se une poco o nada al FVIII, se asemeja a la hemofilia A leve con niveles de FVIII reducido, el diagnóstico diferencial puede lograrse utilizando el ensayo FvW: FVIII B, pero el ensayo no está ampliamente disponible ni bien estandarizado, en parte debido a la falta de evaluación externa de la calidad por tal razón el análisis molecular puede ayudar a la diferenciación. Se han descrito en su mayoría variantes missense con patrón de herencia autosómica recesiva, la mayoría de los pacientes heterocigotos compuestos para variantes diferentes, la variación de ambos alelos reduce o suprime la capacidad de unión del vWF al FVIII disminuyendo la interacción electrostática normal con el FVIII, las variantes también pueden afectar los puentes disulfuro necesarios para la estructura secundaria de la que depende la unión con el FVIII. (L Baronciani et al., 2017; Casonato et al., 2018; A. C. Goodeve, 2010)

La mayoría de las variantes se encuentran en los exones 18 y 20 donde se encuentra el dominio D' sin embargo también han sido reportadas variantes en otros exones como la

sustitución p.R760C el exón 17 la cual modifica el sitio de corte de la Furina lo que ocasiona que no se dé el clivaje del propéptido y obstaculizar estéricamente la unión del vWF al FVIII. (L Baronciani et al., 2017; Casonato et al., 2018)

2.3.1.3 Tipo 3

Al igual que el tipo 1 las variantes que han sido reportadas están distribuidas a lo largo del gen, aunque predominantemente se encuentran en los exones 3-11 y exones 37-52 que corresponden a los dominios D1, D2 y D4 CK respectivamente, por lo cual estas variantes afectan los procesos de dimerización o multimerización del vWF lo que lleva a una retención intracelular y excreción casi nula del factor. El patrón de herencia es autosómico recesivo por lo cual la mayoría de los pacientes con EvW tipo 3 tienen dos alelos nulos, han sido reportadas aproximadamente 190 variantes relacionadas con este tipo en su mayoría variantes truncantes como las nonsense, frameshift, deleciones y variantes en el sitio de splicing y en menor proporción <20% missense. Todas estas variantes llevan a que no se dé secreción del vWF. (L Baronciani et al., 2017; Eikenboom, 2001; A. C. Goodeve, 2010)

2.4 Diagnóstico para variantes del gen VWF

Existen varios abordajes metodológicos para la identificación y caracterización de las variantes en el gen VWF, el método convencional es el uso de ADN genómico para amplificación de exones por medio de la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación con el método Sanger, actualmente con las nuevas tecnologías NGS se ha logrado hacer la secuenciación completa del gen sin embargo esto implica un costo bastante alto y no se tiene disponibilidad en la mayoría de los laboratorios. (L Baronciani et al., 2017; Giancarlo Castaman & Linari, 2021)

2.4.1 Secuenciación Sanger

Este método de primera generación que permite establecer la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN, usando nucleótidos modificados con la ausencia del extremo 3'OH, por lo que cuando se incorpora un dideoxynucleótido queda un fragmento truncado de ADN que puede ser separado electroforéticamente, cada uno de los dideoxynucleótido

son marcados con fluoróforos que permiten determinar rápidamente la secuencia de nucleótidos. (McGinn & Gut, 2013)

Es la técnica más utilizada para la identificación de variantes en el gen VWF, con la introducción de la tecnología NGS se ha reducido su utilización sin embargo derivado a los costos aún sigue siendo ampliamente utilizado especialmente en aquellas ocasiones que se pretende realizar la búsqueda de variantes en exones específicos como en el caso de los pacientes con EvW tipo 2. (Itzhar-Baikian et al., 2019)

3.Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar las variantes en el exón 28 del gen VWF y realizar la correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con Enfermedad de Von Willebrand tipo 2 en una institución de la ciudad de Bogotá D.C Colombia.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar las variantes presentes en el exón 28 del gen del factor VWF mediante amplificación por PCR y secuenciación Sanger
2. Describir las variantes encontradas y su frecuencia en la muestra de pacientes analizada.
3. Correlacionar los resultados del genotipo con las características fenotípicas y variables clínicas de los pacientes con EvW tipo 2 y respectiva comparación con otros estudios a nivel mundial.
4. Establecer un registro inicial con las variantes encontradas en el exón 28 gen VWF de la muestra analizada.

4. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal

4.2 Pacientes

La muestra analizada corresponde 20 pacientes con diagnóstico clínico y de laboratorio confirmado de Enfermedad de Von Willebrand tipo 2 que asisten a la consulta de hematología de la Clínica Infantil Colsubsidio en la ciudad de Bogotá.

Las muestras se tomaron previo consentimiento informado por parte de los pacientes o de sus acudientes y previa aprobación por los Comités de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional y de la Clínica Infantil Colsubsidio.

Los pacientes fueron contactados al momento de su asistencia a la consulta de hematología de la Clínica infantil Colsubsidio donde se les explicó el fin de la investigación, consentimiento informado y se tomaron las muestras.

- Criterios de Inclusión:

Pacientes con diagnóstico de Enfermedad Von Willebrand tipo 2

Se tomarán en cuenta datos de la historia clínica y análisis fenotípicos.

- Criterios de Exclusión

Pacientes afectados con cualquier otro trastorno de la coagulación.

La caracterización de los individuos con sus datos demográficos, identificación de la muestra se puede observar en la tabla 3.

4.3 Muestra

Previo consentimiento se obtuvieron muestras de sangre periférica de cada paciente por el personal de enfermería del programa de Hemofilia de la Clínica Infantil Colsubsidio, en el momento que el paciente asistía a su control y consulta. Se recolectaron 4 ml de sangre en tubo tapa lila con anticoagulante EDTA.

4.4 Aislamiento de ADN

Se realizó el aislamiento de ADN a partir de 200µL de sangre periférica y se utilizó el kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini siguiendo las especificaciones del fabricante y posteriormente se realizó la cuantificación por espectrofotometría en equipo NANODROP evaluando los radios 260/280 y 260/230 para determinar calidad y pureza y se almaceno el ADN a una temperatura de -20°C en tubos eppendorf de 1.5 mL

4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó un PCR estándar con las siguientes condiciones la mezcla de PCR con un aprox 100-200 ng de ADN, 10 pmol de cada primer, 1,5 µM de MgCl₂, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerasa, 200 nmol /mL de cada dNTP y Buffer 1X a un volumen de 50 uL. El programa del termociclador: desnaturalización 95°C por 5min, 29 ciclos 95°C por 30 seg ,60 °C por 30 seg, 72 °C por 1 minuto y extensión 72°C por 5 min. (Anexo B)

Los productos de la PCR se purificaron utilizando el kit PCR Purification kit de Invitrogen siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la amplificación por PCR, se utilizaron los primers descritos Freitas et al, a los cuales se les realizaron algunas modificaciones para optimizar la amplificación por PCR. (Freitas et al., 2019)

Tabla 1 *Primers para la amplificación de Exón 28 gen VWF*

Primer	Secuencia (5' to 3')	Tamaño del fragmento
28F	TGTGGGAATATGGAAGTCATTG	749
28IR	CACAGAGGTAGCTAACGATCTCG	
28IIF	ACCTCAAGCAGATCCGCCTCATC	514
28IIIR	TGACCATGTAGACCAGGTTGGGCG	
28IIIF	CCATGGTTCTGGATGTGGCGTTTCG	630
28IVR	AAGCCAGGATTAGAACCCGAGTCG	

Tomado de: (Freitas, 2019)

A los pacientes que no se encontró variantes en el Exón 28, se realizó amplificación y secuenciación de los exones 18 y 20

Tabla 2 *Primers para la amplificación de Exones 18 y 20 gen VWF*

Primer	Secuencia (5' to 3')	Tamaño del fragmento
18 F	GCAACTCTGAGTCTCTTGAA	330
18 R	CCTGCCTACAAGAAACTGAA	
20F	CTGTGTTCCCTTCATTGCCTC	311
20R	AGATCCACAGAACCCAACCT	

Tomado de: (Freitas, 2019)

Se realizó la comprobación de la PCR con electroforesis en agarosa al 1.5%, utilizando 1.5 gr de Agarosa y 150 ml de TBE 10X y se visualizará en transiluminador UV.

4.6 Secuenciación BIGDYE TERMINATORS V3.1

Se utilizaron entre 5-10 ng de fragmentos de PCR purificados para llevar a cabo la secuenciación con el kit BigDye 3.1 terminator cycle sequencing kit. Los productos de reacción de secuencia se purificaron mediante el kit Xterminator de Applied Biosystems, previo a su análisis por electroforesis capilar en un equipo ABI 3500 con capilar de 50 cms y POP7.

Para realizar el análisis de las secuencias e identificación de las variantes se utilizó con los programas SeqScape V2.7 (appliedBiosystems), comparando las secuencias con la secuencia de referencia: la identificación de variaciones se utilizará la secuencia de referencia NG_009072.2 (Homo sapiens von Willebrand factor (VWF), RefSeqGene (LRG_587) on chromosome 12) siguiendo las recomendaciones del fabricante

4.7 Análisis de variantes

Se realizó la descripción de las variantes genéticas encontradas y frecuencia en la muestra analizada y posteriormente se realizó la comparación de variantes encontradas con las bases de datos de la EAHAD, VARSOME, GNOMAD, y ClinVar, también con otros estudios.

Las variantes se reportan siguiendo las guías de Human Genome Variation Society (HGVS) (den Dunnen et al., 2016.) Los criterios de patogenicidad de cada una de las

variantes analizadas se llevó a cabo con base en las recomendaciones del ACMG.(Richards et al., 2015)

Para determinar la frecuencia de las variaciones moleculares detectadas en la cohorte de los 20 pacientes analizados, se tomaron en cuenta solamente individuos no relacionados. Derivado a lo anterior el análisis de las variantes detectados en los pacientes P02 y P03 (Madre e hijo); P16 y P06 (Padre e hija); P09 y P11 (Hermanos), solo se consideró una sola vez las variantes detectadas para el cálculo de frecuencias. Por consiguiente, el número de pacientes no relacionados es de 17 pacientes.

5.Consideraciones éticas

En base a los principios que se establecen en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y en la Ley 84 de 1989 este trabajo se considera como Investigación con riesgo mínimo y en cumplimiento con los aspectos mencionados en el Artículo 6 de la presente Resolución, este estudio se desarrollará conforme a los siguientes principios:

1. Garantizar el respeto por la dignidad humana, la libertad y la autodeterminación, prevenir daños y tensiones y proteger la privacidad.
2. Anexar el formato de consentimiento informado el cual será divulgado a los pacientes explicado paso a paso sus apartes previamente a la toma de las muestras.
3. Asegurar la confidencialidad de las identidades de los participantes
4. Se tiene el compromiso de compartir con los pacientes y cuidadores los resultados y que implican en su condición
5. Compromiso a publicar los resultados en los medios más relevantes para su comunidad científica específica.

