



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA,  
ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

**“Análisis molecular del exón 28 del gen *VWF* en pacientes con Enfermedad  
de von Willebrand”**

TESIS

Que para obtener el título de:

ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

Presenta:

Dante Carlos Pineda Cisneros

Asesora: Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Trabajo realizado en:

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana  
Centro Médico Nacional SXXI, IMSS

México D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**Director General de Administración Escolar**  
**Presente.**

Me es grato informarle que el alumno **PINEDA CISNEROS DANTE CARLOS** con número de cuenta **90210536** presentará próximamente su examen para obtener el grado de Especialización en Bioquímica Clínica (Clave 3060) con la tesina **"Análisis molecular del gen vWF en pacientes con enfermedad de von Willebrand"** ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez.
Vocal:	Dr. Diego Julio Arenas Aranda.
Secretario:	Dr. Rodolfo Pastelín Palacios.
Primer Suplente:	Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa.
Segundo Suplente:	Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria D.F. 03 de Julio de 2014.

**Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta**  
**COORDINADORA DE LA ESPECIALIZACIÓN**  
**EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

C.c.p.- C.P. AGUSTÍN MERCADO; Subdirector de Certificación y Control Documental  
C.c.p.- Integrantes del Jurado  
C.c.p.- Departamento de Control Escolar  
C.c.p.- Interesado

Especialización en Bioquímica Clínica Facultad de Química, Edificio A Laboratorio 1C, UNAM.  
Tel/Fax: 5622-3737, e-mail [ebc@posgrado.unam.mx](mailto:ebc@posgrado.unam.mx), [menjivar@unam.mx](mailto:menjivar@unam.mx) 56223822

## **AGRADECIMIENTOS**

A la gracia y voluntad de Dios.

A mis padres que me apoyan en todo momento.

A mi esposa Beatriz, por su incondicional apoyo.

A Natalie y Carlos, mis hijos, por su gran comprensión.

A mi hermana Marisol, por sus palabras de aliento.

Al Dr. Fabio Salamanca y Dr. Diego Arenas de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional Siglo XXI, por haberme permitido realizar el presente trabajo.

A esa gran persona que he tenido el honor de su asesoramiento, mi tutora, la Dra. Peñaloza.

A la Facultad de Química de la UNAM por formarme profesionalmente.

## ÍNDICE

	Pág
<b>1. RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
2.1 GENERALIDADES DE LA HEMOSTASIA	6
2.2 ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND	9
2.2.1 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD	9
2.2.1.1 EVW Tipo 1	10
2.2.1.2 EVW Tipo 2	11
2.2.1.3 EVW Tipo 3	12
2.2.2 BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND	13
2.2.2.1 EL GEN <i>VWF</i>	13
2.2.2.2 Pseudogen	14
2.2.2.3 Mutaciones	15
2.2.2.4 Polimorfismos	16
2.2.3 PROTEÍNA FACTOR DE VON WILLEBRAND	16
2.2.3.1 Biosíntesis	18
2.2.3.2 Almacenamiento y secreción	20
2.2.3.3 Funciones	22
2.2.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	25
2.2.4.1 Pruebas de laboratorio para el diagnóstico para EVW	26
2.2.4.2 Relación del FVW con el sistema ABO	28
2.2.5 TRATAMIENTO DE PACIENTES CON EVW	29
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS</b>	<b>30</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>6. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>30</b>
6.1 Pacientes	30
6.2 Extracción de DNA	31
6.2.1 Cuantificación de DNA	32
6.3 Primers elegidos para análisis del exón 28	32
6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
6.5 Electroforesis en gel de agarosa	34
6.6 Purificación de amplificadores de PCR	34
6.7 Marcaje de muestras para secuenciación	34
6.8 Purificación de marcaje	35
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>9. LITERATURA CITADA</b>	<b>40</b>
<b>10. APÉNDICES.</b>	
10.1 Material utilizado	47
10.2 Equipos empleados	48
10.3 Reactivos	49
10.4 Preparación de soluciones	50

## 1. RESUMEN

La enfermedad de von Willebrand (EVW) tiene una prevalencia del 1% en la población mundial y es debida a alteraciones cuali o cuantitativas en la proteína VWF. El factor de von Willebrand (VWF) es una glicoproteína multimérica que se sintetiza en megacariocitos y células endoteliales, juega un papel importante en la hemostasia al mediar la adhesión de plaquetas a los sitios de daño vascular, facilita la agregación plaquetaria y transporta al FVIII en el torrente sanguíneo protegiéndolo de la proteólisis prolongando su tiempo de vida.

El diagnóstico de esta enfermedad es difícil y frecuentemente los casos leves pueden pasar desapercibidos. Las pruebas de laboratorio y el estudio familiar de hemorragias son fundamentales para establecer un diagnóstico, sin embargo, estos estudios no proporcionan un diagnóstico exacto, por lo que en la actualidad se ha comenzado a recurrir al estudio molecular.

El gen que codifica esta proteína es conocido como *VWF* se localiza en el cromosoma 12 (12p13.3), está compuesto de 178 Kilobases (Kb) de DNA y comprende 52 exones siendo el 28 el más grande de ellos con 1380 pb que codifican para 460 aminoácidos e implica a los dominios A1, A2 que son sitios de unión a glicoproteína (Gp) y A3 que es sitio de unión a colágeno.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el exón 28 del gen *VWF*, debido a que es el exón más grande y al que presenta alteraciones con mayor frecuencia, en 19 pacientes mexicanos diagnosticados con EVW canalizados a través del Departamento de Hematología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

Se observaron cuatro mutaciones y cuatro polimorfismos, todos previamente informados de acuerdo a la base de datos Internacional ([www.shef.ac.uk/vwf/](http://www.shef.ac.uk/vwf/)). De esta manera se pudo dar diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand a 15 de los 19 pacientes (78.9%), además de poder clasificarlos correctamente.

En conclusión es importante realizar el análisis molecular para dar un mejor diagnóstico que repercuta en el tratamiento y en el asesoramiento genético.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DE LA HEMOSTASIA.

La hemostasia es un conjunto de mecanismos fisiológicos cuya finalidad es el cese de la hemorragia. En la actualidad se reconoce la importancia que tienen las moléculas de la superficie celular de plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y monocitos en dicho proceso, entre las que se encuentra el factor de von Willebrand (VWF, por sus siglas en inglés). Las estructuras celulares tienen dos papeles básicos en la hemostasia normal: proporcionar los factores de la coagulación que no estén presentes en el plasma normal; y proporcionar una superficie para el ensamblaje del complejo enzima/cofactor y su interacción con los sustratos para formar el coágulo de fibrina (Quintana y Martínez, 2008; James y Goodeve, 2011). Para fines prácticos, la hemostasia se divide en 3 fases:

- **Hemostasia primaria.** Es la respuesta de los vasos sanguíneos a una lesión, y la interacción con las plaquetas (agregación plaquetaria y formación del tapón plaquetario).
- **Hemostasia secundaria.** Proceso de los factores de coagulación y la interacción con los procesos celulares, es decir, la deposición de fibrina insoluble formada por la “cascada de la coagulación”.
- **Fibrinólisis.** Proceso de degradación del tapón plaquetario o coágulo tras la remodelación/reparación del tejido vascular.

Durante el proceso de coagulación se realizan una serie de eventos tanto moleculares como celulares que en la actualidad, son englobados en la teoría celular de la coagulación, para producir un coágulo de fibrina y sellar el sitio de lesión o el vaso sanguíneo. Esta teoría establece que el proceso hemostático se realiza por etapas que se explican a continuación brevemente (Figura 1):

- Cuando se daña un vaso sanguíneo, el colágeno, queda expuesto, provocando la adhesión de las plaquetas en el sitio de lesión, además VWF, que sirve como un puente para que las plaquetas se adhieran al sitio de lesión por receptores denominados glicoproteínas (GP). Esta unión forma el complejo receptor GP-Ib-Factor IX-Factor V. Con la formación de este enlace complejo, las plaquetas inician una serie de eventos internos con la finalidad de activarse. Las plaquetas estimuladas liberan el contenido de sus gránulos y ayudan a generar trombina en su superficie con ello, las plaquetas se agregan y forman un tapón hemostático (primario).

- **Fase de iniciación.** Adyacente al sitio de lesión, queda expuesto el factor tisular (FT) unido a las células y se une con el factor VII plasmático (FVII). Este complejo activado (FVIIa-FT) activa a su vez al factor IX (FIX -> FIXa), que convierte el zimógeno del factor X (FX) a su estado activo (FXa). Además, FIXa activa a plaquetas, mientras FXa interacciona con su cofactor FVa proveniente de gránulos  $\alpha$  de plaquetas y forma un complejo protrombinasa suficiente para generar una muy pequeña cantidad de trombina (FIIa), a partir de protrombina (FII).
- **Fase de amplificación.** La generación de FIIa provoca la activación de plaquetas mediante receptores activados por proteasas (PAR's del inglés *Protease Activated Receptors*) 1 y 4, la generación de más FVa, la disociación, activación y adhesión a plaquetas del factor VIII (FVIII) del complejo FVIII-VWF (VFIII -> FVIIIa), activación y adhesión a plaquetas del factor XI (FXI -> FXIa), que puede ser un potenciador o amplificador para generar FIIa.
- **Fase de propagación.** La producción de grandes cantidades de FIIa es responsable de la transformación del fibrinógeno a fibrina y la activación del factor XIII (FXIII -> FXIIIa) cuya finalidad es proporcionar estabilidad a la fibrina. El factor XII liberado de los gránulos de las plaquetas y activado por FIIa, le confiere estabilidad al coágulo de fibrina. Las plaquetas activadas expresan glicoproteínas (GPIIb/IIIa) y adhieren los polímeros de fibrina a su superficie; por otra parte, secretan sustancias como tromboxano A2 y Adenosina difosfato (TxA2 y ADP, respectivamente) que fortalecen la estabilidad de la fibrina y estimula la agregación plaquetaria.
- **Fibrinolisis.** Una vez formado el coagulo, la degradación de la fibrina (fibrinólisis) se lleva a cabo mediante la plasmina. El FIIa y la oclusión vascular inducen al endotelio a producir el activador tisular de la plasmina (t-PA). Otro activador es inducido por los factores de contacto precalicreina (PK), el cininógeno de alto peso molecular (HMWZ) y XII, denominado activador del plasminógeno de tipo urocinasa (u-PA). cuando estos activadores superan los mecanismos inhibidores de activación del plasminógeno, se activa la plasmina y degrada la fibrina produciendo residuos como dímero D.

Concretamente, el equilibrio dinámico entre los diferentes sistemas que componen la hemostasia permite que la sangre se mantenga fluida dentro de los vasos. En caso de existir una lesión en el endotelio vascular, se genera la activación de la hemostasia con la consiguiente obturación de la lesión; sin embargo, en condiciones patológicas donde exista



la deficiencia de alguna proteína que participa en la hemostasia su traducción clínica puede ser hemorragia como en el caso de la Enfermedad de von Willebrand (EVW), cuya característica primordial es un defecto en la molécula del factor de von Willebrand que altera la interacción con las glicoproteínas plaquetarias.

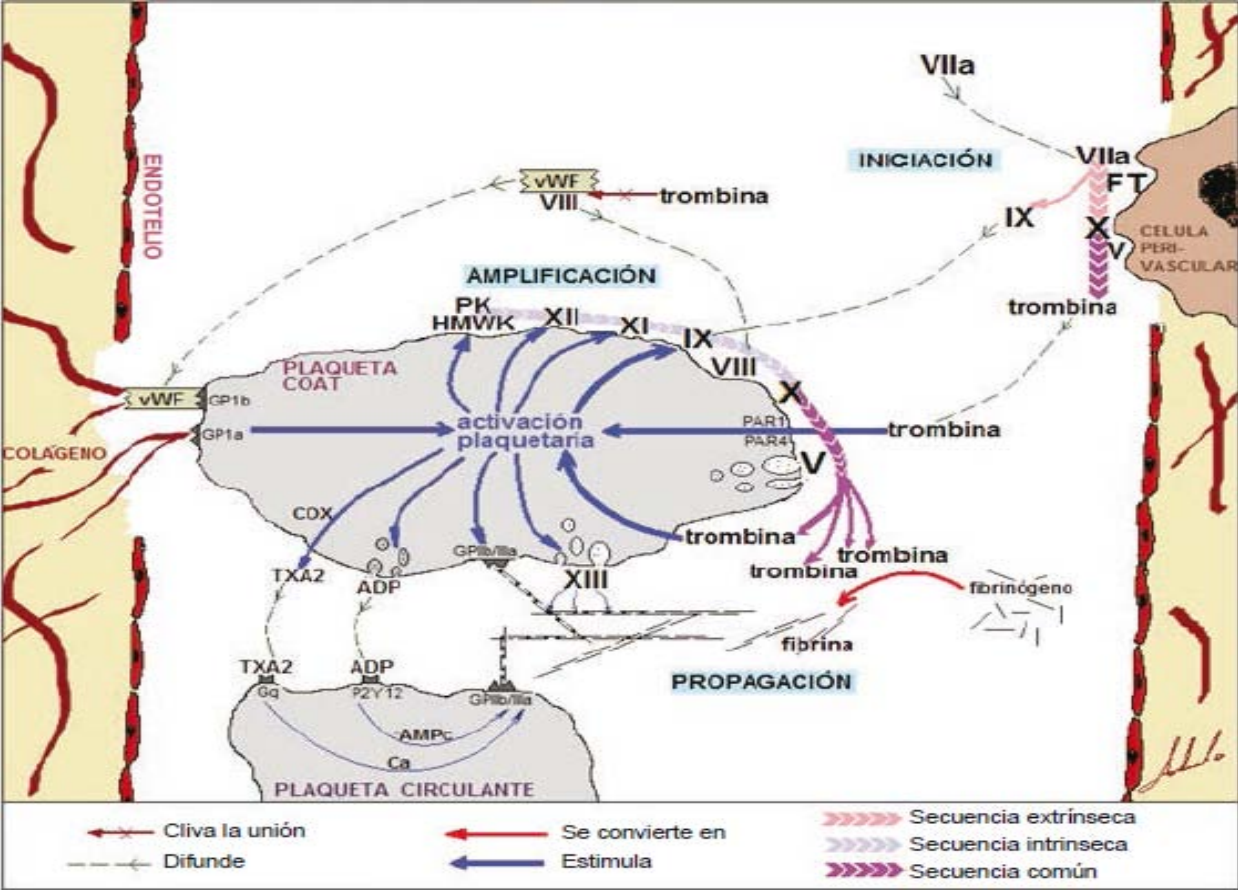


Figura 1. Fisiología molecular y celular de la coagulación. (Tomado de Alvarado, 2013.)

## 2.2 ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND (EVW).

La EVW fue descrita por el Dr. Erick von Willebrand en el año de 1926 en pacientes de Finlandia. Es una alteración hemorrágica causada por defectos en la cantidad o calidad de la proteína VWF, por lo que ocasiona sangrados muco-cutáneos de intensidad variable que van de leves a graves, con mayor propensión a los moretones, hemorragias posteriores a intervenciones dentales o quirúrgicas y en mujeres suele presentarse menorragia o hemorragias posparto, entre otros. (James y Goodeve, 2011).

Es la enfermedad más común de las alteraciones hemorrágicas con herencia autosómica dominante o recesiva. La EVW tiene una frecuencia del 1% en población general y no muestra preferencia geográfica o étnica, además de que afecta tanto a hombres como a mujeres, en razón de 1:2 en la mayoría de las poblaciones (James y Goodeve 2011).

### 2.2.1 CLASIFICACIÓN

De acuerdo con la Sociedad Científica Internacional en Trombosis y Hemostasia y el Comité de Estandarización en FVW (ISTH SCC on VWF por sus siglas en inglés), la EVW se clasifica en 3 subtipos con características clínicas y moleculares distintas, dependiendo de las alteraciones en la proteína traducida (Tabla 1).

**Tabla 1. Herencia, prevalencia y característica de hemorragia de EVW.**

Tipo	Herencia	Prevalencia	Propensión a sangrado
<b>Tipo 1</b>	Autosómico dominante	Más del 1% en PG	Leve a moderada
<b>Tipo 2A</b>	Autosómico dominante o recesivo	Rara	Variable (moderada)
<b>Tipo 2B</b>	Autosómico dominante	Rara	Variable (moderada)
<b>Tipo 2M</b>	Autosómico dominante o recesivo	Rara	Variable (moderada)
<b>Tipo 2N</b>	Autosómico recesivo	Rara	Variable (moderada)
<b>Tipo 3</b>	Autosómico recesivo	Rara (1:250,000 a 10 <sup>6</sup> )	Alta (severa)

Otra clasificación toma en cuenta si es por deficiencia cuantitativa o cualitativa de la proteína VWF. La clasificación tiene relevancia para el tratamiento de EVW. Las categorías diagnósticas se definen tomando en cuenta los mecanismos fisiopatológicos y su correlación

con la respuesta al tratamiento con desmopresina o plasma total o VWF (Tabla 2). La clasificación se diseñó de manera independiente de los procedimientos de diagnóstico.

**Tabla 2. Clasificación por defecto cualitativo o cuantitativo del VWF**

Tipo	Descripción
1	Deficiencia cuantitativa y parcial de vWF.
2	Defecto cualitativo de vWF.
2A	Adhesión plaquetaria dependiente de vWF disminuida con deficiencia selectiva de multímeros de alto peso molecular.
2B	Afinidad aumentada por GPIb.
2M	Adhesión plaquetaria dependiente de vWF disminuida sin deficiencia selectiva de multímeros de alto peso molecular.
2N	Afinidad de unión disminuida marcadamente para FVIII.
3	Deficiencia completa de vWF.

- 2.2.1.1 EVW Tipo 1. La deficiencia parcial cuantitativa o tipo 1 representa el 75% aproximadamente de los casos de EVW. Se hereda de manera dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable (Cumming *et al.*, 2011). Se ha de mostrado que la influencia genética y otros factores condicionan niveles bajos de VWF. La enfermedad muestra una heterogeneidad alélica significativa con más de 100 mutaciones diferentes en el gen *VWF*, dentro de las que predomina la de sentido equivocado que se traduce en cambio de aminoácido y se presenta en el 70% de las mutaciones. En menor grado las mutaciones en el corte y empalme de alguno de los exones, produciendo proteína con alteración en el transporte, secreción y metabolismo de VWF. Las personas que tienen tales mutaciones generalmente tienen niveles menores a 20 IU/dL. La mayoría de las mutaciones causan una sustitución de aminoácido único en el dominio D3 o D4. El diagnóstico de este tipo de EVW es difícil de establecer cuando los niveles de VWF no son marcadamente bajos. Los síntomas de

hemorragias leves son comunes en la población general, por lo que se dificulta aún más el diagnóstico.

- 2.2.1.2 Deficiencia cualitativa de VWF o EVW tipo 2.

El tipo de EVW tipo 2 tiene cuatro subtipos, definidas por los resultados de su fenotipo. Los subtipos 2A, 2B y 2M son mutaciones autosómicas dominantes, mientras que el subtipo 2N es una alteración recesiva. La penetrancia en este tipo de EVW es alta con una enorme expresión consistente de mutaciones específicas en *VWF*.

- EVW tipo 2A. Puede ser causada por mutaciones (autosómico dominante) que interfieren con el ensamble o secreción de multímeros largos o por mutaciones que incrementan su susceptibilidad a degradación proteolítica en circulación. La deficiencia de los grandes multímeros predispone a la persona a tener hemorragias. La localización de la mutación a veces puede ser inferida en electroforesis en gel. Las mutaciones homocigotas en el propéptido alteran el ensamble de multímeros en el aparato de Golgi dando pequeños multímeros de VWF. Las mutaciones heterocigotas en el dominio CK pueden alterar la dimerización de proVWF en el retículo endoplásmico. Una mezcla de monómeros y dímeros llega del Golgi, donde la incorporación de monómeros al fin de un multímero previene elongación (mutaciones del grupo 1). Las mutaciones que ocurren cerca del dominio A2, se asocia a proteólisis marcada de las subunidades de VWF (mutaciones del grupo 2). Esas mutaciones interfieren con el plegamiento. Aproximadamente el 85% de las mutaciones de este subtipo son sustituciones con cambio de aminoácido localizados en el exón 28 del gen *VWF* (ISTH SSC *VWF*).
- EVW tipo 2B. Es causada por mutaciones de sentido equivocado (con cambio de aminoácido), mismas que son frecuentes y recurrentes en el exón 28 de *VWF* y que incrementa la unión de VWF a las plaquetas, lo que conduce a degradación proteolítica y disminución de multímeros funcionales del factor. Las plaquetas, por su parte, son cubiertas con VWF mutante, el cual impide a plaquetas adherirse en el sitio de lesión. Los pacientes presentan trombocitopenia, por secuestro reversible del VWF formando agregados. Éstos últimos son disueltos por la acción de ADAMTS13, causando la disminución característica de los multímeros largos de VWF. La mutación se lleva cabo dentro o adyacente al

dominio A1, en la región de unión de GPIb de la plaqueta. Como se comentó anteriormente, éstas mutaciones resultan en la ganancia de función, promoviendo la interacción entre plaquetas y VWF (ISTH SSC *VWF Database*).

- EVW tipo 2M. Incluye variantes con adhesión plaquetaria dependiente de VWF disminuida que no es causada por la ausencia de multímeros de VWF de alto peso molecular. Las mutaciones presentes (dominantes monogénicas y predominantemente sustituciones con cambio de aminoácido) reducen la interacción de VWF con GPIb de la plaqueta o con el tejido conectivo (mutaciones en el dominio A3 de VWF) y no altera sustancialmente el ensamble de multímeros. Las mutaciones de este subtipo de enfermedad, se producen predominantemente en el dominio A1 ([www.shef.ac.uk/vwf/](http://www.shef.ac.uk/vwf/)).
  - EVW tipo 2N. Es un rasgo recesivo monogénico. Se conoce 25 alelos mutantes que producen principalmente mutaciones por sustitución con cambio de aminoácido, en los exones 18, 19,20 y 21 a 27, las cuales alteran la unión a FVIII, es decir, en el dominio D`-D3 (región de unión a FVIII en N-terminal) entre residuos Ser764 y Arg1035. FVIII disminuye sustancialmente y puede confundirse con Hemofilia A.
- 2.2.1.3 Deficiencia total de VWF o EVW tipo 3. La herencia de este subtipo es autosómica recesiva. Los individuos afectados son homocigotos o heterocigotos compuestos. Las mutaciones producen inversión en el marco de lectura o mutaciones sin sentido, aunque pueden producirse grandes eliminaciones, mutaciones en sitio de empalme y mutaciones sin sentido (no *sense*). Estas mutaciones se distribuyen a través de todo el gen. Una fracción de pacientes con este subtipo tienen aloanticuerpos a VWF debido a transfusiones o hemoderivados. Este fenotipo se caracteriza por niveles no detectables de VWF y niveles de bajos de FVIII.

## 2.2.2 BASES GENÉTICAS DE LA EVW

### 2.2.2.1 EL GEN VWF

El gen *VWF* se localiza en la región 13.3 del brazo corto del cromosoma 12 humano y está compuesto de 52 exones abarcando un total de 178 kb. Los exones tienen una longitud que comprende desde 40 b hasta 1.4kb, como el exón 28. Este ocupa aproximadamente el 0.1% del cromosoma 12. El gen *VWF* se expresa a través de su mensajero (RNAm) que muestra una longitud de 9 kilobases (Kb) y se traduce como proteína de 2813 amino ácidos (aa's) con peso molecular aproximado de 310,000 Da. (Figura 2 y Figura 3).

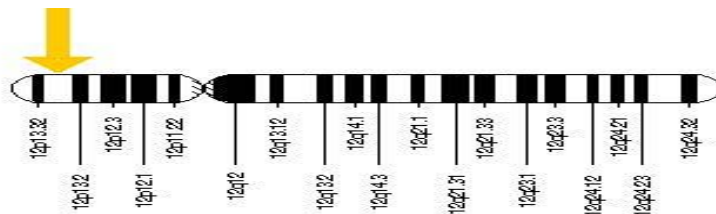


Figura 2. Ubicación del gen *VWF* en el brazo corto del cromosoma 12. (omim.org/entry/613160)

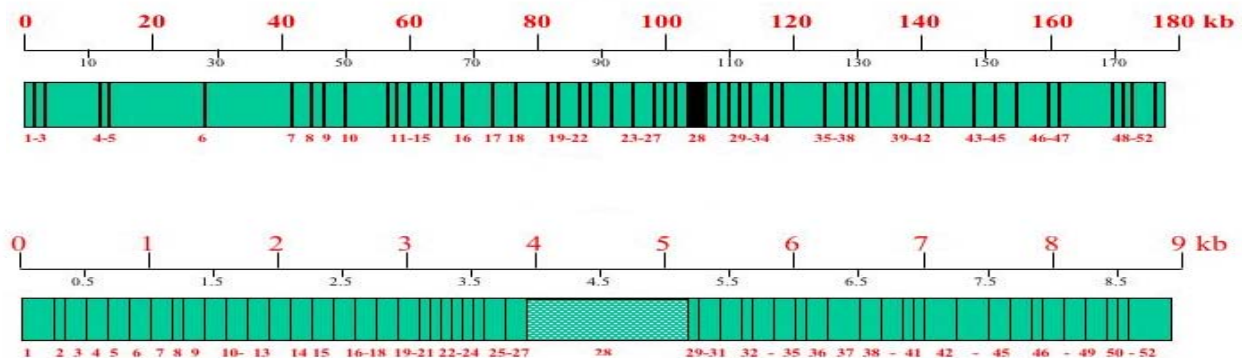


Figura 3. El gen *VWF* y su mensajero. Los números superiores indican las Kilobases. Los números inferiores indican los exones que lo compone. (www.shef.ac.uk/vwd.html.)

Comparando la secuencia de DNA, el gen *VWF* guarda relación con otras secuencias que codifican para moléculas de adhesión. Cabe resaltar que la proteína VWF se expresa en la mayoría, pero no en todas las células endoteliales. La expresión en el gen *VWF* endotelial puede ser regulado por exposición al estrés. La longitud de una repetición GT polimórfica en el promotor proximal, correlaciona con la magnitud de esta respuesta. Sin embargo, esta repetición GT no influye en los niveles de VWF circulante.