6.Resultados

Se analizaron un total de 20 muestras de pacientes previamente diagnosticados con la Enfermedad de Von willebrand tipo 2 que asisten a consulta en la Clínica Infantil Colsubsidio. La edad de los pacientes analizados es de un rango entre los 8 a los 56 años con una la edad media de 24.15 años. De esta muestra el 60% de sexo masculino y 40% femenino. (Tabla 3)

ID	SEXO	EDAD	vWF Ag UI/DI	vWF: Rco UI/dL	vWF: RCo/FvW Ag	FVIII UI/dL	MULTIMEROS1
P1	F	20	30	7.87	0.262	32	PHMWM
P2	M	11	74	29	0.392	101	Normales
P3	M	23	17	7.9	0.465	30	Normales
P4	F	36	13.8	5.9	0.428	22.7	NBI
P5	M	18	53	17	0.321	8.5	Sin dato
P6	M	19	29	0.1	0.003	49	PHMWM
P7	M	32	38	24	0.632	8	NBI
P8	F	14	88	21	0.239	118	Sin dato
P9	M	8	40	21	0.525	80	Presentes en cantidad reducida
P10	F	15	66	27	0.409	67	Sin dato
P11	M	8	43	23	0.535	91	Normales
P12	F	15	38	9.8	0.258	58	Normales
P13	F	9	30	14	0.467	53	PHMWM PIMWM
P14	M	15	59	20	0.339	84	Normales
P15	M	56	21	4.5	0.214	29	PHMWM
P16	M	44	25	0.2	0.008	28	PIMWM LMWM
P17	F	41	47	11	0.234	62	Normales
P18	F	21	79	26	0.329	106	Normales
P19	M	48	81	17	0.210	81	Normales
P20	M	30	20	3	0.150	17.5	PHMWM PIMWM

1.PHMWM: perdida multímeros alto peso molecular, PIMWM perdida multímeros de Intermedio peso molecular, PLMWM: perdida multímeros bajo peso molecular, NBI: Normales baja intensidad.

La mayoría de las pacientes presentan Epistaxis (48%), siendo el Sangrado menstrual abundante y Sangrado gingival (16%) la segunda causa de consulta. El 40% de los pacientes cursan con más de un síntoma (Figura 5)

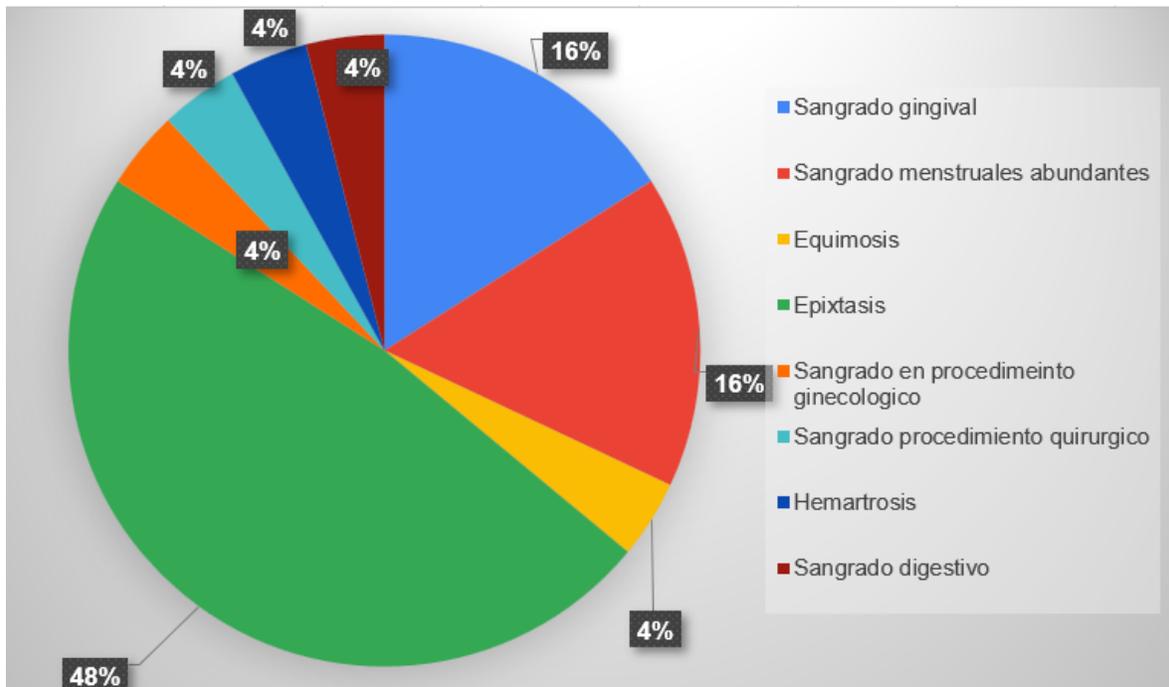


Figura 5 Principales síntomas

Seis pacientes tienen disponibles pruebas de respuesta a la desmopresina 50% responde y el 50% con respuesta ineficaz

Tabla 3 Respuesta a la Desmopresina

ID	TEST DE DESMOPRESINA
P07	Responde a la desmopresina
P08	Responde a la desmopresina
P10	Responde a la desmopresina
P16	Responde a desmopresina sin lograr incrementos en la actividad
P17	No responde
P20	Responde a desmopresina sin lograr incrementos en la actividad

6.1 Secuenciación Exón 28 del gen VWF

Por medio de Secuenciación Sanger se analizó el exón 28 en las 20 muestras recolectadas identificándose 41 variantes. 9 variantes (21.95%) fueron identificadas como causantes en 18 pacientes, todas de tipo missense. (Tabla 5.)

Cuatro variantes fueron identificadas para EvW 2A p.Gly1609Arg, p.Arg1597Trp, p.Ser1506Leu y p. p.Ile1628Thr. Cuatro para la EvW 2M p.Ala1437Thr, p.Ile1425Phe, p.Arg1334Trp y p.Ser1325Phe, una como EvW 2A/2M p.Val1279Phe. (Tabla 5)

Tabla 4 Variantes patogénicas encontradas

ID	VARIANTE GENÉTICA	SUSTITUCIÓN DE AMINOACIDO	Tipo variante	de REPORTADA PREVIAMENTE	DOMINO
P01	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P02	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P03	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P04	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P05	c.4309G>A	p.Ala1437Thr	Missense	SI	A1
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P06	c.4789C>T	p.Arg1597Trp	Missense	SI	A2
P07	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI	A1
P08	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
P09	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI	A1
P10	c.4000C>T	p.Arg1334Trp	Missense	SI	A1
P11	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI	A1
P12	c.4273A>T	p.Ile1425Phe	Missense	SI	A1
P13	c.4517C>T	p.Ser1506Leu	Missense	SI	A2
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P14	c.4309G>A	p.Ala1437Thr	Missense	SI	A1
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P15	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P16	c.4789C>T	p.Arg1597Trp	Missense	SI	A2
	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
P17	c.4825G>A	p.Gly1609Arg	Missense	SI	A2
	c.3835G>T	p.Val1279Phe	Missense	SI	A1
P18	c.4309G>A	p.Ala1437Thr	Missense	SI	A1
P19	c.4883T>C	p.Ile1628Thr	Missense	SI	A2
	c.3974C>T	p.Ser1325Phe	Missense	SI	A1
P20	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*

1. N/A*: No aplica, no se encontraron variantes

La gran mayoría de las Variantes identificadas en este estudio se encuentran en los dominios A1 y A2 de la proteína. (Figura 6)

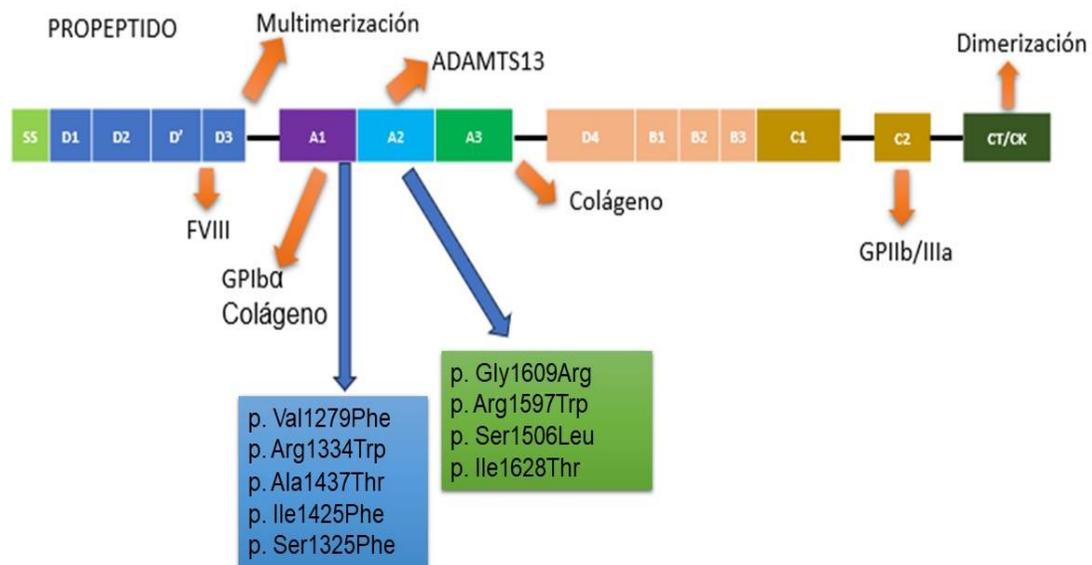


Figura 6 Distribución de variantes causales en el exón 28 del gen VWF en la muestra analizada.

6.2 Tipos de variantes

Variantes tipo missense fueron encontradas en 15 (88.24%) de los 17 pacientes analizados, todas distribuidas en los dominios A1 y A2 de la proteína. La variante p.Gly1609Arg (c. c.4825G>A) fue encontrada en 9 pacientes (52.94%). (Figura 7)