### 2.2.2.2 EI PSEUDOGEN

Existe un pseudogen que es una duplicación de los exones 23 al 34 con una similitud del 97% al gen y está localizado en la región 11.2 del brazo largo del cromosoma 22 (figura 4).



Figura 4. Representación esquemática del gen y pseudogen de VWF. (Mancuso *et al.*, 1991).

La expresión de este gen está altamente regulada y se restringe exclusivamente a células endoteliales y megacariocitos por lo que el RNAm se encuentra en altas concentraciones en algunos órganos como pulmón, bazo, aorta y cerebro, en menor cantidad se expresa en hígado, intestino, músculo esquelético y riñón (Aird, *et al.*, 1995).

El análisis de la secuencia del gen *VWF*, ha mostrado de manera clásica un patrón de segmentos repetidos homólogos que va del dominio A hasta el dominio D (3 dominios A, 3 dominios B, 2 dominios C y 4 dominios D), lo que indica que este gen proviene de una compleja serie de duplicaciones parciales como proceso de evolución (Mancuso, 1991).

### 2.2.2.3 MUTACIONES EN EL GEN VWF

El análisis molecular del gen *VWF* ha mostrado un espectro de cambios que en general incluyen pequeñas inserciones o eliminaciones que producen corrimiento del marco de lectura, aunque las más frecuentes son mutaciones en sitios de empalme exón-intrón y mutaciones puntuales, ya sea sin sentido o de sentido equivocado (Figura 5).

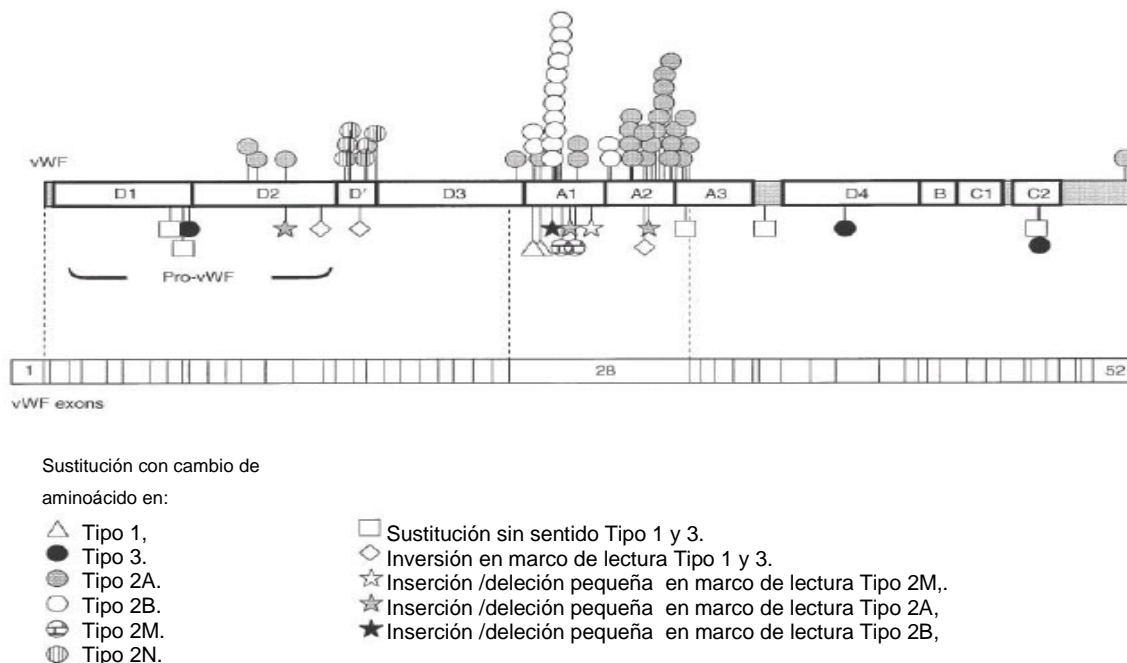


Figura 5. Mutaciones en el gen *VWF* (Sadler *et al*, 2006).

Se ha informado que existe correlación entre la localización de la mutación en el gen *VWF* y el tipo de EVW (Ginsburg *et al*, 1993, Sadler *et al*, 2006).

De acuerdo con Goodeve (2010) y a Shahbazi y col. (2012) y con las bases de datos inglesa y japonesa, los exones que presentan mayor frecuencia de mutación por nucleótido son del exón 18 al 20, el 28 y el 52.

En México, Melo-Nava y col. (2007), informaron un estudio molecular del gen *VWF* en 34 pacientes diagnosticados con EVW y 50 controles negativos a la enfermedad. Los pacientes presentaron sangrados mucocutáneos y antecedentes familiares de sangrados. El tipo 2 de EVW se presentó en el 69% de los pacientes. En este estudio se encontraron tres nuevas mutaciones con cambio en aminoácido en la proteína del factor de von Willebrand.



#### **2.2.2.4 POLIMORFISMOS**

Existen variaciones que en teoría no afectan la fisiología de la proteína VFW debidas a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Se han identificado más de 250 localizados en regiones exónicas, intrónicas e incluso dentro de la región promotora del gen *VWF* (Base de datos de la Universidad de Sheffield).

#### **2.2.3 LA PROTEINA DE VON WILLEBRAND (VWF).**

VWF es una glicoproteína que se sintetiza como pre-pro-proteína y una vez “madurada” los monómeros se unen por enlaces disulfuro formando multímeros de alto peso molecular. Esto permite mostrar múltiples sitios de unión para las plaquetas y a la membrana basal, importantes en la hemostasia (Castaman *et al*, 2003). Los multímeros que varían de peso molecular (PM) entre 0.5 y 20 millones Da.

La comparación de la secuencia peptídica primaria del VWF con la secuencia de cDNA se identifica un prepropéptido compuesto por un péptido señal de 22 amino ácidos (aa's), un polipéptido precursor (propéptido cuyo dominios comprende D1y D2) denominado antígeno II de VWF, y la subunidad madura. La ruptura del propéptido (741 aa's) en el extremo N-terminal, produce la subunidad madura de VWF (2050 aa's; Figura 6).

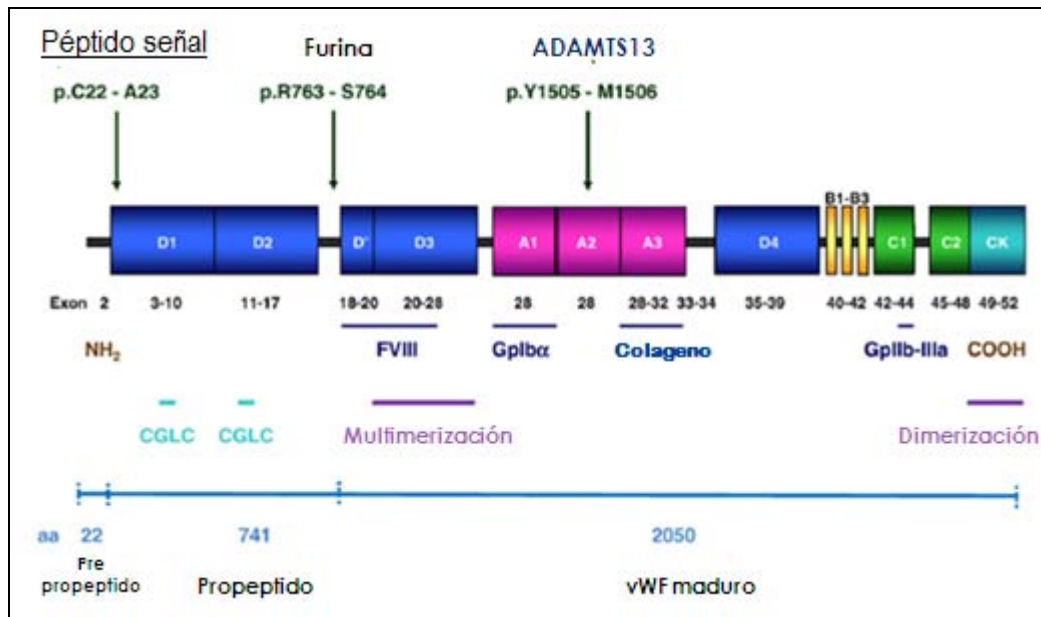


Figura 6. Representación esquemática de la traducción del RNAm del gen VWF. (CGLC; secuencias consenso de disulfuro isomerasa; (Goodeve 2010).

Recientemente Zhou y col.(2012), usaron la microscopía electrónica para establecer la estructura conformacional de esta proteína (Figura 7), que en condiciones acidas, la proteína se asocia en forma de dímero, semejando a un ramillete de flores. Cuando el dímero se libera en el plasma, éste se une al siguiente adoptando la forma de un collar.

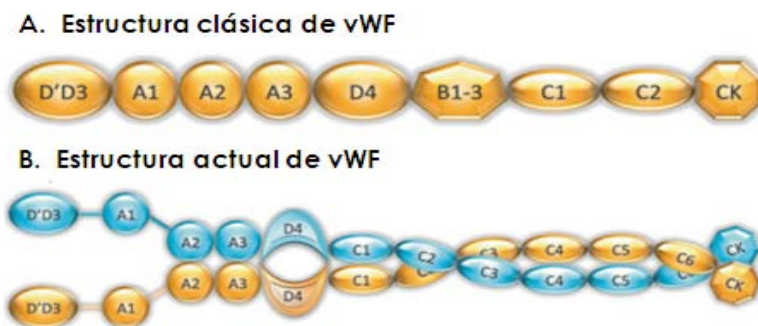


Figura 7. Estructura conformacional de VWF (Zhou et al., 2012).

Se encuentran dos secuencias RGD (Arginina-Glicina-Aspartato) en proVWF, una se conserva en el polipéptido maduro (dominio C1) y es parte del sitio de unión para el receptor

de la integrina plaquetaria, GP<sub>Ib/IIIa</sub>. Se han identificado varios dominios funcionales en la subunidad del VWF (Figura 6):

- En el propéptido, se encuentran dos dominios (D1 y D2, regiones CGLC) que son necesarios para las uniones disulfuro interdímeros.
- Tres sitios de unión a colágeno, dos de ellos se conservan en la proteína madura, y un tercero en el propolipéptido (dominio A1 y A3). De estos dominios el más importante se encuentra en el dominio A3. Además, el dominio A1 puede unir a heparina y moléculas relacionadas (Babic *et al.*, 2010)
- Existe un sitio de unión a factor VIII (FVIII), localizado en la región N-terminal, y que interactúa con el sitio N-terminal del FVIII (dominios D'D3).
- El dominio D4 de esta proteína interacciona con ADAMTS13 en el proceso de proteólisis (Zanardelli *et al.*, 2009).
- Tiene 2 receptores para unirse a plaquetas: GPIb en el dominio A1 que interviene esencialmente en la unión del VWF al endotelio para formar el tapón hemostático primario, y GP<sub>Ib/IIIa</sub> en plaquetas activas localizado en la región C-terminal (dominio C1).
- El dominio CK está involucrado en la dimerización de los monómeros.

### 2.2.3.1 BIOSÍNTESIS DE VWF

La glicoproteína VWF, es producida por las células endoteliales y por los megacariocitos, y todos los procesos involucrados en su biosíntesis, esto es, que inmediatamente después de su síntesis, VWF sufre una serie de modificaciones post-traduccionales (Figura 8 y 9):

- En retículo endoplásmico (RE), casi al terminar su síntesis o inclusive antes de su secreción, se elimina el péptido señal (compuesto por 22 aa's). Esto se realiza adyacente a 2 aminoácidos básicos, lisina-arginina (Lys-Arg) en las posiciones -2 y -1. Para que la proteasa reconozca el sitio de ruptura, se requiere de una Arg en posición -4. La multimerización y la ruptura del propéptido no son procesos ligados. Aunque la separación del propéptido ocurre primordialmente de manera intracelular, la ruptura puede efectuarse después de la secreción. Otra modificación postraduccional es el comienzo de la glicosilación ligados a N (adición principalmente de manosa en 12 regiones potenciales en subunidad madura y 3 en el propéptido). La dimerización

también se realiza mediante la unión de la región C-terminal entre los monómeros, por enlaces disulfuro (Sadler 1998).

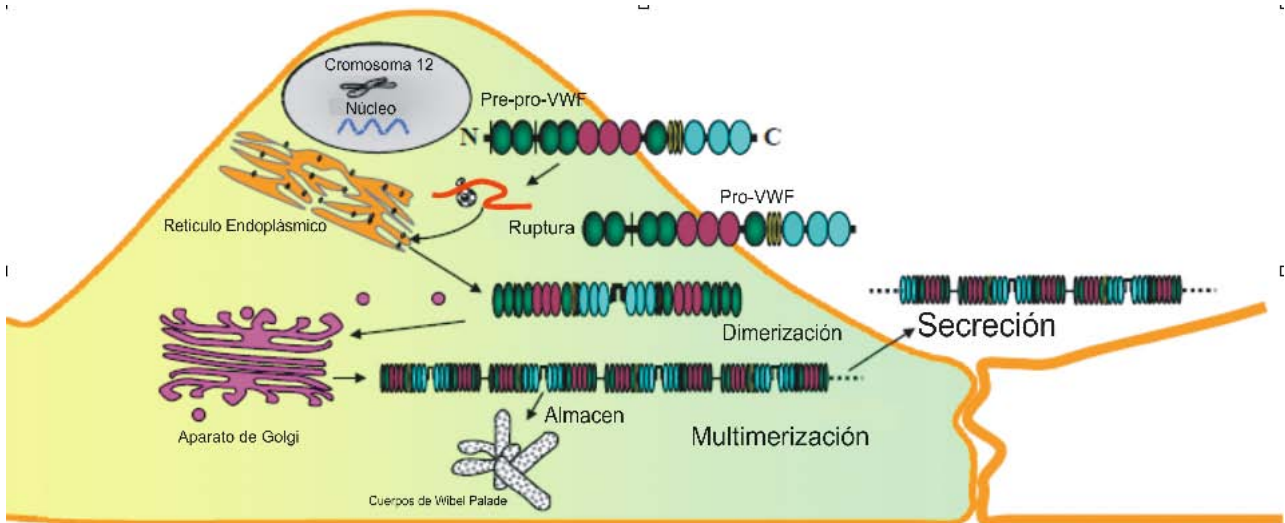


Figura 8. Síntesis de VWF (Tomado de Ping Lou et al, 2012).

- Las modificaciones post-traducción adicionales se realizan en el aparato de Golgi (AG) incluyendo la adición múltiple de carbohidratos ligado al O (región cis, adquiriendo la molécula determinantes antigénico semejantes a los del sistema de grupo sanguíneo ABO), así como el proceso de sulfatación de la molécula; por otra parte en la posición trans del AG, se realiza el proceso de multimerización (en regiones D'-D3), en condiciones ácidas (pH 5.8), dando como resultado un pool heterogéneo de multímeros de diferente tamaño. Una especie intermediaria, entre el propéptido y VWF, con puentes disulfuro en el dominio D'D3 aparece brevemente en el RE o AG anterior, los cuales pueden posicionarse esos dominios para una multimerización subsecuente.
- Cabe hacer mención que existe una proteasa específica de VWF de la familia ADAMTS (del inglés *A Disintegrin and Metalloprotease with ThromboSpondin motif*, ADAMTS 13) que rompe el polipéptido entre los residuos Tirocina1605 y Metionina 1606, dentro del dominio A2, en situaciones de alta tensión (Denis et al, 2008).

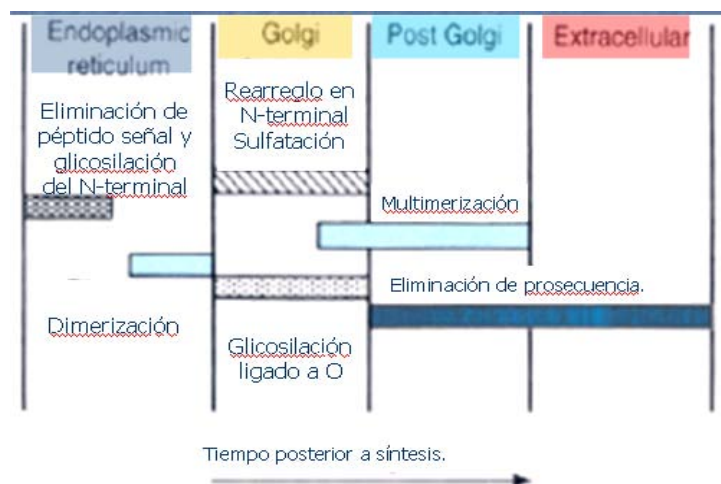


Figura 9. Modificaiones postraduccionales del VWF (Tomado de Hoffman et al. 2005).

### 2.2.3.2 ALMACENAMIENTO Y SECRECIÓN DE VWF.

El VWF es la única proteína adhesiva que se almacena en las células endoteliales en cúmulos conocidos como cuerpos de Weibel-Palade (WP), en plaquetas como gránulos  $\alpha$  junto a otras proteínas y en las células endoteliales coexiste con t-PA que se libera de manera independiente de VWF. Los cuerpos de WP deben madurar, para ello adquieren moléculas de superficie celular (como Rab27a, Rab3D y CD63), que ayudan a fijar estas estructuras al citoesqueleto para ser secretados. Existe otra proteína transmembranal, P-selectina, que se encuentra tanto en los gránulos  $\alpha$  como en los cuerpos WP. Recientemente se ha establecido que P-selectina puede asociarse al dominio D'D3 de VWF. En las células endoteliales y en megacariocitos, la secreción puede inducirse por medio de secretagogos que aumentan los niveles de calcio intracelular o aumentan los niveles de AMPc (Cleator *et al.*, 2006). En células endoteliales, VWF se secreta mediante membranas lumbinales y ab-lumbinales (Sadler 1998). Los mecanismos de secreción se realizan de dos formas, basal y constitutiva (Figura 10), y por un mecanismo clásico regulado:

- La vía constitutiva, que esta acoplada a la síntesis de VWF y no necesita estimulación. La secreción de VWF inmaduro (dímeros o multímeros pequeños) se realiza sin regulación o almacenamiento (Johnsen, Lopez, 2008).

- La vía basal, o semejante a la constitutiva, libera pequeñas cantidades de vWF que ha sido almacenado en cuerpos de WP inmaduros (Giblin *et al.*, 2008).
- La vía regulada, que involucra la liberación de VWF de los cuerpos de Wibel-Palade, mediante el influjo de  $Ca^{2+}$  en la célula producido por secretagogos (como trombina, histamina, fibrina, la proteína del complemento C5b-9 y acetato de desmopresina, DDAVP (Johnsen and Lopez, 2008). Esta liberación es dependiente del citoesqueleto tubular. Esta vía libera multímeros, que biológicamente son los más potentes.

En megacariocitos, sin embargo, carece de vías reguladas, y una vez que son estimuladas, se secretan de manera constitutiva.

En condiciones normales, una vez liberado el VWF hacia el torrente circulatorio, esta proteína circula en forma globular en condiciones de baja tensión, tiene una vida media de 12 horas. Posteriormente es degradado por la metaloproteasa ADAMTS (cuando es sometido en condiciones de alta tensión, desdoblado la proteína) en el dominio A2, específicamente entre Tirosina1605 y Metionina1606 (Millar *et al.*, 2005, Cao *et al.*, 2008) bajo condiciones de tensión celular capaces de dejar libre el dominio antes mencionado (Tsai, 2012).

Los niveles de este factor son de aproximadamente 10 ug/mL en plasma, y se ve afectado por el género, la edad y el grupo sanguíneo ABO y/o Lewis del individuo (Campos *et. al.* 2011), además de los niveles de epinefrina, mediadores inflamatorios y hormonas endócrinas (particularmente aquellas asociados con el embarazo y ciclo menstrual; Sukhu, *et al* 2003; Rugeri *et al.*, 2007).

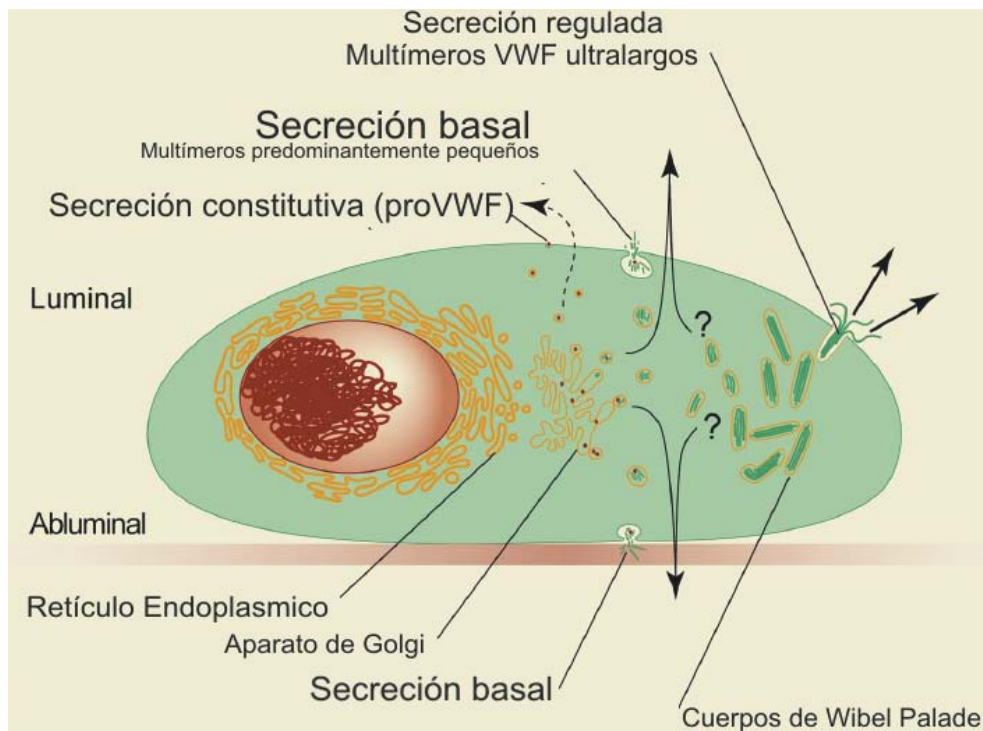


Figura 10. Mecanismos de secreción de vWF. (Tomado de Johnsen y López, 2008)

### 2.2.3.3 FUNCIONES DEL VWF.

VWF es una proteína multimérica que tiene 3 funciones primordiales:

1. Unión a la pared vascular en condiciones de alta tensión vascular. VWF se une a sitios de lesión endotelial vascular. Este factor se puede unir diferentes tipos de colágeno (I a IV). Se han reconocido dos dominios distintos dentro de su estructura madura de VWF (A1 y A3) y un tercero potencial en el propéptido. para unión a colágeno fibrilar (tipo I y III). Estudios realizados demuestran que el dominio A3 es el más importante para unión a colágeno (Morales *et al.*, 2006; Riddell *et al.*, 2009). Existen 2 mecanismos por los cuales se puede realizar la adhesión: un mecanismo directo, por el cual la fibrina se une al complejo GPIIb-IIIa, y un mecanismo indirecto, en el que VWF sirve como un puente entre fibrina y el receptor GPIb de las plaquetas (Riddell *et. al*, 2009).
2. Contribuye al reclutamiento inicial de plaquetas en el tejido vascular dañado actuando como un “puente” molecular entre el tejido subendotelial expuesto y los receptores de

plaquetas GPIb/IX/V (Ruggeri 1997; Dayananda *et al.*, 2010) and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Brill *et al.*, 2011). VWF interactúa con plaquetas para mediar la agregación plaquetaria y concentra las plaquetas en el sitio de lesión vascular. En condiciones de alta tensión vascular, VWF se desdobra y deja expuesta una región en el dominio A que es oxidada por metionina, esto provoca que la proteína sea más eficiente en su interacción con las plaquetas, además que sea resistente a la degradación por ADAMTS13 (Fu *et al.*, 2011). Esta proteína interactúa con un complejo receptor en la superficie de las plaquetas compuesta de cadenas GPIb $\beta$  y GPIb $\alpha$  ligadas por puentes disulfuro asociadas no covalentemente con GPIIX y GpV. El sitio de unión para VWF está dentro del segmento de aminoácido 293 en el extremo N-terminal de GPIb y requiere sulfatación de varios residuos de tirosina para una óptima unión (posiciones 276, 278 y 279). El dominio de unión de GPIb en VWF se encuentra dentro del segmento A1. GPIb unido al dominio A1 aumenta la proteólisis de los fragmentos de VWF por ADAMTS-13 y sugiere un mecanismo de regulación negativa para limitar la propagación del trombo *in vivo*. La secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS, 2507-2510) de VWF sirve como sitio de unión para la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Éste complejo es un miembro de la familia de las integrinas de receptores de superficie celular. Esta integrina sufre un cambio conformacional de alta afinidad cuando se activan las plaquetas, y en adición con VWF, pueden unir otras moléculas proteicas adhesivas, incluyendo fibrinógeno. Aunque VWF se encuentra en niveles más bajos en circulación que fibrinógeno, VWF puede ser un ligando crítico y participa en unir plaquetas y adherir fibrina en condiciones de flujo, donde el dominio C1C2 participa en la unión de fibrina. Una secuencia RGD está presente en el propéptido de VWF (Antígeno II VWF) aunque su significado funcional se desconoce (Fuchs *et al.*, 2010). Cabe mencionar que la heparina puede interferir en la función plaquetaria, debido a que VWF puede interactuar con esta molécula cerca del dominio de unión de GPIb, entre los aminoácidos 449-728 (Hassan *et al.*, 2012).