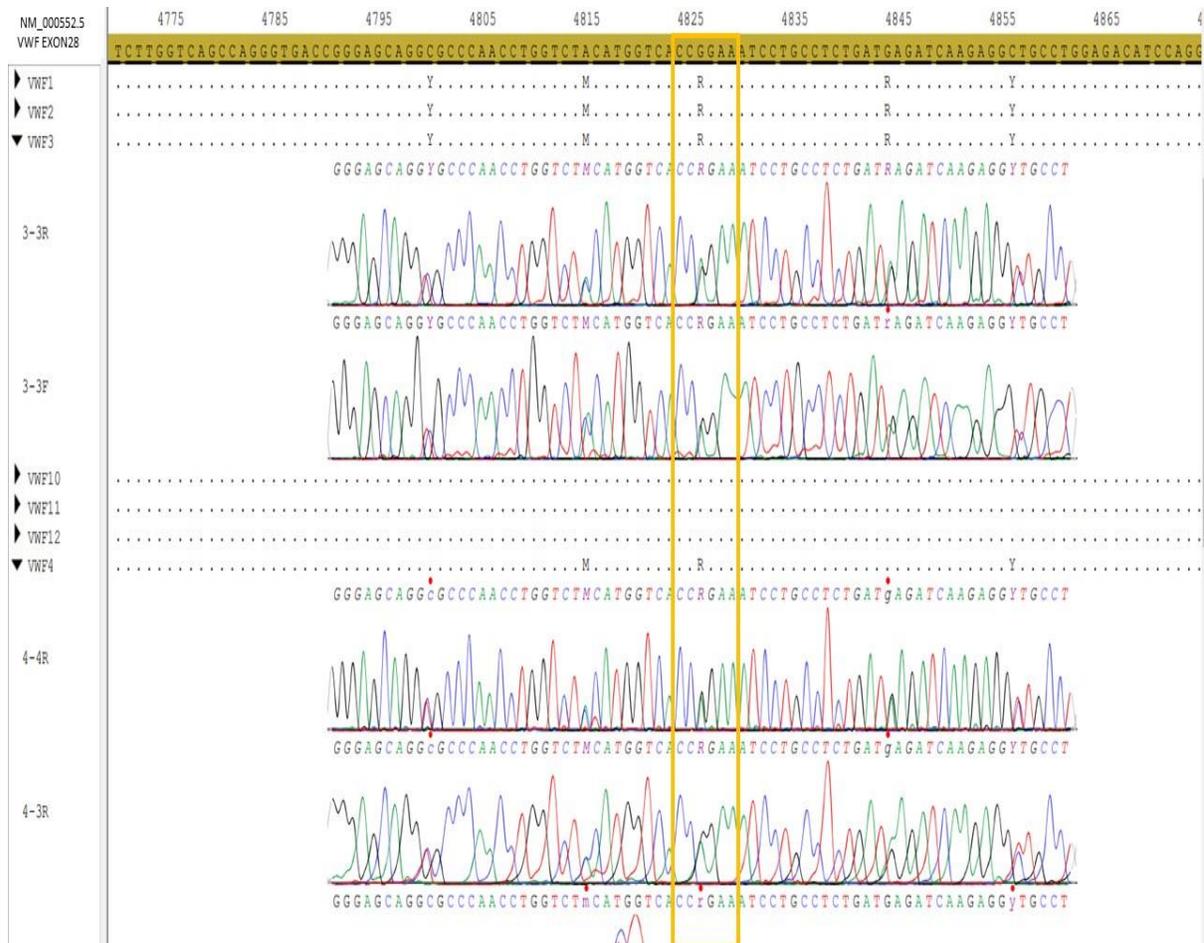


Figura 7 Electroferogramas variante c.4825G>A en el Exón 28

Cinco de esos pacientes (55.56%) tienen doble variante causal con un fenotipo diferente entre sí, 2 con la variante p.Ala1437Thr (c.4309G>A), 1 con la variante p.Ser1506Leu (c.4517C>T), 1 con la variante p.Arg1597Trp (c.4789C>T) y 1 con la variante p.Val1279Phe (c.3835G>T). (Figuras 8-11)

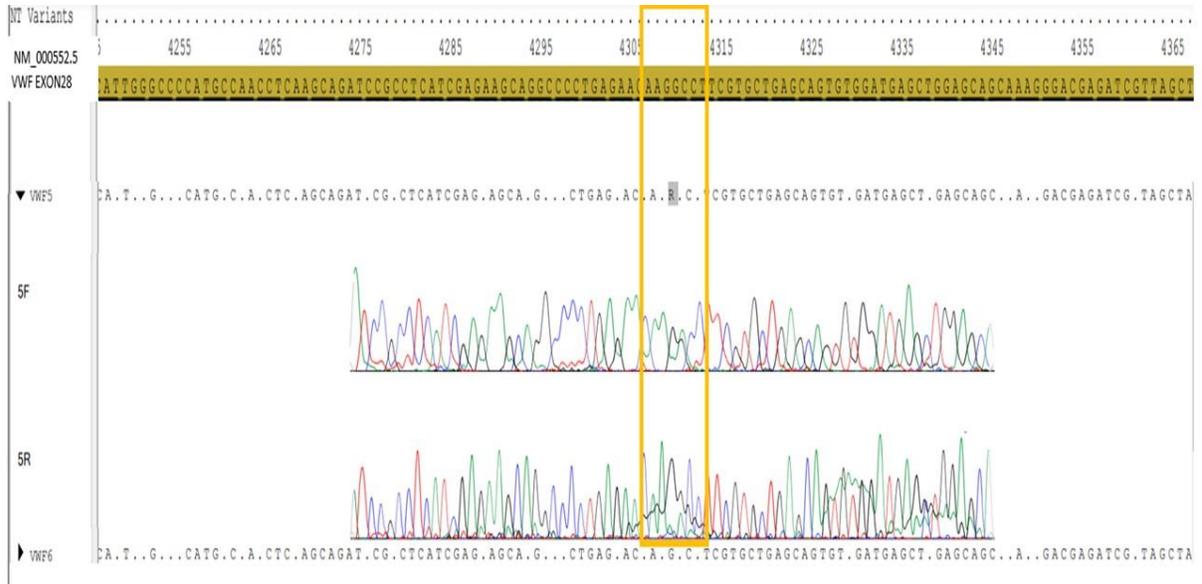


Figura 8 Electroferograma variante c.4309G>A en el Exón 28 P05

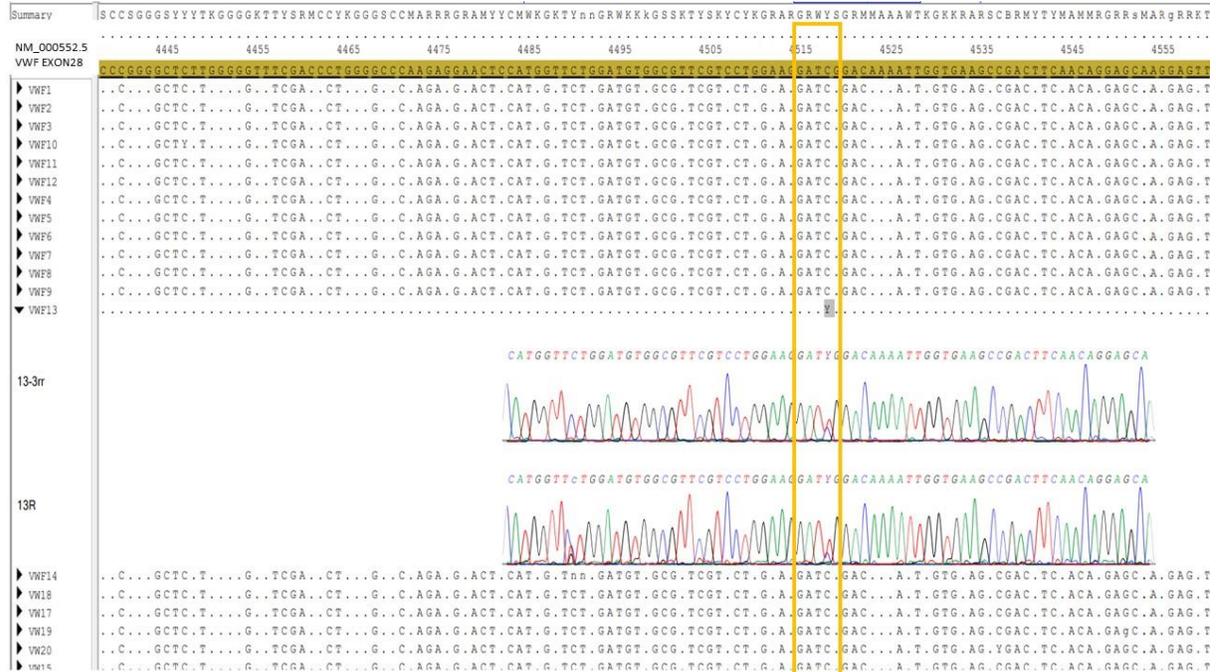


Figura 9 Electroferograma variante c.4517C>T en el Exón 28 P13

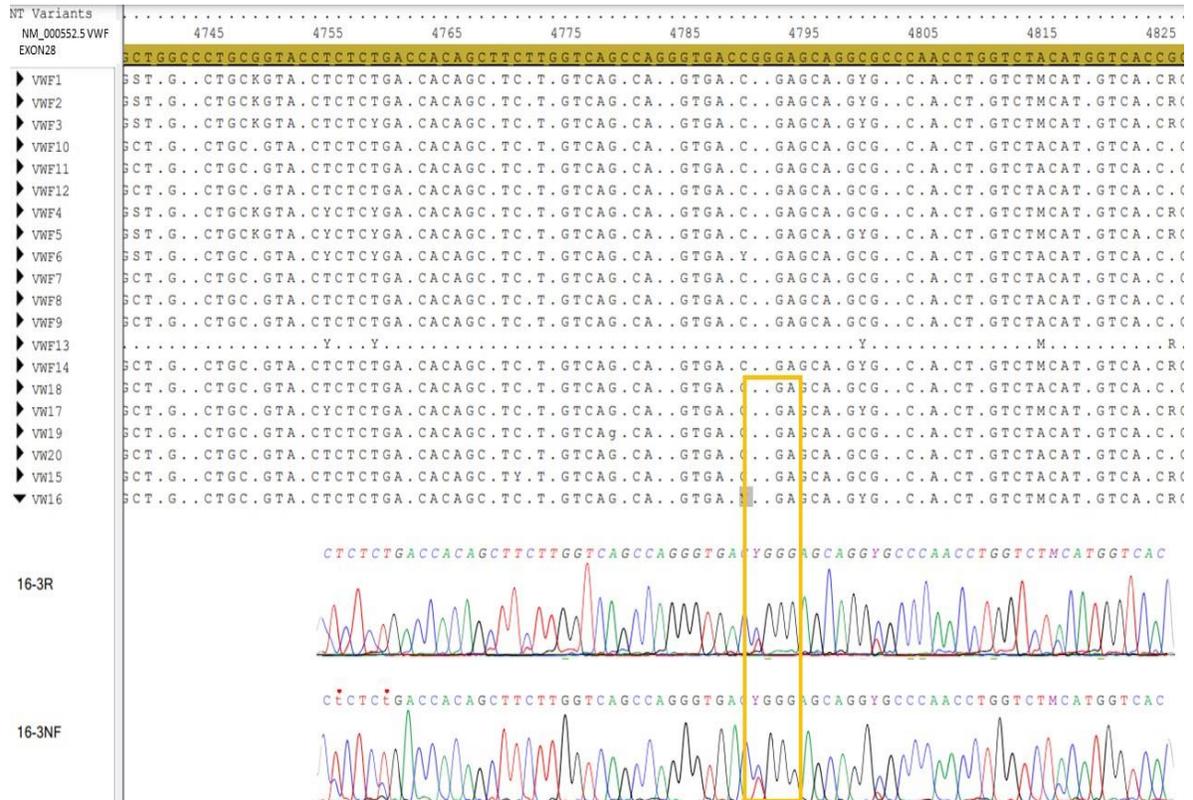


Figura 10 Electroferograma variante c.4789C>T en el Exón 28 P16

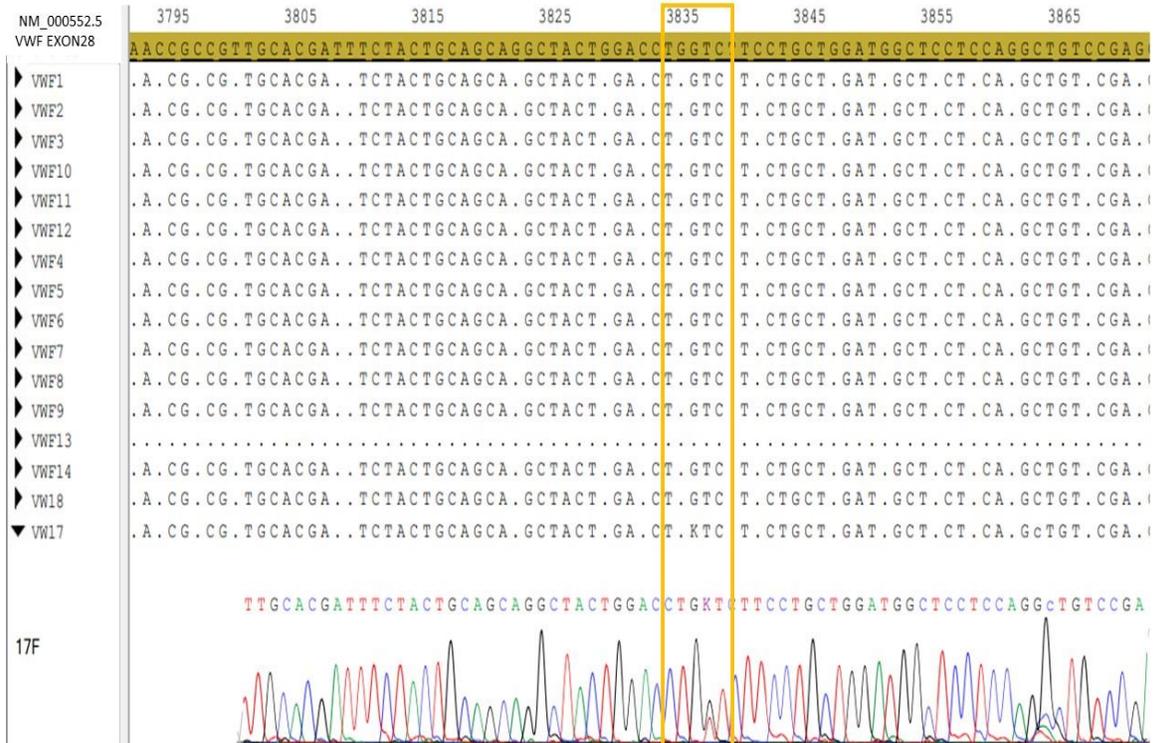


Figura 11 Electroferograma variante c.3835G>T en el Exón 28 P17

Se identifico una variante missense p.Ile1425Phe (c.4273A>T) en tres pacientes (17.64%) de los 20 pacientes analizados, esta variante se encuentra ubicado en el Dominio A1 de la proteína (Figura 12)

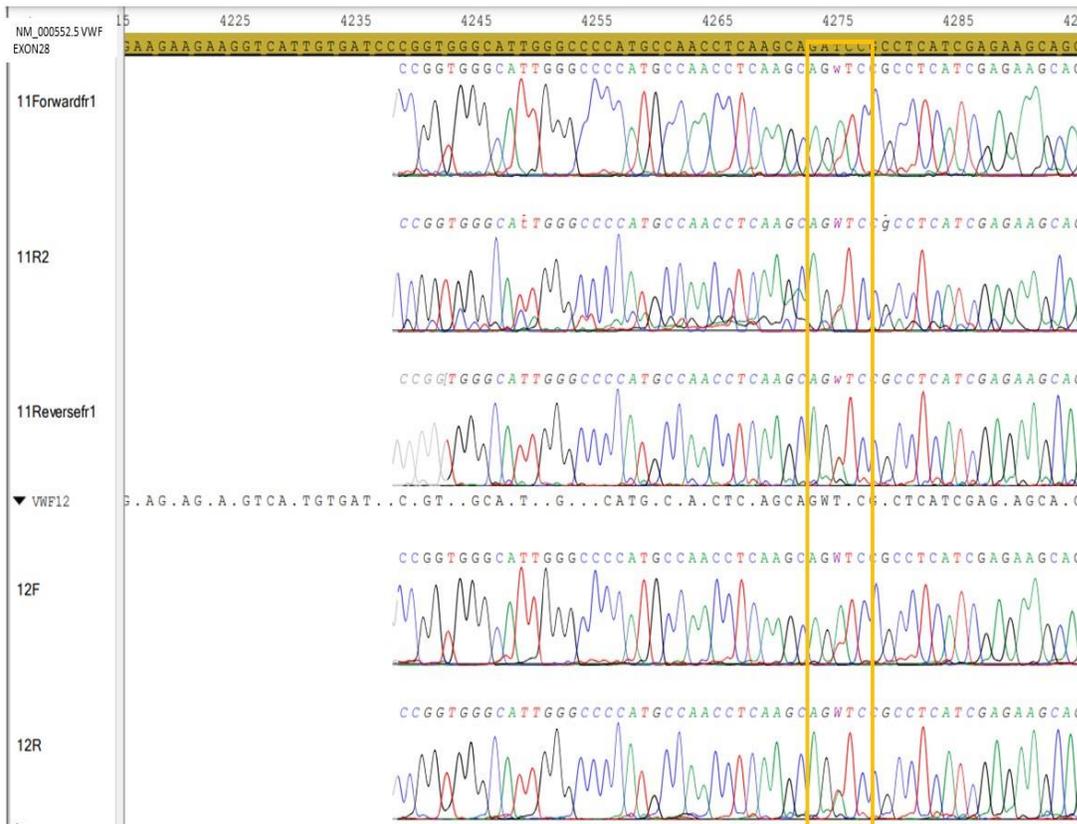
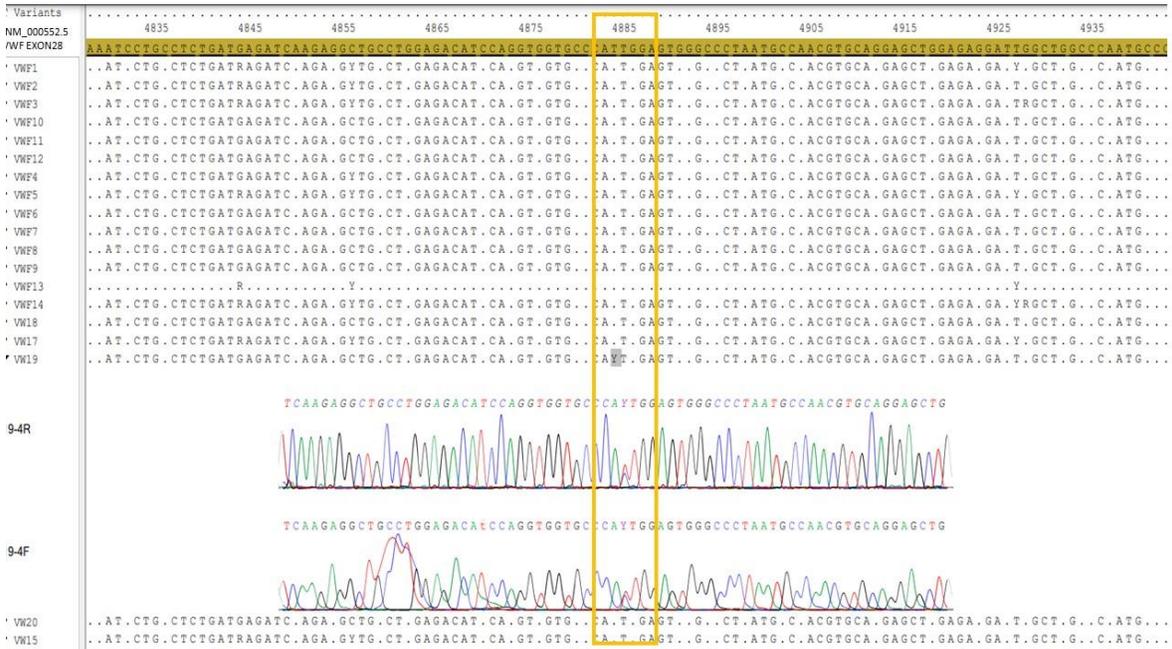


Figura 12 Electroferogramas variante c.4273A>T en el Exón 28 P11 y 12

El paciente P19 presente de igual forma doble variante causal p.Ile1628Thr (c.4883T>C) y p.Ser1325Phe (c.3974C>T). (Figura 13)



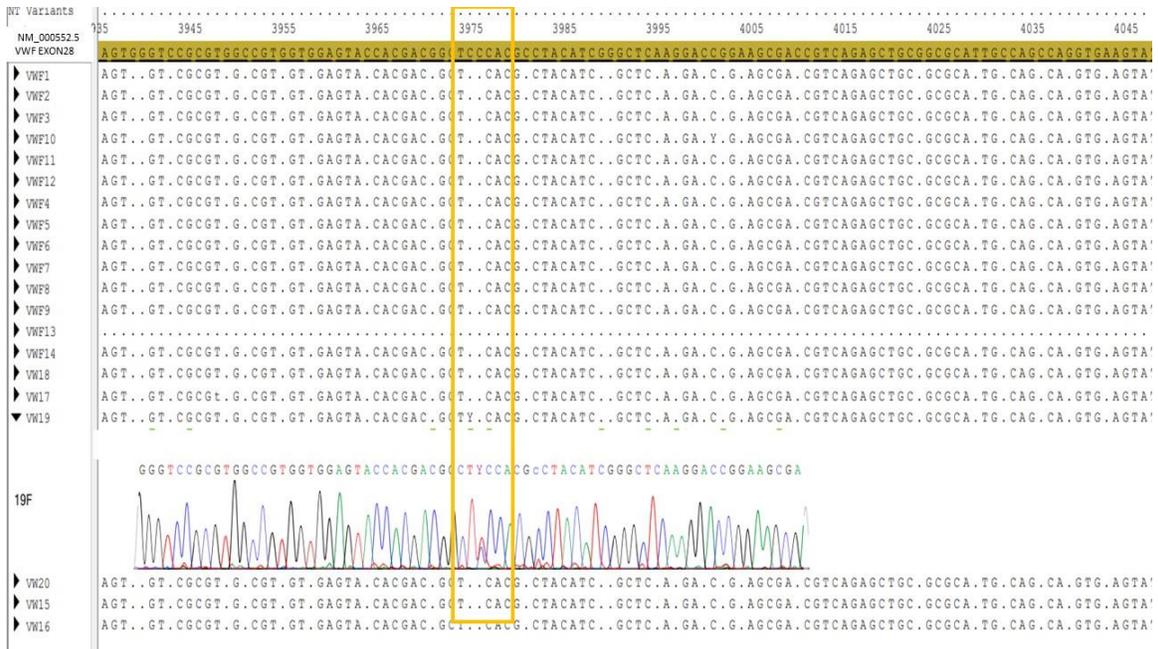


Figura 13 Electroferogramas pacientes P19

El paciente P10 se encontró una variante missense p.Arg1334Trp (c.4000C>T). (Figura 14)

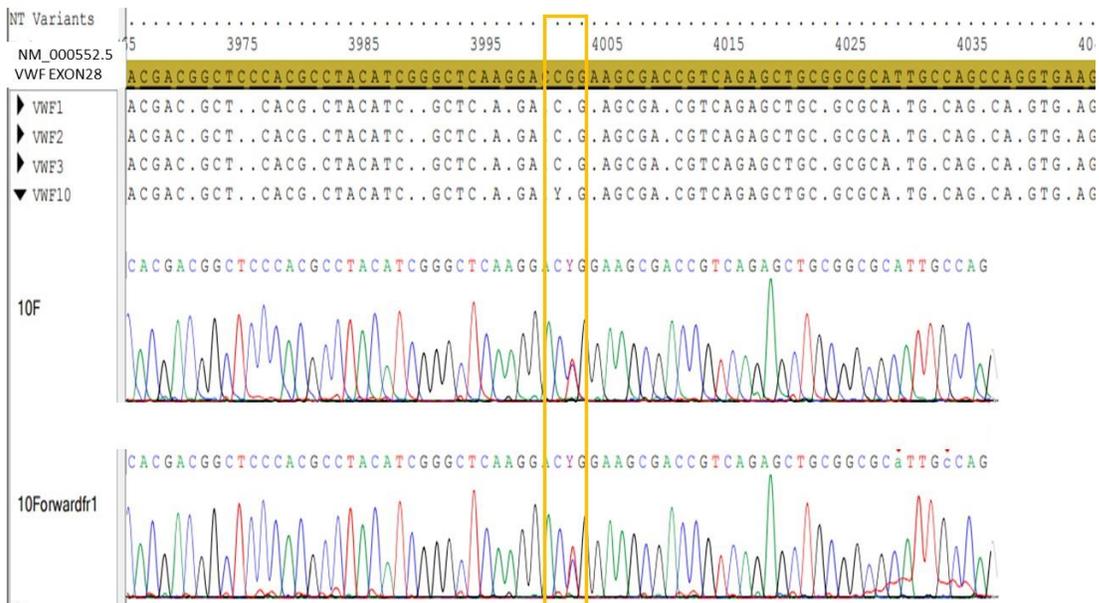


Figura 14 Electroferograma paciente P10

En 2 pacientes (P08 y P20) en los cuales no se detectó variante patogénica o probablemente patogénica se procedió a secuenciar los exones 18 y 20 del gen VWF

como posibles sitios de ubicación de las variantes patogénicas, sin embargo, no se encontró variantes asociadas al desarrollo de la enfermedad.