3. Se asocia no covalentemente al FVIII e impide la degradación por APC, además de mantener niveles adecuados para el proceso de coagulación (Denis *et al.*, 2008; De Meyer *et al.*, 2009). Sorprendentemente, FVIII incrementa la susceptibilidad de VWF a proteólisis por ADAMTS-13 bajo condiciones de tensión. El dominio de unión de FVIII en VWF se localiza en los primeros 272 aminoácidos del extremo N-terminal de la



subunidad madura. El sitio de unión de VWF en FVIII se encuentra en una región ácida en el extremo N-terminal de la cadena ligera y requiere sulfatación del aminoácido Tirosina 1680 para una óptima unión. La trombina rompe después del aminoácido Arginina 1689 en FVIII, lo que provoca la activación y liberación de VWF hacia los sitios de formación de coágulo, donde forma un complejo con FIXa en la superficie plaquetaria (Hassan *et al.*, 2012).

Aparte de este papel en la hemostasia primaria, se han descubierto otras funciones:

- VWF y el propéptido son indispensables para la formación intracelular de orgánulos endoteliales de almacén específicos, los cuerpos de WP.
- El efecto supresor sobre las células tumorales potencialmente metastásicas (Terraube *et al.*, 2006). Se ha demostrado que VWF, a través de su secuencia RGD en el dominio C1 puede promover la adhesión de células tumorales (Terraube *et al.*, 2007).
- VWF tiene sitios de unión para la proteína A situada en la superficie de *Staphylococcus aureus*, facilitando la colonización por patógenos (O'seaghdha *et al.*, 2006).
- VWF puede promover la proliferación de células musculares lisas (Qin *et al.*, 2003).
- Esta proteína se asocia con complicaciones aterotrombóticas, originadas por la capacidad de promover adhesión plaquetaria en situaciones de alta tensión vascular. Una alta concentración de VWF es proporcional a la concentración de FVIII, por lo que se crea un alto riesgo de complicaciones trombóticas venosas (Smith *et al.*, 2011). Otras moléculas que favorecen la formación de trombos, son las mallas de histonas provenientes de los neutrófilos, las cuales atrapan moléculas adhesivas, como VWF, confiriéndoles actividad protrombótica (Fuchs *et al.*, 2012).
- Actúa como superficie adhesiva para leucocitos por medio de glicoproteínas P-selectinas (PSGL-1) y moléculas de la familia de las  $\beta_2$ -integrinas (Pendou *et al.*, 2006, Petri *et al.*, 2010). Así también, puede favorecer el aclaramiento de agentes infecciosos y células tumorales por parte de macrófagos (Fuch *et al.*, 2010). Esto demuestra el papel de esta proteína en el proceso de inflamación: VWF puede actuar como superficie adhesiva para leucocitos mediante la interacción P-selectina ligando 1 GP y  $\beta_2$  integrina (Pendou *et al.*, 2006); los multímeros de VWF unidos a plaquetas unidos en la superficie del endotelio recluta eficientemente leucocitos; además, el complejo VWF-plaqueta es crítico para extravasación de leucocitos (Petri *et al.*, 2010).

- Debido a que VWF presenta 4 diferentes tipos de dominios, descritos anteriormente, le confiere el potencial de interaccionar con un gran espectro de proteínas y ligandos entre los que podemos mencionar angiopoyetina 2 (relacionada en la maduración vascular; Christophe OD, Cherel G, Lenting PJ, Denis CV, observaciones no publicadas), osteoprotegerina (relacionada al metabolismo de hueso; Shahbazi *et al*, 2007), y miembros de la familia de las galectinas, 1 y 2 (las cuales participan en procesos de desarrollo de cáncer, inflamación y apoptosis; Saint-Lu *et al.*, 2012), por mencionar algunas.

Las funciones antes mencionadas de esta glicoproteína, hacen que sea un factor clave en el mecanismo de protección contra las hemorragias, la hemostasia propiamente dicho; sin embargo, su disfunción o déficit compromete todo el proceso hemostático y generando EVW.

#### **2.2.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA EVW.**

En primera instancia, el clínico debe evaluar mediante historia clínica episodios de excesivo sangrado tanto del paciente como de su familia. Los datos obtenidos deben apoyarse de pruebas de laboratorio que confirmen o rechacen el diagnóstico inicial.

Existen varias pruebas de laboratorio clínico para determinar la presencia de EVW, siguiendo algoritmos intencionados a su búsqueda (Figura 11). Puede realizarse una evaluación muy somera de la hemostasia mediante valores de citometría hemática (CH), tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa), niveles de fibrinógeno o tiempo de trombina (TT), tiempo de sangrado IVY (TS).

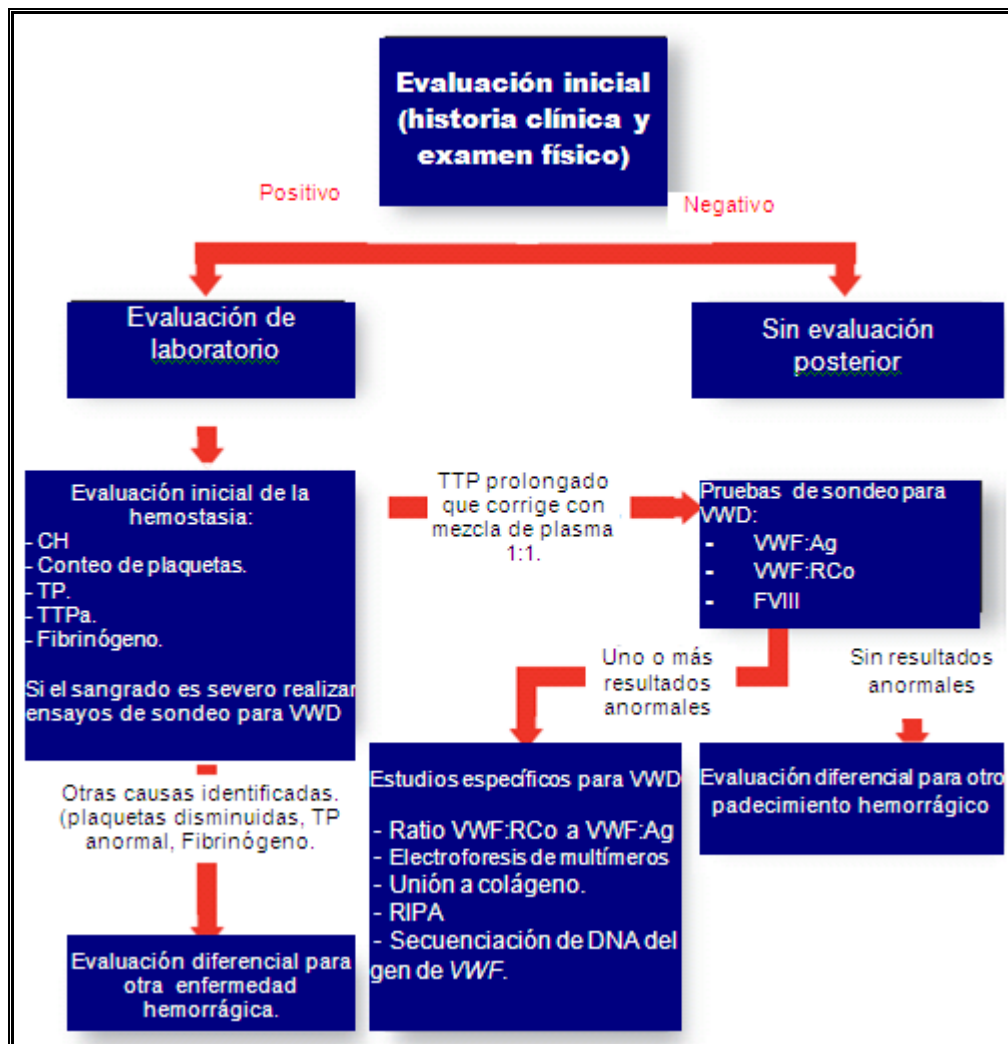


Figura 11. Algoritmo para determinar EVW (Modificado del U.S Department of Health and human services, 2007).

#### 2.2.4.1 Pruebas de laboratorio para el diagnóstico para EVW.

Existen tres pruebas de laboratorio para detectar EVW o niveles bajos de VWF (Meijer *et al*, 2006):

- VWF:Ag. Es un inmunoensayo (principalmente ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immuno Sorbed Assay* que significa Inmunoensayo sorbente ligado a enzima) que determina la cantidad de VWF presente en plasma. El resultado de la prueba de la persona se reportará en unidades internacionales por decilitro o mililitro (IU/dL o IU/mL).

- VWF:RCo. Es una prueba funcional que mide la habilidad de VWF para interactuar con plaquetas normales. El antibiótico, Ristocetina, causa que VWF se una a plaquetas resultando en agregación plaquetaria y su eliminación de la circulación. La actividad del cofactor Ristocetina (VWF:RCo) tiene alta variación intra e interlaboratorio y no mide la función fisiológica. El resultado debe expresarse en UI/dL basado en plasma estandarizado.
- Ensayo de coagulación de FVIII. Este método mide la función del cofactor del factor de coagulación VIII, en plasma, es decir, la actividad de FVIII mide la habilidad de VWF para unirse y mantener niveles adecuados de FVIII en circulación.

Existe otra batería de pruebas confirmatorias de la enfermedad (Figura 12; Favalaro *et al*, 2004):

- Prueba de multímeros de VWF. Es un ensayo cualitativo que pone de manifiesto la concentración variable de los multímeros de diferente peso molecular, usando electroforesis en poliacrilamida para separar el pool de multímeros y su posterior detección en membrana de nylon por fluorescencia.
- Agregación plaquetaria inducida por Ristocetina (RIPA) a bajas dosis. Este estudio se lleva a cabo en bajas concentraciones de ristocetina, para que no cause unión de VWF y agregación de plaquetas en muestras de pacientes normales; sin embargo, se produce agregación en pacientes con subtipo 2B de VWD.
- Ensayo VWF; unión a plaquetas (VWF:PB). Este método mide la unión de VWF a plaquetas normales fijadas con p-formaldehído usando concentraciones bajas de ristocetina. La cantidad de VWF unido a plaquetas fijadas se determina mediante un anticuerpo marcado. Para individuos normales o pacientes con tipo 1, 2A, 2M, 2N y tipo 3, exhiben mínima o nula unión a plaquetas, a concentraciones de ristocetina usada, pero pacientes con tipo 2B exhiben unión significativa.
- VWF: unión a FVIII. Mide la habilidad del VWF de una persona para unirse a FVIII exógeno adicionado y es útil para diagnosticar EVW tipo 2N. en ensayo se lleva cabo capturando el VWF del paciente en placa de ELISA, eliminando FVIII endógeno, y adicionando una concentración conocida de FVIII exógeno recombinante. La cantidad de FVIII unido se determina por ensayos cromogénicos.
- Relación (Ratio) VWF:RCo / VWF:Ag. Ayuda a diagnosticar EVW tipo 2A, 2B y 2M y diferencia éstos del tipo 1.

	NORMAL	TIPO 1	TIPO 2A	TIPO 2B	TIPO 2M	TIPO 2N	TIPO 3	EVW PLAQUETARIO
VWF:Ag	N	L, ↓ o ↓↓	↓ o L	↓ o L	↓ o L	No L	Ausente	↓ o L
VWF:RCo	N	L, ↓ o ↓↓	↓↓ o ↓↓↓	↓↓	↓↓	No L	Ausente	↓↓
FVIII	N	No ↓	No ↓	No ↓	No ↓	↓↓	1-9 IU/dL	No L
RIPA	N	N	↓	N	↓	N	Ausente	N
LO-RIPA	Ausente	Ausente	Ausente	↑↑↑	Ausente	Ausente	Ausente	↑↑↑
PPA-100 CT	N	No ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
TS	N	No ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
Conteo plaquetas	N	N	N	↓ o N	N	N	N	↓
Patrón multímeros	Normal	Normal	Anormal	Anormal	Normal	Normal	Ausente	Anormal

L: bajo; N: normal; ↓, ↓↓, ↓↓↓: disminuido; ↑, ↑↑, ↑↑↑: alto. TS: tiempo de sangría.

*Figura 12. Parámetros de pruebas de laboratorio de los diferentes tipos de EVW*

(Modificado de U.S Department of Health and Human Services, 2007).

#### **2.2.4.2 Relación del VWF con el sistema ABO**

Los niveles plasmáticos de VWF pueden verse alterados por la edad, stress, niveles de estrógeno, el tipo sanguíneo, entre otros, principalmente para el diagnóstico del tipo 1 de EVW. En particular, el sistema ABO ejerce un mayor efecto sobre los niveles de VWF. Se ha demostrado que individuos que presentan un solo o ambos alelos O, tienen niveles plasmáticos más bajos que los individuos sin alelos O; sin embargo el mecanismo por el cual este proceso ocurre todavía no está bien esclarecido pero se sugiere que los antígenos que tiene el sistema ABO influyen en la proteólisis de moléculas de VWF. Por lo tanto se debe de considerar el grupo sanguíneo al momento del diagnóstico de EVW (Tabla 3; Franchini *et al*, 2007; Sousa *et al*, 2007).

**Tabla 3. Influencia del grupo sanguíneo ABO sobre la concentración de VWF.**

GRUPO SANGUÍNEO	RANGO
O	41-179 UI/dL
A	55-267 UI/dL
B	65-275 UI/dL
AB	73-271 UI/dL

(Tomado y modificado del *U.S department of health and human services*, 2007).

### 2.2.5 TRATAMIENTO DE EVW

Los esquemas de tratamiento para controlar los episodios hemorrágicos con este tipo de enfermedad, sigue 3 estrategias (Pasi *et al*, 2004):

- Incremento de la concentración de VWF liberándolo de su almacén endógeno, principalmente de células endoteliales, mediante la administración de análogos de vasopresina. La desmopresina (1-desamino-8-D-Arginina vasopresina, DDAVP) es un derivado sintético de la hormona antidiurética. Su mecanismo de acción es la estimulación de los receptores V2 de las células endoteliales y la liberación, mediada por cAMP, de VWF almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade (Kaufmann *et al*, 2003).
- Administración de VWF exógeno. Existen diferentes liofilizados de VWF y FVIII que pueden administrarse periódicamente en los pacientes. Los hemoderivados, como los crioprecipitados no deben usarse, por el riesgo de infección. La transfusión de plaquetas será como una fuente adicional de VWF (Mannucci *et al.*, 2002).
- El uso de agentes que promueven la hemostasis y curación de heridas, sin alterar la concentración de VWF endógeno. Los antifibrinolíticos son agentes que inhiben la conversión de plasminógeno a plasmina, ayudando a estabilizar el tapón hemostático formado (Mannucci 1998).

Los tres esquemas de tratamiento no son mutuamente exclusivos, y los pacientes pueden recibir uno o la combinación de éstos al mismo tiempo. La terapéutica a seguir depende del tipo y severidad de EVW (Pasi *et al*, 2004).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Considerando la frecuencia de las mutaciones que ocurren en el gen del *VWF* existe una alta probabilidad de encontrar alteraciones genéticas en pacientes mestizos mexicanos con EVW, principalmente en el exón 28 por ser el de mayor tamaño y uno de los más polimórficos, por lo que el estudio a nivel molecular de los pacientes, contribuiría a un diagnóstico que influiría en una terapia adecuada, mejorando la calidad de vida del paciente y mejor asesoramiento genético.

### **4. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

#### **Objetivo General**

1. Analizar, mediante técnicas moleculares, el exón 28 del gen *VWF* en pacientes con EVW.

#### **Objetivos Particulares**

1. Realizar amplificaciones del exón 28 del gen *VWF* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), corroborar el resultado, purificar el producto.
2. Determinar mediante secuenciación de la región, las posibles variaciones encontradas en las muestras analizadas.

### **5. HIPÓTESIS**

1. El exón 28 del gen *VWF* de los pacientes mestizos mexicanos con EVW, presenta mutaciones y/o polimorfismos ya informados y otros nuevos.

## **6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

### **6.1 PACIENTES**

Se estudiaron 19 pacientes entre 7 y 60 años, de los que tres fueron casos índice no relacionados y los restantes pertenecientes a cinco familias, provenientes de la clínica de Hematología del Centro Médico de Occidente del IMSS con las siguientes características:

1. Que se diagnosticaron con Enfermedad de Von Willebrand por el Servicio de Hematología.
2. Que aceptaron voluntariamente participar en el estudio y firmaron carta de consentimiento informado.
3. Que padres y abuelos fueron de nacionalidad mexicana.

El proyecto fu autorizado por el Comité Científico y de Bioética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y se obtuvo el apoyo para la realización del mismo a través del Fondo para el Fomento a la Investigación 2005-1-151.

### **6.2 EXTRACCIÓN DE DNA.**

Una vez obtenidas las muestras de sangre periférica de pacientes, se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. Posteriormente se separó, mediante pipeta Pasteur, la capa de leucocitos y se transfieren a un tubo de 1.5 mL. Se adicionó 700  $\mu$ L de solución de lisis a cada tubo y se centrifugaron a 2400 rpm durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 700  $\mu$ L de solución de lisis y nuevamente se centrifugó a 2400 rpm durante 10 minutos. Este proceso se repitió 3 veces más. Una vez terminado el tercer ciclo, se adicionó 180  $\mu$ L de NaCl 5 mM, se agitó en vórtex y se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 90  $\mu$ L de solución de SDS al 10% y se agito vigorosamente durante 10 minutos. Culminado el tiempo, se adicionó 700  $\mu$ L de una solución saturada de NaCl, se agitó en vórtex durante 10 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante se dividió en dos tubos plástico de 1.6mL y a cada uno se agregó 800  $\mu$ L de etanol absoluto (bien frío). Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Al sedimento se adicionó nuevamente etanol absoluto y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 10 minutos. Este proceso se repitió 3 veces más. En el



último ciclo, el sedimento se resuspendió con 700  $\mu$ L de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el restante se evaporó a 50°C por cinco-diez minutos. Finalmente, se adicionó agua inyectable estéril (200 $\mu$ L aproximadamente) para resuspender el DNA obtenido. Se realizaron alícuotas de 50 $\mu$ L y se mantuvieron en congelación hasta su uso.

### 6.2.1 Cuantificación de DNA.

La cuantificación de DNA se determinó por absorción 260 nm considerando que una DO equivale a 50ng/ $\mu$ l y la relación  $Abs_{260/280}$  indica pureza del producto (1.8-2.0 y una relación menor indica presencia de proteínas).

### 6.3 PRIMERS ELEGIDOS PARA EL ANÁLISIS DEL EXÓN 28 (de acuerdo a lo informado por Melo et al (2007)).

Todos están en sentido 5'->3'

**28AS=** 1ª parte del exón 28, cadena líder (sentido 5'->3'), incluye parte del intrón 27:

CTC AGA AGT GTC CAC AGG TT

**28AC:** 1a parte del exón, cadena complementaria:

TGG AGA TTT GGA ACA GTG TG

Tamaño amplificado 543 pb, Tm= 56.4°C

**28BS:** parte intermedia del exón 28:

AGC GAG GTC TTG AAA TAC AC

**28BC:** parte intermedia, cadena complementaria:

TTG CTC CTG TTG AAG TCG

Tamaño amplificado 482 pb, Tm= 56.4°C

**28CS:** parte final del exón 28:

AGC CGA CTT GAA CAG GAG CA

**28CC:** parte final del exón, cadena complementaria:

CCA GGT GCA GGG GAG AGG

Tamaño amplificado 525 pb, Tm= 60.0°C

#### 6.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

1. Una vez cuantificadas las muestras de DNA, se realizan cálculos para determinar el volumen que contenga entre 50-100 ng. La mezcla de reacción se realizó en condiciones estériles, en una campana previamente esterilizada por luz UV. La cantidad de cada reactivo se determinó mediante cálculos partiendo de la siguiente tabla:

**Tabla 4. Mix de reacción para amplificación.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad en <math>\mu\text{L}</math> para una amplificación.</b>
Buffer de amplificación 10X	2.5
Mezcla de desoxinucleotidos 10 mM	1.0
Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 2 mM.	1.5
Agua inyectable estéril	13
Taq polimerasa	0.25
Primer sentido (10 pM)	1.0
Primer antisentido (10pM)	1.0
DNA genómico	Volumen que contenga 50-120ng

Dependiendo del exón a amplificar, se utilizó el primer específico. En cada amplificación se procesó un blanco negativo.

2. Los tubos con las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador “Mastercycler gradient Eppendorf” en las siguientes condiciones:

**Tabla 5. Condiciones de reacción para amplificación.**

<b>Proceso</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial a 94°C.	5 minutos
Desnaturalización secundaria a 94°C	30 segundos
Alineamiento del primer (según su $T_m$ )	25 segundos
Extensión a 68°C	45 segundos
Extensión final a 72°C	7 minutos

Se programa el termociclador para que realice 36 ciclos. Terminada la amplificación, la reacción se conserva en refrigeración hasta que se realice electroforesis en gel de agarosa.

Las amplificaciones realizadas del exón 28 se sometieron a secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas de los cromatogramas se evaluaron mediante el análisis de homología comparándolas con una secuencia estándar mediante el software BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*). Las discrepancias entre las secuencias se analizaron en conjunto con el electroferograma obtenido.

### **6.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1.2%**

1. Se preparó el gel de agarosa al 1.2% disolviendo 0.84 g de agarosa en 70 mL de buffer TAE 1x mediante calentamiento.
2. Una vez disuelta la agarosa en su totalidad, se adicionó 1  $\mu$ l de Bromuro de Etidio (EtBr). La mezcla se colocó en la placa con los “peines” para que solidificara.
3. Una vez solidificada se colocó el gel en la cámara con buffer TAE 1x. Se mezclaron 2  $\mu$ l de cada amplificado con 2  $\mu$ L de buffer de carga.
4. Se colocó todo el volumen de la muestra en cada pozo mediante micropipeta y se realizó el corrimiento electroforético a 120miliVolts durante 50 minutos.
5. Posteriormente se visualizó el corrimiento en la cámara de UV, con la ayuda de EtBr, previamente adicionado al gel.

### **6.6 PURIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS MEDIANTE COLUMNAS “MARLIGEN®”**

1. Se adicionó reactivo de unión, en una proporción de 1:4, a cada tubo de amplificación.
2. La mezcla se depositó en la columna con cartucho y se centrifugo 13, 000 rpm durante 1 minuto. Durante la adición de la mezcla se procuró que se depositara en el centro de la membrana.
3. El líquido filtrado se desecha y se adicionan 750  $\mu$ L de reactivo de lavado. Se centrifuga 13,000 rpm durante 1 minuto.
4. Se descarta el líquido filtrado y se centrifuga nuevamente para asegurarse que no queden residuos de reactivo de lavado.

- Se desecha el líquido filtrado y se adicionó a la membrana 50µL de buffer de elusión en el centro de la columna, dejando actuar por 1 minuto. Se colocó un tubo eppendorf de 1.5mL a la columna y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto.

### 6.7 MARCAJE DE MUESTRAS PARA LA SECUENCIACIÓN.

- Se realizó la mezcla de reacción de acuerdo a la tabla 6 para obtener cadenas de los amplificados marcados.

**Tabla 6. Mix de reacción para marcado de cadena.**

<b>Reactivo</b>	Cantidad en µL para una secuenciación.
Buffer para secuenciación 5x	3
Big Dye ®	1
Primer sentido (10 pM)	0.2
Agua	4
DNA genómico	2

- Los tubos con las mezclas de reacción se colocaron en un “termociclador Mastercycler gradient Eppendorf” a las siguientes condiciones mostradas en la tabla 7:

**Tabla 7. Condiciones de reacción para marcados de cadena.**

<b>Proceso</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial a 94°C.	2 minutos
Desnaturalización secundaria a 96°C	10 segundos
Alineamiento del primer	5 segundos
Extensión a 60°C	4 minutos
Extensión final a 70°C	1 segundo

Se programa el termociclador para que realice 25 ciclos. Terminada la amplificación, la reacción se conservó en refrigeración hasta su purificación.

#### **6.8 PURIFICACIÓN AMPLIFICADOS MARCADOS MEDIANTE COLUMNAS QIAGEM®**

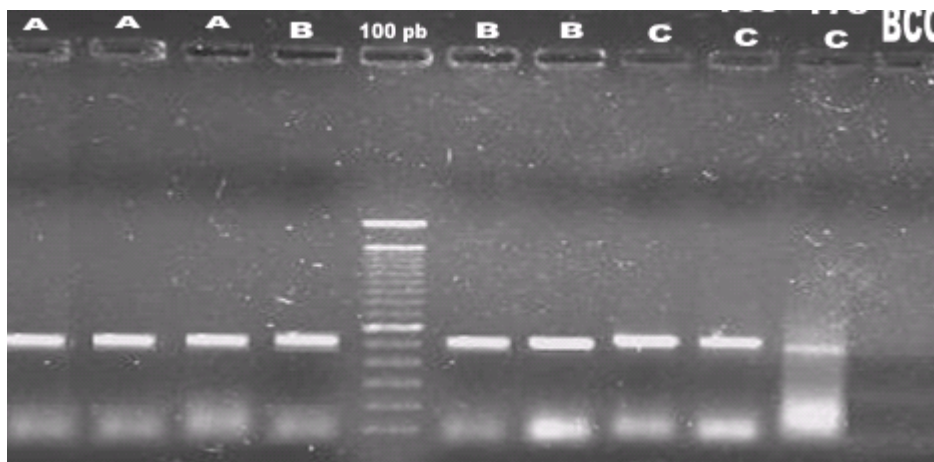
1. Se preparó una suspensión de Sephadex G50 (1g en 20 mL de agua inyectable).
2. Se adicionó a cada columna 700  $\mu$ L de la suspensión del Sephadex. Se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos a temperatura entre 2-8°C.
3. Se lavó con 1 mL cada columna con Sephadex.
4. Se adicionó la muestra en la placa de Sephadex y se adaptó un tubo eppendorf a la columna. Se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos. Se procuró que la placa de Sephadex no se deshidratara.
5. Una vez obtenidas todas las muestras se liofilizaron a 45°C aproximadamente 15 minutos.
6. A cada tubo de liofilizado se adicionó solución de formamida y se colocó en un capilar para realizarse la electroforesis capilar y obtener una separación de acuerdo a su tamaño. El electroferograma obtenido por el equipo se almacenó para su posterior análisis.