6.3 Correlación genotipo-fenotipo

De los 20 pacientes analizados, el 15% presentan un fenotipo severo, con historial de transfusiones y profilaxis de factores (P06, P13 y P15), uno de ellos presenta sangrados mayores a nivel gástrico y hemartrosis (P15)

El P05 (Ver Tabla 1) presenta manifestaciones clínicas leves y asiste a la consulta por diagnóstico inicial de Hemofilia A leve (tiene historia familiar de Hemofilia A) y en el estudio ampliado de hemofilia A la dosificación del vWF:Rco le dio bajo en 3 oportunidades diferentes, se estudiaron los miembros de la familia para EvW y ninguno tiene niveles bajos, este paciente tiene un doble defecto de la coagulación Hemofilia A leve y EvW (tiene estudio genético también para hemofilia A).

Derivado a las variantes encontradas y el fenotipo de cada paciente posterior correlación se realizó una clasificación de los subtipos de EvW. Un total de 8 de 20 (40%) pacientes fueron reclasificados con base en los análisis moleculares realizados. (Tabla 6)

Tabla 5 Clasificación tipo de EvW según estudios realizados

ID	Tipo de EvW 2 de acuerdo con estudios de laboratorio	Tipo de EvW de acuerdo con estudios genéticos
P01	2A	2A
P02	2M	2M
P03	2	2M
P04	2	2M
P05	2A	2A
P06	2A	2A
P07	2	2M
P08	2A	No identificado
P09	2A	2M
P10	2A	2M
P11	2A	2M
P12	2	2M
P13	2A	2A
P14	2	2M
P15	2A	2A
P16	2A	2A
P17	2M	2M
P18	2M	2M
P19	2M	2M
P20	2A	No identificado

6.DISCUSIÓN

Se analizó el exón 28 del gen VWF mediante secuenciación Sanger en 20 pacientes que asistían a consulta en la Clínica Infantil Colsubsidio, en este estudio se encontró variante patogénica causal en el 88.2% de los pacientes analizados, todas las variantes encontradas son de tipo missense. Para la EvW tipo 2 en diferentes cohortes se han reportado variantes de este tipo para la EvW tipo 2, ubicadas principalmente a lo largo de los dominios funcionales de la proteína. (Milán 88%, Brasil 84.2%, China 53.84%, Argentina 37.5%, España 50.21%, República checa 50%).(Borràs et al., 2017; Freitas et al., 2019; Liang et al., 2017; Seidizadeh et al., 2022; Vangenechten et al., 2019; Adriana I Woods et al., 2017) La localización de las variantes en el gen VWF determina la función anómala del vWF y, por consiguiente es una guía para identificar el subtipo de la EvW de tipo 2. (Atiq et al., 2022).

La variante p.Gly1609Arg fue encontrada en 9 pacientes (52.94%) (Ver tabla 5), ha sido reportada en diferentes cohortes a nivel mundial, con múltiples individuos afectados, con enfermedad de von Willebrand tipo 2A .(Borràs et al., 2017; Choi et al., 2012). En estudios de cohortes con mayor cantidad de pacientes en España, Francia, y proyecto Zimmerman las variantes con mayor frecuencia han sido Ile1628Thr, p.Ser1506Leu, and p.Arg1597Gln. (Seidizadeh et al., 2022). Esta variante p.Gly1609Arg está ubicada en el domino A2 donde se encuentra el sitio de unión para la proteína ADAMTS13 (Figura 6). Los estudios funcionales de esta variante demuestran un efecto perjudicial que resulta en un aumento de la proteólisis de la proteína y en la mayoría de los casos pérdida de multímeros de alto e intermedio peso molecular. (Hassenpflug et al., 2006). En esta muestra 40% de los casos con esta variante presentaban pérdida de los multímeros de alto peso molecular, 40% un patrón normal, 10% con un patrón normal pero de baja intensidad y 10% que no se tiene este dato, el patrón variable en los multímeros es causa del nivel de afectación que el vWF en cada caso y si existen coexistencia con otras variantes. (Jacobi et al., 2012). De los 9 pacientes con la variante p.Gly1609Arg cinco de ellos tenían otra variante adicional. (Ver tabla 4).

El caso P05 es un caso con doble defecto de la coagulación Hemofilia A confirmado en un estudio anterior donde se encontró variante en hemicigosis en el gen F8 c.5666A>G p. Gln1889Arg, clasificada como variante de significado incierto (VUS) inicialmente pero con

niveles bajos de FVIII con severidad leve (Yunis et al., 2018). Esta variante ha sido posteriormente reclasificada a variante probablemente patogénica (ClinVar VCV001174594.1), y en esta evaluación se encontraron en el exón 28 del gen VWF dos variantes adicionales c.4825G>A. p.Gly1609Arg y c.4309G>A. p.Ala1437Thr la cual ha sido reportado en pacientes con EvW 2M.(Casaña et al., 2001; Gadisseur et al., 2009) El paciente tiene historia familiar, el abuelo materno, madre, hermano, primos y tía materna con diagnóstico confirmado de Hemofilia A leve, fenotípicamente presenta disminución del factor VIII más marcada que sus otros familiares, tiene vWF:RCo disminuido (ningún miembro de la familia estudiado lo tiene) y el ratio vWF:RCo/FvW Ag es concordante con la EvW tipo 2A. No ha presentado manifestaciones clínicas severas. Las coagulopatías hereditarias que coexisten con la EvW son poco frecuentes siendo la Hemofilia A la más común en estos casos, no se tiene una frecuencia definida para esta combinación ya que los casos reportados en la literatura son pocos y no han sido evaluados en grandes poblaciones. (Gastaldi et al., 1978; Kavakli et al., 2011; O'Brien et al., 2007)

El caso P14 también presenta 2 variantes p.Gly1609Arg y p.Ala1437Thr una clasificada como 2A y la otra como 2M, en diferentes estudios se ha reportado que una misma variante puede causar tanto el fenotipo del subtipo 2A como el fenotipo del subtipo 2M y es probable que en algunos casos se pueda presentar mayor dificultades al realizar la clasificación.(E. J. Favaloro, Pasalic, et al., 2016). Este paciente presenta unas manifestaciones clínicas leves con un patrón de multímeros normales, de acuerdo su fenotipo y variantes presentadas es clasificado como un tipo 2M. (E. J. Favaloro, Bonar, et al., 2016)

El caso P13 tiene la variante p.Ser1506Leu junto la variante p.Gly1609Arg, el cambio en la posición 1506 ha sido reportado previamente en estudios de la EvW tipo 2A. (Berber et al., 2013; Culpán et al., 1997; Hassenpflug et al., 2006; Jacobi et al., 2012; Shen et al., 2016). Su efecto es la sustitución en una posición conservada en mamíferos que afecta la estructura secundaria de la proteína debido a los cambios de en polaridad, carga y tamaño de cada aminoácido y sus estudios funcionales muestran efecto en la producción de multímeros de alto e intermedio peso molecular y relacionada con actividad del vWF bastante alterada. (Hassenpflug et al., 2006; Jacobi et al., 2012). El paciente P13 presenta un cuadro clínico marcado y es uno de los pacientes ha necesitado transfusiones por causa de sangrado excesivo y se encuentra bajo tratamiento profiláctico con factor FVIII

rico en vWF. Diferentes casos se han reportado con la presencia de dos variantes en los que el cuadro de la paciente varía de acuerdo al nivel de disfuncionalidad del vWF, en este caso en particular las dos variantes se encuentran en el dominio funcional A2 (Figura6), el patrón de multímeros del paciente muestra pérdida de los multímeros de alto e intermedio peso molecular, las dos variantes relacionadas juegan un papel importante en 4 mecanismos que desregulados llevan a la aparición de la enfermedad: 1) retención intracelular y degradación de la proteína, 2) defectos en la multimerización, 3) desregulación almacenamiento y 4) aumento proteólisis mediada por el ADAMTS13.(Jacobi et al., 2012)

La variante p.Arg1597Trp se encontró junto la variante p.Gly1609Arg en el paciente P16 y, paciente con un fenotipo severo, pérdida de multímeros de alto e intermedio peso molecular, con historial de transfusiones y con Madre y Hermano diagnosticados clínicamente con EvW tipo 3. La variante p.Arg1597Trp ha sido reportada en pacientes 2A, estudios In vitro han demostrado que esta aumenta la susceptibilidad al clivaje de la proteína mediada por el ADAMTS13, afectando los procesos de multimerización, estar reportada en varias bases de datos como patogénica y no ha sido reportada en las bases de datos de la población general, indicando que no es una variante común. (Luciano Baronciani et al., 2006; Pruss et al., 2012; Starke et al., 2013). Adicionalmente la Arginina en el codón 1597 es altamente conservada en el loop de unión al calcio del dominio A2 del vWF y otras variantes en esa posición han sido reportadas como patogénicas en pacientes con EvW tipo 2A. (Liang et al., 2017; Xu & Springer, 2013). Esta variante p.Arg1597Trp se encontró también en el paciente P06 el cual presenta un cuadro clínico moderado caracterizado por la presencia de sangrados nasales y menstruales abundantes, con historia familiar del padre, abuelo, hermano menor, tía y primos paternos con diagnóstico clínico de EvW, adicionalmente tiene tratamiento profiláctico con factores FVIII rico en vWF.

El caso P17 tiene la p.Val1279Ile junto la variante p.Gly1609Arg, esta sido reportada en varios individuos afectados con la EvW, tipos I, 2M, o 3. (Eikenboom et al., 1998; Elayaperumal et al., 2018; Veyradier et al., 2016). La valina en el codón 1279 es moderadamente conservada, y los análisis computacionales en distintos estudios con programas como SIFT y PolyPhen-2 predicen que esta variante es tolerada sin embargo, dada la falta de datos clínicos y funcionales su importancia clínica es incierta en este

momento. (Maas et al., 2022). El paciente presenta un fenotipo leve quien asiste a consulta derivado a hijo diagnosticado clínicamente con EvW.

Los pacientes P09, P11 y P12 tienen la variante p.Ile1425Phe esta variante ha sido reportada en múltiples individuos con enfermedad de von Willebrand tipo 2M en la literatura, está ubicada en el dominio A1 sitio de unión para el GPIIb α de las plaquetas, en los estudios funcionales reportados hasta el momento esta sustitución no genera mayor afectación en los procesos de multimerización y proteólisis de la proteína, sin embargo existe una disminución en la afinidad entre el vWF y las plaquetas. (Borràs et al., 2017; Meyer et al., 1997; Tischer et al., 2014). En estas muestras los pacientes P09 y P11 son hermanos, los dos con sangrado leve, inicialmente habían sido clasificados como tipo 2A, pero derivado a la variante encontrada y el patrón de multímeros presentes en cantidad reducida y normales respectivamente se puede reclasificar los dos pacientes como tipo 2M. El paciente P12 con esta variante p.Ile1425Phe tiene un cuadro clínico leve con sangrados nasales de difícil control, un patrón de multímeros normal y sin antecedentes familiares relacionados. El estudio más reciente donde esta variante fue reportada es en una cohorte de pacientes españoles en un único paciente de 15 años con un cuadro clínico similar al P12, en ese estudio se realizaron análisis de predicción con 5 programas diferentes (PolyPhen, Sift, TASTERprediction Mut Assesor y Provean Prediction) los 5 con predicciones de ser variante deletérea para el funcionamiento de la proteína.