Una vez terminado el proceso, las muestras fueron evaporadas en un “Speed-vac” y enviadas al Depto. De Secuenciación de DNA del Instituto de Biología en la UNAM siendo responsable del área la Dra Laura Márquez.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los colaboradores hematólogos que enviaron las muestras, indican que los datos clínicos generales de los pacientes son semejantes a la enfermedad de von Willebrand, aunque hicieron falta los datos de laboratorio, incluyendo grupos sanguíneos que no se realizaron por haber enviado muestras de DNA en solución acuosa y de otras se obtuvo el DNA a partir de sangre con EDTA con varios días de tomada la muestra, lo que impidió que se realizara tal estudio.

La siguiente imagen muestra tres muestras amplificadas de las regiones del exón 28.

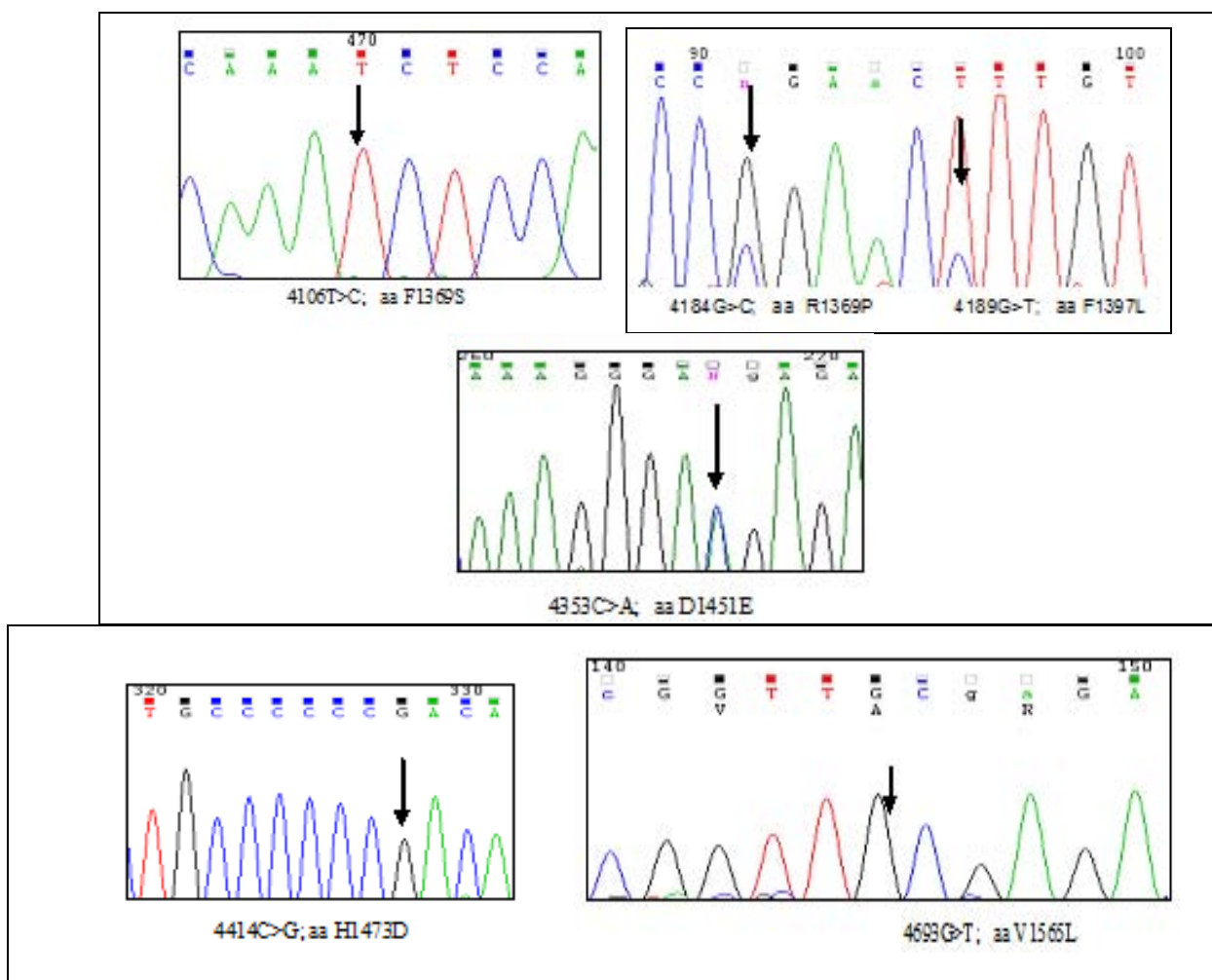


*Figura 13 Electroforesis de PCR del exón 28-A, -B y -C. El carril número 5 muestra el marcador de peso molecular (“Escalera de 100 pares de bases”).*

Los resultados de los electroferogramas obtenidos se compararon con la base de datos internacional. De esta manera se encontraron cinco mutaciones relacionadas a EVW tipo 2 y cinco polimorfismos (Tabla 8 y figura 14)

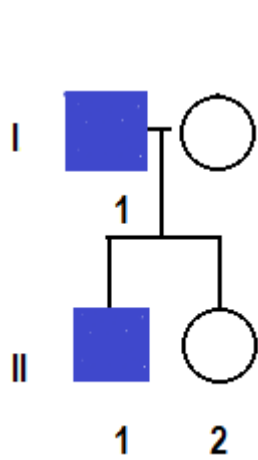
**Tabla 8. Alteraciones encontradas en el exón 28 del gen VWF en pacientes con EVW.**

Exón	Mutación			Polimorfismo.	
	Número de nucleótido	Cambio de aminoácido	Dominio proteico	Número de nucleótido	Aminoácido codificado
28	3789G>C	F1263S	A1-A2	4284C>T	1428I
	4106T>C	F1369S		4414C>G	H1473D
	4109G>A	S1370N		4641T>C	1547 Tre
	4184G>C	R1395P		4665A>C	1585 Ala
	4353C>A	D1451E		4693G>T	V1565L

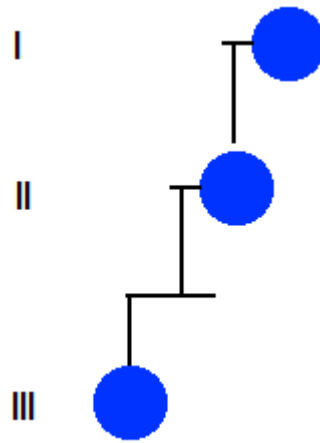


*Figura 14. Algunas de las Mutaciones y Polimorfismos encontrados en el exón 28 del gen VWF de pacientes con EVW.*

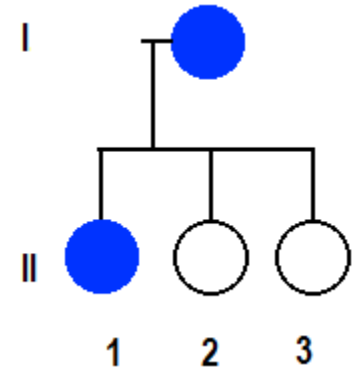
A continuación se muestran los árboles genealógicos de las familias estudiadas.



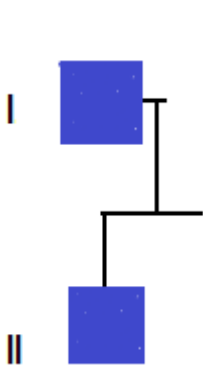
Familia 1  
Mutación 4106T>C; F1369S



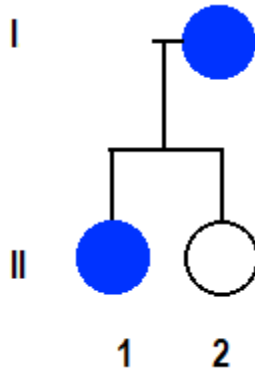
Familia 2  
Mutación 4184G>C; S1370N



Familia 3  
Mutación 4353C>A; D1451E



Familia 4.  
Mutación 3789G>C; F1263S



Familia 5  
Mutación 4109T>C; S1370N



De los polimorfismos, 4414C>G se ha informado en población norteamericana con una frecuencia de 0.81% (Sadler y Ginsburg, 1993); 4641T>C en población japonesa e inglesa con frecuencia de 0.36 a 0.41% (Cumming et al., 2006); 4665A>C en población japonesa con frecuencia del 0.64% (Sadler y Ginsburg, 1993) y 4693G>T fue descrito por Donnér et al. (1993).

Los tres casos índice únicos y dos integrantes de una familia mostraron la mutación 4106 T>C que cambia el amino ácido Fenilalanina por Serina. Hace falta información de si los casos índices son familiares o no. Esta mutación se informó previamente en nuestra población mexicana.

Con respecto al nuevos cambios 3789G>C se requiere de estudio poblacional de controles sin EVW para corroborar si se trata de mutación nueva y la 4284C>T es un cambio silencioso ya que no cambia el amino ácido por lo que es un polimorfismo. Habrá que hacer estudios poblacionales para ver su frecuencia.

Las mutaciones observadas fueron puntuales de sentido equivocado, produciendo sustitución de un solo aminoácido. Dichas alteraciones se presentaron en la región que codifica para el dominio A1-A2, involucrados en la unión a la glicoproteína 1b (GPIb), todas relacionadas con EVW tipo 2, la primera como 2-A y 2M las subsecuentes, semejantes a las informadas en las bases de datos internacionales y en nuestra población mexicana (Melo et al 2007; Morales de la vega, 2008), aunque es necesaria la evaluación bioquímica para confirmar el subtipo (RIPA, cuantificación de VWF:AG, FVIII, etc.) y subclasificarlas adecuadamente. Sin embargo, debido a que ambas se heredan de manera autosómica dominante es posible dar asesoramiento adecuado por el médico especialista en Genética.

Recientemente se ha demostrado que algunos polimorfismos pueden alterar la actividad de la proteína VWF (Bowen y Collins, 2004; Jaewoo et al, 2007) y alterar la fisiología y la hemostasis del individuo (Casonato et al, 2007).

Además, debido a que la población mestiza mexicana es una mezcla de genes caucásicos, indígenas y africanos en proporción variable, es importante continuar realizando el estudio molecular para caracterizar mejor a nuestra población mexicana.

Por último, es importante recalcar la importancia del exón 28 debido al alto número de cambios: mutaciones o polimorfismos, necesarios para dar un diagnóstico adecuado.

## 8. CONCLUSIONES

1. La muestra de pacientes mexicanos con EVW, mostraron una de cinco mutaciones que producen VWD tipo 2, una de ellas nueva.
3. Se encontraron además, cinco polimorfismos ya informados.
4. Se encontraron dos nuevas variaciones que requieren de estudios poblacionales para confirmar su frecuencia en la población.
5. Se confirmó la hipótesis propuesta ya que se encontraron alteraciones nuevas y ya informadas en el exón 28 del gen *VWF*.

## 9. LITERATURA CITADA

- Aird WC, Jahroudi N, Weiler-Guettler H, Rayburn HB, Rosenberg RD. Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995; 92:4567–4571.
- Alvarado IM. Fisiología de la coagulación: nuevos conceptos aplicados al cuidado perioperatorio. *Univ. Med. Colombia* 2013; 54: 338-352.
- Babic N, Huskic J, Nakas-Icindic E, Tihic-Kapidzic S. New information about von Willebrand's Factor? *Health Med.* 2010; 4:187-194.
- Base de datos de la Sociedad Internacional en Trombosis y Hemostasia y Comité de estandarización de VWF, Universidad de Sheffield, Reino Unido. <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>.
- Base de datos japonesa sobre polimorfismos de un solo nucleótido disponible en <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>.
- Benítez-Aranda H, Fernández-Castillo J, López-García A, Nieva-García B, Juan-Shum L, Rodríguez-Zepeda M, Martín-Trejo J, Bernáldez-Ríos R Gravedad del sangrado y su asociación con las distintas variantes de la enfermedad de von Willebrand en pacientes pediátricos- *Bol Med Hosp Infant Mex* 2004; 61: 297-306.
- Bowen DJ and Collins PW. An amino acid polymorphism in von Willebrand factor correlates with increased susceptibility to proteolysis by ADAMTS13. *Blood* 2004; 103:941-7.
- Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Kollnberger M, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 2011; 117:1400–1407.
- Campos M, Sun W, Yu F, Barbalic M, Tang W, Chambless LE, Wu KK, Ballantyne C, Folsom AR, Boerwinkle E and Dong Jf. Genetic determinants of plasma von Willebrand factor antigen levels: a target gene SNP and haplotype analysis of ARIC cohort. *Blood* 2011; 117:5224-5230.
- Cao W, Krishnaswamy S, Camire RM, Lenting PJ and Zheng XL. Factor VIII accelerates proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13. *PNAS* 2008; 105 (21): 7416-7421.
- Casonato A, Sartorello F, Pontara E, Gallinero L, Bertomoro A, Cattini MG, Daidone V, Szukowska M and Pagnan A. A novel von Willebrand factor mutation (I1372S)

- associated with type 2B-like von Willebrand disease: An elusive phenotype and a difficult diagnosis and a difficult diagnosis. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1182–1187.
- Castaman G, Federici A B, Rodehiero B, Manucci PM. von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica* 2003;88:94-108.
  - Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE, Hamm HE. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* 2006; 107:2736–2744.
  - Crawley JT, Groot RD, Xiang Y, Luken BM, Lane DA: Unravelling the scissile bond: how ADAMTS13 recognises and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011; 118: 3212–3221.
  - Cumming AM, Keeney S, Jenkins PV, Nash MJ and O'Donnell. Clinical utility gene card for: von Willebrand disease. *Eur J Hum Genet* 2011, 19: doi:10.1038/ejhg.2010.222.
  - Dayananda KM, Singh I, Mondal N, Neelamegham S. Von Willebrand Factor self-association on platelet GpIb{alpha} under hydrodynamic shear: effect on shear-induced platelet activation. *Blood* 2010; 116:3990–3998.
  - Denis CV, Christophe OD, Oortwijn BD, Lenting PJ. Clearance of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 2008; 99: 271–278.
  - De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K: von Willebrand factor to the rescue. *Blood* 2009; 113: 5049–5057.
  - Favaloro EJ, Bonar R, Kershaw G, Sioufi J, Hertzberg M, Street A, Lloyd J, Marsden K. Laboratory diagnosis of von Willebrand's disorder: quality and diagnostic improvements driven by peer review in a multilaboratory test process. *Haemophilia* 2004;10:232–242.
  - Franchini M, Capra F, Targher G, Montagnana M and Lippi G. Relationship between ABO blood and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. *Thromb J* 2007; 5: 14.
  - Fu X, Chen J, Gallagher R, Zheng Y, Chung DW, López JA. Shear stress-induced unfolding of von Willebrand factor accelerates oxidation of key methionine residues in the A1A2A3 region. *Blood* 2011, 118: 5283-91.
  - Fuchs B, Budde U, Schulz A, Kessler CM, Fisseau C, Kannicht C: Flow-based measurements of von Willebrand factor (vWF) function: binding to collagen and platelet adhesion under physiological shear rate. *Thromb Res* 2010; 125: 239–245.

- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD: Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 15880–15885.
- Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1777–83.
- Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* 2008; 112:957–964.
- Ginsburg D, Sadler JE. von Willebrand disease: a database of point mutations, insertions, and deletions. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms, and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1993; 69:177–184.
- Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand Disease. *Blood Rev* 2010; 24: 123-134.
- Haberichter SL, Merricks EP, Fahs SA, et al. Reestablishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood* 2005; 105: 145–152.
- Hassan MI, Saxena A, Ahmad F. Structure and function of von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinol* 2012, 23:11–22
- Hamm HE: How activated receptors couple to G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4819, 2001.
- Hoffman Maureane and Monroe Dougald M. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 958–65
- Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE and Mcglave P.. *Hematology: basic principles and practice*. 4th ed. 2005. Elsevier. USA.
- Jaewoo S, Choi JR and Song KS. Investigation of von Willebrand Factor Gene Mutations in Korean von Willebrand Disease Patients. *Korean J Lab Med* 2007;27:169-76.
- James P, Goodeve A. von Willebrand disease. *Genet Med* 2011; 13: 365-376.
- Johnsen J, Lopez JA. VWF secretion: what's in a name? *Blood* 2008;112:926–927.
- Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003; 1:682–689.

- Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991 ;30:253–269.
- Mannucci PM, Chediak J, Hanna W, Byrnes J, Ledford M, Ewenstein BM, Retzios AD, Kapelan BA, Schwartz RS, Kessler C, et al. Treatment of von Willebrand disease with a high-purity factor VIII/von Willebrand factor concentrate: a prospective, multicenter study. *Blood* 2002 ;99:450–456.
- Mannucci PM. Hemostatic drugs. *N Engl J Med* 1998; 339:245–253.
- Meijer P, Haverkate F. An external quality assessment program for von Willebrand factor laboratory analysis: an overview from the European concerted action on thrombosis and disabilities foundation. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32:485–491.
- Melo-Nava BM, Benítez H, Palacios JJ, Nieva B, Arenas D, Jaloma-Cruz AR, Navarrete C, Salamanca F, Peñaloza R. Molecular study of VWF gene from Mexican Mestizo patients with von Willebrand disease, and the finding of three new mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 39: 361–365.
- Millar CM, Starke R, Riddel AF, et al. Investigation of relationship between ADAMTS-13, von Willebrand factor antigen and collagen-binding activity in patients with type 1 von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (Suppl 1): P1471.
- Morales LD, Martin C, Cruz MA. The interaction of von Willebrand factor- A1 domain with collagen: mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational change in A1 domain induced by collagen. *J Thromb Haemost* 2006; 4:417–425.
- O'Seaghda M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, et al. Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J* 2006; 273: 4831–4841.
- Patel D, Vaananen H, Jirouskova M, Jirousková M, Hoffmann T, Bodian C, Collier BS: Dynamics of GP IIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen in vitro as revealed by videomicroscopy. *Blood* 2003; 101:929.
- Pasi KJ, Collins PW, Keeling DM, Brown SA, Cumming AM, Dolan GC, Hay CR, Hill FG, Laffan M, Peake IR. Management of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10:218–231.

- Pendu R, Terraube V, Christophe OD, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood* 2006; 108: 3746–3752
- Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F: von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* 2010; 116: 4712–4719.
- Ping Lou G, Ni B, Yang X and Zhang Wu Y. von Willebrand Factor: more than a regulator of Hemostasis and Thrombosis. *Acta Haematol.* 2012; 128: 158-169.
- Plow EF, Felez J, Miles LA: Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1991; 66:32.
- Qin F, Impeduglia T, Schaffer P, et al. Overexpression of von Willebrand factor is an independent risk factor for pathogenesis of intimal hyperplasia: preliminary studies. *J Vasc Surg* 2003; 37: 433–439.
- Quintana-González S, Martínez-Murillo C. Modelo celular de la coagulación. *Revista de Hemostasia y Trombosis* 2008; 2:59-65.
- Riddell AF, Gomez K, Millar CM, Mellars G, Gill S, Brown SA, Sutherland M, Laffan MA, Mckinnon TA: Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* 2009; 114: 3489–3496.
- Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69:454–459.
- Ruggeri ZM. von Willebrand Factor. *J Clin Invest* 1997; 99: 559-564.
- Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1335–1342.
- Rugeri L, Beguin S, Hemker C, Bordet JC, Fleury R, Chatard B, et al. Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica* 2007; 92:1639–1646.
- Sadler JE. Biochemistry and genetics of von willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67:395–424.
- Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2000; 84:160–174.
- Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, et al. Update on the pathophysiology and classification

- of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4:2103–2114.
- Saint-Lu N, Oortwijn BD, Pegon JN, Odouard S, Christophe OD, de Groot PG, Denis CV, Lenting PJ. Identification of galectin-1 and galectin-3 as novel partners for von Willebrand factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:894–901.
  - Shahbazi S, Lenting PJ, Fribourg C, et al. Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1956–1962.
  - Shahbazi S, Alavi S and Mahdian R. Classification of exon 18 linked variants of VWF gene in von Willebrand disease. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2012; 3:77-83.
  - Shrimpton CN, Borthakur G, Larrucea S, et al: Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J Exp Med* 2002; 196:1057.
  - Smith NL, Rice KM, Bovill EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B, Lumley T, Glazer NL, van Hylckama Vlieg A, Tang W, Dehghan A, Strachan DP, O'Donnell CJ, Rotter JI, Heckbert SR, Psaty BM, Rosendaal FR. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood* 2011; 117: 6007–6011.
  - Sousa NC, Anicchino-Bizzacchi JM, Locatelli MF, Castro V, Barjas-Castro ML. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. *Haematologica* 2007;92:236-9.
  - Sukhu K, Poovalingam V, Mahomed R, Giangrande PL. Ethnic variation in von Willebrand factor levels can influence the diagnosis of von Willebrand disease. *Clin Lab Haematol* 2003; 25:247–249.
  - Terraube V, Pendu R, Baruch D. Increased metastatic potential of tumor cells in Von Willebrand factor-deficient mice. *J Thromb. Haemost* 2006; 4: 519-526.
  - Terraube V, Marx I, Denis CV: Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. *Thromb Res* 2007; 120(suppl 2):S64–S70.
  - Tsai, HM. von Willebrand Factor, shear stress, and ADAMTS13 in Hemostasis and Thrombosis. *ASAIO J*. 2012; 58:163-169.
  - Wu Y, Asazuma N, Satoh K, et al: Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinases in human platelets: The role of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 2003, 101:3469,



- Yang X, Luo G, Ni B, Wu Y von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta hematológica* 2012; 128: 158-169.
- Zanardelli S, Chion AC, Groot E, Lenting PJ, McKinnon TA, Laffan MAI. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood* 2009; 114:2819–2828.
- Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within vonWillebrand factor. *Blood* 2012; 120:449–58.

## **10. APÉNDICES**

### **10.1 Material utilizado**

#### **Extracción de DNA**

Micropipetas de 20, 50, 200 y 10000  $\mu$ L.

Tubos eppendorf de 1.5 mL.

Vasos de precipitado 250 mL (Pirex).

Matraz Erlenmeyer 250 mL (Pirex).

Recipientes de vidrio de 250 mL (Pirex).

Papel parafilm.

Pipetas Pasteur.

Puntas desechables

#### **PCR**

Tubos eppendorf de 200  $\mu$ L.

Micropipetas de 2  $\mu$ L, 5-50  $\mu$ L y 50-200  $\mu$ L.

Puntas desechables.

Vasos de precipitado 250 mL (Pirex).

Guantes de latex (Ambiderm).

#### **Electroforesis**

Pipeta volumen variable de 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 1 mL (Gilson).

Papel parafilm.

Vaso de precipitado de 50 mL y 125 mL (Pirex).

Matraz Erlenmeyer 250 mL (Pirex).

Probeta 100 mL.

Pipeta graduada 10 mL (Pirex).

Tubos cónicos de 15 y 50 mL (Costar).

Puntas para micropipeta.

Espátula

Placas de vidrio para electroforesis (BioRad).

Peine para formar pozos (BioRad).

### **Secuenciación.**

Pipeta volumen variable 50µL, 200µL y 1mL (Gilson).

Pipeta graduada 25 mL (Pirex).

Frascos ámbar.

Puntas.

Guantes de latex (Ambiderm).

## **10.2 Apéndice B: EQUIPOS.**

### **Extracción de DNA**

Centrifuga refrigerada.

### **PCR**

Termociclador Master Cyclor gradient (Eppendorf)

### **Electroforesis**

Cámara de electroforesis (Bio Rad).

Escaner de luz UV (Bio Rad)

Fuente de poder

### **Secuenciación.**

Termociclador Master Cyclor gradient (Eppendorf)

Liofilizador .

### **10.3 Apéndice C: Reactivos.**

#### **Para Extracción de DNA**

TRIS base

Cloruro de Sodio (NaCl)

Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>).

Agua inyectable.

Etanol absoluto.

Dodecil sulfato de sodio (SDS)

#### **PCR.**

Agua inyectable.

Desoxiribonucleótidos.

Taq polimerasa

Primers específicos.

MgCl<sub>2</sub> 25mM

Buffer de amplificación 10x

DNA

#### **Electroforesis**

TRIS base

Cloruro de Sodio (NaCl)

Agua desionizada

Ácido acético

Etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA.Na<sub>2</sub>)

Agarosa de bajo punto de fusión

Bromuro de Etidio

Azul de bromofenol

Ciano-xilol

Glicerol

#### **Secuenciación**

Big Dye Sequenciator 3.1 ®

Agua inyectable estéril

Primers específicos.

Buffer de secuenciación 5x

#### **10.4 Apéndice D: Preparación de soluciones.**

##### **PARA EXTRACCIÓN DE DNA.**

###### **SOLUCIÓN DE LISIS.**

En un vaso de precipitado de 100 mL, adicionar 25 mL de agua bidestilada. Pesar 290 mg de cloruro de sodio (NaCl), 78.8 mg de TRIS-HCl y 18.6 mg de EDTA. Disolver cada una de las especies químicas y llevar a 100 mL. Guardar a 4°C.

###### **SOLUCIÓN ETANOL 70%**

Medir en una probeta de 100 mL, 70 mL de etanol absoluto vaciar en frasco limpio. Medir 30ml de agua desionizada y agregar a la solución anterior. Guardar a 2-8°C.

###### **SOLUCIÓN SDS AL 10%.**

Pesar 10 g de SDS (Dodecil sulfato de sodio) y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Distribuir en frascos de 10ml y mantenerlos a temperatura ambiente hasta su uso.

###### **SOLUCIÓN DE NaCl 5mM.**

Disolver 0.2925g de NaCl y aforar a un volumen de 100 mL.

##### **PARA ELECTROFORESIS.**

###### **BUFFER DE CORRIDA TAE 50x**

Disolver 242.2 g de TRIS-Base (Hidroximetil aminometano Trizma-base) en 500 mL de agua bidestilada. Adicionar 57.1 mL de ácido acético y adicionar 500 mg de EDTA. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

###### **BUFFER DE CORRIDA TAE 1x**

Disolver 10 mL de la Solución Buffer de corrida TAE 50x y aforar a 500 mL con agua desionizada.

#### BUFFER DE CARGA

En 30 mL de agua desionizada adicionar 0.125g de azul de bromofenol, 0.125g de Xilencianol y 4.5 mL de glicerol. Homogenizar y aforar a 50 mL.