El caso P10 tiene la variante p.Arg1334Trp reportada por primera vez en el año 2022 en una cohorte de 166 pacientes de la Republica Checa, los pacientes en quienes se detectó esta variante tenían un fenotipo leve que en un principio se determinó como EvW tipo 1, sin embargo debido al patrón de multímeros presentado y ubicación de la variante en el sitio de unión al GPIIb α se determinó como una variante para tipo 2M, de igual forma en los programas de predicción ha sido catalogada como patogénica. (Vangenechten et al., 2022). El paciente P10 tiene un cuadro clínico leve epistaxis a repetición., patrón de multímeros no evaluado.

El caso P19 tiene dos variantes p.Ile1628Thr y p.Ser1325Phe, la primera variante está ubicada en el dominio A2 y se ha descrito en al menos cuatro estudios en los que se encuentra en al menos 28 individuos con diferentes subtipos de EvW no se encuentra en el Proyecto de los 1000 genomas o ExaAC y en los estudios funcionales demostraron

que esta variante desestabiliza el estado de plegado de la proteína y disminuye su fuerza de tracción. (Fidalgo et al., 2016; Shen et al., 2016). Por otra parte La variante p.Ser1325Phe está ubicada en el dominio A1 y ha sido reportada para pacientes tipo 2M sus estudios funcionales han demostrado p.Ser1325 se encuentra en el sitio de unión del vWFA1 y el GPIb plaquetario, una sustitución en esta posición impide la formación del complejo con GPIb y la consecuente pérdida de unión del vWF al GPIB α . (Arbelaez et al., 2015; E. J. Favaloro, Bonar, et al., 2016). El paciente P19 tiene un cuadro clínico de sangrados leves con un patrón de multímeros normales concordante con el subtipo 2M y presenta una historia familiar de hijos, papa y tía materna con sangrados nasales sin diagnósticos.

El 45% de pacientes fueron clasificados con EvW Tipo 2M, 40% EvW tipo 2A, un 5% no tiene una clasificación clara esta 2A/2M derivado a falta de pruebas de laboratorio como los multímeros que nos permitirían hacer una correlación concisa (Ver Tablas 3 y 6). La EvW Tipo 2A es el subtipo con mayor frecuencia a nivel mundial del tipo 2, sin embargo varias estudios han demostrado que una variante puede estar relacionada con el subtipo 2A y con el subtipo 2M y que muchas veces derivado a la variabilidad clínica hay un subdiagnóstico de EvW tipo 2 M, que es superado si se tiene claridad en la correlación fenotipo-genotipo y los sitios de unión afectados, en este estudio la correlación de estas variantes con los resultados de las pruebas de laboratorio como el patrón de multímeros, nos permite hacer una correcta clasificación. (E. J. Favaloro, Bonar, et al., 2016; A. C. Goodeve, 2010)

No se encontraron variantes en dos pacientes (P08 y P20), con este acercamiento de análisis por puntos hotspot como el exón 28 es frecuente que en un bajo porcentaje no se detecten variantes relacionadas con el desarrollo de la enfermedad y según las recomendaciones del diagnóstico molecular el siguiente paso es analizar los otros exones funcionales. (L Baronciani et al., 2017). Se realizó secuenciación de 2 exones adicionales, el 18 y el 20 sin éxito en encontrar la variante causal, estos dos casos siguen en estudio con su clasificación inicial con base a los estudios de laboratorio. En comparación con la EvW tipo 1 y 3, la EvW 2 tipo en su diagnóstico molecular no necesita del estudio completo del gen VWF, es importante dar inicio con el análisis de los exones que codifican los dominios funcionales de la proteína siendo el hotspot principal el exón 28.(L Baronciani et al., 2017; Freitas et al., 2019)

La EvW subtipo 2N no se encontró en esta muestra sin embargo no se descarta en los dos pacientes en los que no se encontró variante principalmente en el P20 ya que muestra una disminución del FVIII (Tabla 3). El hot-spot para las variantes de este subtipo se encuentra en los exones 17 a 24 de los cuales solo dos fueron analizados en este estudio (Batlle et al., 2019; Seidizadeh et al., 2021)

En la muestra analizada se observa una variedad de manifestaciones clínicas que se presentan en distinto grado de severidad, los síntomas con mayor frecuencia fueron la epistaxis y sangrado menstrual (48% y 16% respectivamente). En un estudio en el año 2017 donde se caracterizó mediante pruebas de laboratorio 32 pacientes pediátricos con EvW de la ciudad de Bogotá se reportaron como síntomas con mayor frecuencia la epistaxis y gingivorragia (64% y 32%), de igual forma en este estudio el porcentaje de pacientes con EvW tipo 2 fue superior a los otros tipos de EvW. (Linares et al., 2017). Esta variabilidad clínica se debe a que la presentación de la EvW depende del grado de afectación que presente la proteína a nivel cuantitativo o cualitativo, sexo de cada paciente y condiciones fisiológicas propias que difieren entre individuos. (Connell et al., 2021; P. D. James & Goodeve, 2011).

Para la EvW tipo 2, la desmopresina tiene la capacidad de aumentar la liberación de niveles de vWF y FVIII en el torrente sanguíneo. Debido a la variabilidad en la capacidad de respuesta se ha recomendado evaluar individualmente antes de usarlo como un agente terapéutico. No obstante, en la bibliografía se han encontrado discrepancias en su uso para la EvW tipo 2 ya que las deficiencias son cualitativas. Sin embargo, se ha reportado eficacia de su uso en procedimientos menores. (Beltran et al., 2023; Rodríguez Pérez et al., 2012). Para el subtipo 2B no es recomendado ya que favorece a la trombocitopenia. (DiGiandomenico et al., 2021)

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

1. Se realizó por primera vez estudio molecular en Colombia en un grupo de pacientes con EvW tipo 2 de una cohorte de seguimiento, identificando en el 90 % de los pacientes la variante patogénica de la enfermedad, mediante la metodología implementada de amplificación y secuenciación directa del Exón 28 del gen VWF
2. Se logró clasificar y confirmar los subtipos de EvW tipo 2 de cada uno de los pacientes estudiados
3. La variabilidad en los resultados de laboratorio y manifestaciones clínicas en los distintos subtipos dificulta la clasificación, sin embargo, el análisis genético puede ser una ayuda adicional cuando se tiene dudas en el subtipo.
4. Existen variantes que han sido reportadas para subtipos 2A y 2M, por lo cual basarse en los resultados de las pruebas de laboratorio es de gran ayuda para discernir entre los dos subtipos
5. El Exón 28 es un hotspot para las variantes de la EvW tipo 2 sin embargo se debe proceder al análisis de otros exones que codifiquen dominios funcionales cuando no se encuentren variantes en este exón
6. Este análisis molecular permitió determinar la causa de EvW, brindar el asesoramiento genético adecuado a cada una de las familias y revisar el abordaje diagnóstico desde la secuenciación de Exones específicos

8.2 Recomendaciones

En los dos pacientes que no se encontró variantes en los exones 28, 18 y 20, se debe ampliar el estudio a los demás exones funcionales o en su defecto descartar otra entidad por el análisis de otros genes como el ADAMTS13 y el GP1BA.

Los subtipos 2A y 2M es importante tener en cuenta que una variante puede estar relacionada a los dos subtipos y que la correlación con los estudios de laboratorio y manifestaciones clínicas es imperativa para discernir entre subtipos

Analizar un mayor número de paciente con el fin de poder ampliar base de datos y lograr una obtención de frecuencias representativa a nivel de Colombia

Revisar el abordaje mediante Secuenciación Sanger de Exones individuales y su costo efectividad en el análisis de la EvW tipo 2 versus la Secuenciación de Nueva generación de todo el gen, ventajas y desventajas que estas dos tecnologías presentan frente a esta aproximación.

PRODUCTOS ACADÉMICOS

- Jornada de asesoramiento genético a familias con EvW en Clínica Infantil Colsubsidio (2 y 9 de Abril 2024).
- Presentación de Poster "Caracterización de variantes en el exón 28 del gen VWF y su correlación genotipo-fenotipo en una muestra de pacientes con enfermedad de Von Willebrand tipo 2" en el V Simposio Internacional de Genética Humana, 13 al 15 de Junio, 2024 Cali, COL. Poster número VSimp-038 .
- Sometimientto a publicación el artículo titulado 'Characterization of variants in exon 28 of the VWF gene and their genotype-phenotype correlation in a sample of patients with von Willebrand disease type 2 ' by Parada, Laura; Linares, Adriana; Casas Claudia; Yunis, Juan; Rodriguez, Andrea; Suarez, Claudia

BIBLIOGRAFÍA

- Arbelaez, A., Niemann, J., Freney, R., Othman, M., Emsley, J., Mohammed, S., & Favaloro, E. J. (2015). "Bleeding in the jungle". *American Journal of Hematology*, 90(9), 843–846. <https://doi.org/10.1002/ajh.24032>
- Atiq, F., Boender, J., van Heerde, W. L., Tellez Garcia, J. M., Schoormans, S. C., Krouwel, S., Crossen, M. H., Laros-van Gorkom, B. A. P., de Meris, J., Fijnvandraat, K., van der Bom, J. G., Meijer, K., van Galen, K. P. M., Eikenboom, J., & Leebeek, F. W. G. (2022). Importance of Genotyping in von Willebrand Disease to Elucidate Pathogenic Mechanisms and Variability in Phenotype. *HemaSphere*, 6(6), e718. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000718>
- Baronciani, L., Goodeve, A., & Peyvandi, F. (2017). Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia*, 23(2), 188–197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/hae.13175>
- Baronciani, Luciano, Federici, A. B., Cozzi, G., Canciani, M. T., & Mannucci, P. M. M. (2006). von Willebrand factor collagen binding assay in von Willebrand disease type 2A, 2B, and 2M. In *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* (Vol. 4, Issue 9, pp. 2088–2090). <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02069.x>
- Battle, J., Pérez-Rodríguez, A., Corrales, I., Borràs, N., Costa Pinto, J., López-Fernández, M. F., & Vidal, F. (2019). Update on Molecular Testing in von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost*, 45(7), 708–719. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679922>
- Bellissimo, D. B., Christopherson, P. A., Flood, V. H., Gill, J. C., Friedman, K. D., Haberichter, S. L., Shapiro, A. D., Abshire, T. C., Leissinger, C., Hoots, W. K., Lusher, J. M., Ragni, M. V., & Montgomery, R. R. (2012). VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood*, 119(9), 2135–2140. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384610>
- Beltran, A., Jaramillo, A. P., Vallejo, M. P., Acosta, L., Barberan Parraga, G. C., Guanín Cabrera, C. L., Gaibor, V. G., & Cueva, M. G. (2023). Desmopressin as a Treatment in Patients With Von Willebrand Disease: A Systematic Review. *Cureus*, 15(8), e44310. <https://doi.org/10.7759/cureus.44310>
- Berber, E., Pehlevan, F., Akin, M., Capan, O. Y., Kavakli, K., & Çaglayan, S. H. (2013). A common VWF exon 28 haplotype in the Turkish population. *Clinical and Applied*

- Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 19(5), 550–556.
<https://doi.org/10.1177/1076029612441054>
- Biousse, V. (2003). The coagulation system. *J Neuroophthalmol*, 23(1), 50–62.
<https://doi.org/10.1097/00041327-200303000-00011>
- Borràs, N., Batlle, J., Pérez-Rodríguez, A., López-Fernández, M. F., Rodríguez-Trillo, Á., Lourés, E., Cid, A. R., Bonanad, S., Cabrera, N., Moret, A., Parra, R., Mingot-Castellano, M. E., Balda, I., Altisent, C., Pérez-Montes, R., Fisac, R. M., Iruín, G., Herrero, S., Soto, I., ...Corrales, I. (2017). Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): comprehensive genetic analysis by next-generation sequencing of 480 patients. *Haematologica*, 102(12), 2005–2014.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2017.168765>
- Bowman, M. L., & James, P. D. (2017). Bleeding Scores for the Diagnosis of von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost*, 43(05), 530–539.
- Casaña, P., Martínez, F., Haya, S., Tavares, A., & Aznar, J. A. (2001). New mutations in exon 28 of the von Willebrand factor gene detected in patients with different types of von Willebrand's disease. *Haematologica*, 86(4), 414–419.
- Casonato, A., Galletta, E., Sarolo, L., & Daidone, V. (2018). Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia*, 24(1), 134–140.
<https://doi.org/10.1111/hae.13366>
- Castaman, G., & James, P. D. (2019). Pregnancy and delivery in women with von Willebrand disease. *Eur J Haematol*, 103(2), 73–79. <https://doi.org/10.1111/ejh.13250>
- Castaman, Giancarlo, & Linari, S. (2017). Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease and Rare Bleeding Disorders. *Journal of Clinical Medicine*, 6(4).
<https://doi.org/10.3390/jcm6040045>
- Castaman, Giancarlo, & Linari, S. (2021). Obstacles to Early Diagnosis and Treatment of Inherited von Willebrand Disease: Current Perspectives. *Journal of Blood Medicine*, 12, 165–175. <https://doi.org/10.2147/jbm.s232758>
- Chee, Y. L. (2014). Coagulation. *J R Coll Physicians Edinb*, 44(1), 42–45.
<https://doi.org/10.4997/jrcpe.2014.110>
- Choi, S. J., Lee, E.-Y., Kim, H.-J., Lee, K.-A., Song, J., Choi, J.-R., & Yoo, J.-H. (2012). A Gly1609Arg missense mutation in the vWF gene in a Korean patient with von Willebrand disease type 2A. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 42(1), 98–102.
- Collins, C. J., Underdahl, J. P., Levene, R. B., Ravera, C. P., Morin, M. J., Dombalagian, M.

- J., Ricca, G., Livingston, D. M., & Lynch, D. C. (1987). Molecular cloning of the human gene for von Willebrand factor and identification of the transcription initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(13), 4393–4397.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4393>
- Colonne, C. K., Reardon, B., Curnow, J., & Favaloro, E. J. (2021). Why is Misdiagnosis of von Willebrand Disease Still Prevalent and How Can We Overcome It? A Focus on Clinical Considerations and Recommendations. *Journal of Blood Medicine*, *12*, 755–768. <https://doi.org/10.2147/JBM.S266791>
- Connell, N. T., Flood, V. H., Brignardello-Petersen, R., Abdul-Kadir, R., Arapshian, A., Couper, S., Grow, J. M., Kouides, P., Laffan, M., Lavin, M., Leebeek, F. W. G., O'Brien, S. H., Ozelo, M. C., Tosetto, A., Weyand, A. C., James, P. D., Kalot, M. A., Husainat, N., & Mustafa, R. A. (2021). ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. *Blood Adv*, *5*(1), 301–325.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003264>
- Cuenta de Alto Costo - Fondo Colombiano de Cuentas de Alto Costo. (2022). *Situación de la hemofilia y otras coagulopatías en Colombia 2022*. Situación de la hemofilia y otras coagulopatías en Colombia 2022. https://cuentadealtocosto.org/wp-content/uploads/2023/05/FINAL_LIBRO_HEMOFILIA_2022.pdf
- Culpan, D., Standen, G., Wood, N., Mazurier, C., Gaucher, C., & Bidwell, J. (1997). Rapid mutation screening in type 2A von Willebrand's disease using universal heteroduplex generators. *British Journal of Haematology*, *96*(3), 464–469.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.d01-2054.x>
- DiGiandomenico, S., Christopherson, P. A., Haberichter, S. L., Abshire, T. C., Montgomery, R. R., & Flood, V. H. (2021). Laboratory variability in the diagnosis of type 2 VWD variants. *J Thromb Haemost*, *19*(1), 131–138. <https://doi.org/10.1111/jth.15129>
- Eikenboom, J. C. (2001). Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol*, *14*(2), 365–379. <https://doi.org/10.1053/beha.2001.0139>
- Eikenboom, J. C., Castaman, G., Vos, H. L., Bertina, R. M., & Rodeghiero, F. (1998). Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. *Thrombosis and Haemostasis*, *79*(4), 709–717.
- Elayaperumal, S., Fouzia, N. A., Biswas, A., Nair, S. C., Viswabandya, A., George, B., Abraham, A., Oldenburg, J., Edison, E. S., & Srivastava, A. (2018). Type-3 von Willebrand disease in India-Clinical spectrum and molecular profile. *Haemophilia* :

- The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 24(6), 930–940.
<https://doi.org/10.1111/hae.13542>
- Favaloro, E. J. (2014). Diagnosing von Willebrand disease: a short history of laboratory milestones and innovations, plus current status, challenges, and solutions. *Semin Thromb Hemost*, 40(5), 551–570. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383546>
- Favaloro, E. J., Bonar, R. A., Mohammed, S., Arbelaez, A., Niemann, J., Freney, R., Meiring, M., Sioufi, J., & Marsden, K. (2016). Type 2M von Willebrand disease - more often misidentified than correctly identified. *Haemophilia : The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 22(3), e145-55. <https://doi.org/10.1111/hae.12903>
- Favaloro, E. J., Pasalic, L., & Curnow, J. (2016). Type 2M and Type 2A von Willebrand Disease: Similar but Different. *Semin Thromb Hemost*, 42(5), 483–497.
<https://doi.org/10.1055/s-0036-1579641>
- Favaloro, E., & Pasalic, L. (2022). Laboratory Diagnosis of von Willebrand Disease (VWD): Geographical Perspectives. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 48(6), 750–766. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1754331>
- Fidalgo, T., Salvado, R., Corrales, I., Pinto, S. C., Borràs, N., Oliveira, A., Martinho, P., Ferreira, G., Almeida, H., Oliveira, C., Marques, D., Gonçalves, E., Diniz, Mj., Antunes, M., Tavares, A., Caetano, G., Kjölleström, P., Maia, R., Sevivas, T. S., ... Ribeiro, L. (2016). Genotype-phenotype correlation in a cohort of Portuguese patients comprising the entire spectrum of VWD types: impact of NGS. *Thrombosis and Haemostasis*, 116(1), 17–31. <https://doi.org/10.1160/TH15-07-0604>
- Freitas, S. D. S., Rezende, S. M., de Oliveira, L. C., Prezotti, A. N. L., Renni, M. S., Corsini, C. A., Amorim, M. V. A., Matosinho, C. G. R., Carvalho, M. R. S., & Chaves, D. G. (2019). Genetic variants of VWF gene in type 2 von Willebrand disease. *Haemophilia*, 25(2), e78–e85. <https://doi.org/10.1111/hae.13714>
- Fressinaud, E., Mazurier, C., & Meyer, D. (2002). Molecular genetics of type 2 von Willebrand disease. *Int J Hematol*, 75(1), 9–18. <https://doi.org/10.1007/bf02981973>
- Gadisseur, A., van der Planken, M., Schroyens, W., Berneman, Z., & Michiels, J. J. (2009). Dominant von Willebrand disease type 2M and 2U are variable expressions of one distinct disease entity caused by loss-of-function mutations in the A1 domain of the von Willebrand factor gene. *Acta Haematologica*, 121(2–3), 145–153.
<https://doi.org/10.1159/000214855>
- Gastaldi, G., Rasore-Quartino, A., Galletti, A., Campanella, A., Barone, E., & Mannucci, P. M. (1978). Coexistence of haemophilia A and von Willebrand's disease in the same

- kindred. *Scandinavian Journal of Haematology*, 20(5), 423–428.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1978.tb02478.x>
- Goodeve, A. C. (2010). The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev*, 24(3), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.003>
- Goodeve, A., & James, P. D. (2009). von Willebrand Disease. *GeneReviews*.
- Goodeve, Anne. (2016). Diagnosing von Willebrand disease: genetic analysis. *Hematology*, 2016(1), 678–682. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.678> %J Hematology
- Haberichter, S. L., Fahs, S. A., & Montgomery, R. R. (2000). von Willebrand factor storage and multimerization: 2 independent intracellular processes. *Blood*, 96(5), 1808–1815.
- Hassan, M. I., Saxena, A., & Ahmad, F. (2012). Structure and function of von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 23(1), 11–22.
<https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834cb35d>
- Hassenpflug, W. A., Budde, U., Obser, T., Angerhaus, D., Drewke, E., Schneppenheim, S., & Schneppenheim, R. (2006). Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis. *Blood*, 107(6), 2339–2345.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1758>
- Hernández-Zamora, E., Zavala-Hernández, C., Quintana-González, S., & Reyes-Maldonado, E. (2015). Enfermedad de von Willebrand, biología molecular y diagnóstico. *Cirugía y Cirujanos*, 83(3), 255–264.
<https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.010>
- Itzhar-Baikian, N., Boisseau, P., Joly, B., & Veyradier, A. (2019). Updated overview on von Willebrand disease: focus on the interest of genotyping. *Expert Rev Hematol*, 12(12), 1023–1036. <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1670638>
- Jacobi, P. M., Gill, J. C., Flood, V. H., Jakab, D. A., Friedman, K. D., & Haberichter, S. L. (2012). Intersection of mechanisms of type 2A VWD through defects in VWF multimerization, secretion, ADAMTS-13 susceptibility, and regulated storage. *Blood*, 119(19), 4543–4553. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-360875>
- James, P., Connell, N. T., Ameer, B., Di Paola, J., Eikenboom, J., Giraud, N., Haberichter, S., Jacobs-Pratt, V., Konkle, B., McLintock, C., McRae, S., R Montgomery, R., O'Donnell, J. S., Scappe, N., Sidonio, R., Flood, V. H., Husainat, N., Kalot, M. A., & Mustafa, R. A. (2021). ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Advances*, 5(1), 280–300.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003265>
- James, P. D., & Goodeve, A. C. (2011). von Willebrand disease. *Genet Med*, 13(5), 365–

376. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182035931>
- Kasatkar, P., Shetty, S., & Ghosh, K. (2014). Genetic heterogeneity in a large cohort of Indian type 3 von Willebrand disease patients. *PLoS One*, *9*(3), e92575–e92575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092575>
- Kavakli, K., BALKAN, C., AKIN, M., KARAPINAR, D. Y., & AY, Y. (2011). Co-existing mild haemophilia A with mild type 1 von willebrand disease: Case report. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, *21*(2), 111–114. <http://search.yayin/detay/124684>
- Laffan, M., Sathar, J., & Johnsen, J. M. (2021). *von Willebrand disease: Diagnosis and treatment, treatment of women, and genomic approach to diagnosis*. *27*(S3), 66–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/hae.14050>
- Lavin, M., & O'Donnell, J. S. (2019). How I treat low von Willebrand factor levels. *Blood*, *133*(8), 795–804. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-844936>
- Lenting, P. J., Christophe, O. D., & Denis, C. V. (2015). von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, *125*(13), 2019–2028. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406>
- Liang, Q., Qin, H., Ding, Q., Xie, X., Wu, R., Wang, H., Hu, Y., & Wang, X. (2017). Molecular and clinical profile of VWD in a large cohort of Chinese population: application of next generation sequencing and CNVplex(®) technique. *Thromb Haemost*, *117*(8), 1534–1548. <https://doi.org/10.1160/th16-10-0794>
- Linares, A., Castaño, S., Sarmiento, I. C., Cortés, J. M., Beltrán, E., Cabrera, E., & Ortiz, F. (2017). Caracterización de pacientes pediátricos con enfermedad de Von Willebrand en un centro de referencia en Bogotá (Colombia). *Revista Colombiana de Hematología y Oncología*, *4*(2), 45. <https://doi.org/10.51643/22562915.248>
- Maas, D. P. M. S. M., Atiq, F., Blijlevens, N. M. A., Brons, P. P. T., Krouwel, S., Laros-van Gorkom, B. A. P., Leebeek, F. W. G., Nieuwenhuizen, L., Schoormans, S. C. M., Simons, A., Meijer, D., van Heerde, W. L., & Schols, S. E. M. (2022). Von Willebrand disease type 2M: Correlation between genotype and phenotype. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *20*(2), 316–327. <https://doi.org/10.1111/jth.15586>
- Mancuso, D. J., Tuley, E. A., Westfield, L. A., Worrall, N. K., Shelton-Inloes, B. B., Sorace, J. M., Alevy, Y. G., & Sadler, J. E. (1989). Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem*, *264*(33), 19514–19527.
- Mazurier, C., & Meyer, D. (1996). 2 Molecular basis of von Willebrand disease. *Baillière's Clinical Haematology*, *9*(2), 229–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950->

3536(96)80060-6

- McGinn, S., & Gut, I. G. (2013). DNA sequencing - spanning the generations. *N Biotechnol*, 30(4), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.012>
- Meyer, D., Fressinaud, E., Gaucher, C., Lavergne, J. M., Hilbert, L., Ribba, A. S., Jorieux, S., & Mazurier, C. (1997). Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(1), 451–456.
- Mezzano, D., & Quiroga, T. (2019). Diagnostic challenges of inherited mild bleeding disorders: a bait for poorly explored clinical and basic research. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 17(2), 257–270. <https://doi.org/10.1111/jth.14363>
- Monteiro, M., Almeida, L., Morais, M., & Dias, L. (2021). Bernard Soulier syndrome: a rare, frequently misdiagnosed and poorly managed bleeding disorder. *BMJ Case Reports*, 14(8). <https://doi.org/10.1136/bcr-2021-243518>
- Nichols, W. L., Hultin, M. B., James, A. H., Manco-Jhonson, M., Montgomery, R., Ortel, T., Rick, M., Sadler, J. E., Weinstein, M., & P.Yawn, B. (2007). *The Diagnosis, Evaluation and Management of von Willebrand Disease* (NIH Publication ; No. 08-5832). National Heart, Lung, and Blood Institute.
- Nilsson, I. M. (1999). The history of von Willebrand disease. *Haemophilia*, 5(s2), 7–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1999.0050s2007.x>
- Nyman, D., Eriksson, A. W., Blombäck, M., Frants, R. R., & Wahlberg, P. (1981). Recent investigations of the first bleeder family in Åland (Finland) described by von Willebrand. *Thromb Haemost*, 45(1), 73–76.
- O'Brien, S. H., Ritchey, A. K., & Ragni, M. V. (2007). Combined clotting factor deficiencies: experience at a single hemophilia treatment center. *Haemophilia : The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 13(1), 26–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01389.x>
- O'Sullivan, J. M., Ward, S., Lavin, M., & O'Donnell, J. S. (2018). von Willebrand factor clearance - biological mechanisms and clinical significance. *Br J Haematol*, 183(2), 185–195. <https://doi.org/10.1111/bjh.15565>
- Palta, S., Saroa, R., & Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*, 58(5), 515–523. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>
- Pérez-Gómez, F., & Bover, R. (2007). La nueva cascada de la coagulación y su posible

- influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Revista Española de Cardiología*, 60(12), 1217–1219. <https://doi.org/10.1157/13113924>
- Pruss, C. M., Golder, M., Bryant, A., Hegadorn, C., Haberichter, S., & Lillicrap, D. (2012). Use of a mouse model to elucidate the phenotypic effects of the von Willebrand factor cleavage mutants, Y1605A/M1606A and R1597W. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 10(5), 940–950. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04675.x>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Rodríguez Pérez, L., Castillo González, D., Pérez Sesma, N., & Zamora González, Y. (2012). Respuesta a la desmopresina en pacientes con enfermedad de von Willebrand. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia; Vol. 29, No. 1 (2013): Enero - Marzo*. <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/24/27>
- Ruggeri, Z. M., & Zimmerman, T. S. (1987). von Willebrand Factor and von Willebrand Disease. *Blood*, 70(4), 895–904. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V70.4.895.895>
- Sadler, J E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, 67, 395–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>
- Sadler, J E. (2003). Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood*, 101(6), 2089–2093. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2892>
- Sadler, J E, Budde, U., Eikenboom, J. C., Favaloro, E. J., Hill, F. G., Holmberg, L., Ingerslev, J., Lee, C. A., Lillicrap, D., Mannucci, P. M., Mazurier, C., Meyer, D., Nichols, W. L., Nishino, M., Peake, I. R., Rodeghiero, F., Schneppenheim, R., Ruggeri, Z. M., Srivastava, A., ... Federici, A. B. (2006). Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost*, 4(10), 2103–2114. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x>
- Sadler, J Evan. (2004). New Concepts in Von Willebrand Disease. *Annual Review of*

- Medicine*, 56(1), 173–191. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.082103.104713>
- Seidizadeh, O., Baronciani, L., Pagliari, M. T., Cozzi, G., Colpani, P., Cairo, A., Siboni, S. M., Biguzzi, E., & Peyvandi, F. (2022). Phenotypic and genetic characterizations of the Milan cohort of von Willebrand disease type 2. *Blood Advances*, 6(13), 4031–4040. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007216>
- Seidizadeh, O., Peyvandi, F., & Mannucci, P. M. (2021). Von Willebrand disease type 2N: An update. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 19(4), 909–916. <https://doi.org/10.1111/jth.15247>
- Sharma, R., & Haberichter, S. L. (2019). New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2019(1), 596–600. <https://doi.org/10.1182/hematology.2019000064>
- Sheffield, T. U. of. (n.d.). *von Willebrand factor Variant Database (VWFdb)* (Vol. 2021). <https://dbs.eahad.org/>. <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>
- Shen, M.-C., Chen, M., Ma, G.-C., Chang, S.-P., Lin, C.-Y., Lin, B.-D., & Hsieh, H.-N. (2016). De novo mutation and somatic mosaicism of gene mutation in type 2A, 2B and 2M VWD. *Thrombosis Journal*, 14(Suppl 1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12959-016-0092-2>
- Sladič, M., Verdenik, I., & Smrkolj, Š. (2022). The Effect of Von Willebrand Disease on Pregnancy, Delivery, and Postpartum Period: A Retrospective Observational Study. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(6). <https://doi.org/10.3390/medicina58060774>
- Solano-Trujillo, M. H., Casas-Patarroyo, C. P., Espinosa-Redondo, D. L., Abello-Polo, V., Parra, L., & Palacios, A. (2020). Respuesta a la prueba de desmopresina: estudio de cohorte en un hospital de Bogotá. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia; Vol. 36, No. 2 (2020): ABRIL - JUNIO*. <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1085/931>
- Starke, R. D., Paschalaki, K. E., Dyer, C. E. F., Harrison-Lavoie, K. J., Cutler, J. A., McKinnon, T. A. J., Millar, C. M., Cutler, D. F., Laffan, M. A., & Randi, A. M. (2013). Cellular and molecular basis of von Willebrand disease: studies on blood outgrowth endothelial cells. *Blood*, 121(14), 2773–2784. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435727>
- Stufano, F., Baronciani, L., & Peyvandi, F. (2017). Diagnosis of von Willebrand Disease: Phenotypic Characterization. *WFH ELearning Platform*. <https://elearning.wfh.org/resource/diagnosis-von-willebrand-disease-phenotypic-characterization/>

- Tischer, A., Madde, P., Moon-Tasson, L., & Auton, M. (2014). Misfolding of vWF to pathologically disordered conformations impacts the severity of von Willebrand disease. *Biophysical Journal*, *107*(5), 1185–1195. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.026>
- Vangenechten, I., Smejkal, P., Zapletal, O., Michiels, J. J., Berneman, Z., Zavrelova, J., Blatný, J., Penka, M., & Gadisseur, A. (2019). Analysis of von Willebrand Disease in the South Moravian Population (Czech Republic): Results from the BRNO-VWD Study. *Thrombosis and Haemostasis*, *119*(4), 594–605. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678528>
- Vangenechten, I., Smejkal, P., Zavrelova, J., Zapletal, O., Wild, A., Michiels, J. J., Berneman, Z., Blatny, J., Batorova, A., Prigancova, T., Penka, M., & Gadisseur, A. (2022). Analysis of von Willebrand Disease in the “Heart of Europe”. *TH Open : Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*, *6*(4), e335–e346. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1757635>
- Veyradier, A., Boisseau, P., Fressinaud, E., Caron, C., Ternisien, C., Giraud, M., Zawadzki, C., Trossaert, M., Itzhar-Baikian, N., Dreyfus, M., d’Oiron, R., Borel-Derlon, A., Susen, S., Bezieau, S., Denis, C. V., & Goudemand, J. (2016). A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture. *Medicine*, *95*(11), e3038. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003038>
- Woods, Adriana I, Kempfer, A. C., Paiva, J., Blanco, A. N., Sánchez-Luceros, A., & Lazzari, M. A. (2017). Diagnosis of von Willebrand disease in Argentina: a single institution experience. *Annals of Blood; Vol 2, No 9 (December 2017): Annals of Blood*. <https://aob.amegroups.org/article/view/4207>
- Woods, Adriana Inés, Blanco, A. N., Kempfer, A. C., Paiva, J., Bermejo, E. I., Sánchez Luceros, A., & Lazzari, M. A. (2016). Factor von Willebrand y Enfermedad de von Willebrand: nuevos enfoques diagnósticos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *50*(2), 273–289. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53549261012>
- World Federation of Hemophilia. (2023). *World Federation of Hemophilia Report on the Annual Global Survey 2023*. <https://elearning.wfh.org/resource/report-on-the-annual-global-survey-2022/#information>
- Xu, A. J., & Springer, T. A. (2013). Mechanisms by which von Willebrand disease mutations destabilize the A2 domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(9), 6317–6324. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422618>

- Yunis, L. K., Linares, A., Cabrera, E., & Yunis, J. J. (2018). Systematic molecular analysis of hemophilia A patients from Colombia. *Genetics and Molecular Biology*, 41(4), 750–757. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0072>
- Zarante Montoya, I. M., Madariaga Perpiñán, I., Sierra Bretón, M. M., Rumbo Romero, J. A., Salazar Reviakina, A., & Tovar Sánchez, C. V. (2020). ¿Qué avances recientes hay en el entendimiento, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Von Willebrand?: una revisión de la literatura. *Universitas Médica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.vonw>
- Zhou, Y. F., Eng, E. T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., & Springer, T. A. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*, 120(2), 449–458. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405134>